



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Infecção pelo vírus da hepatite C – diversidade genética e estudo molecular de mediadores da resposta imune

Dissertação apresentada à
Universidade de Coimbra para
cumprimento dos requisitos
necessários à obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica,
realizada sob a orientação
científica do Técnico Superior de
Saúde António Martinho (Centro
de Histocompatibilidade do
Centro) e da Professora Doutora
Paula Morais (Universidade de
Coimbra).

Ana Cristina do Espírito Santo Henriques

2012

"A descoberta consiste em ver o que todos viram e em pensar no que ninguém pensou."

A. Szent-Gyorgyi (1893 – 1986)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr. António Martinho, pelo acompanhamento pedagógico, e por toda a motivação, paciência, disponibilidade e dedicação.

À Professora Doutora Paula Morais por se ter disponibilizado e aceitado ser minha orientadora interna.

À Dra. Maria Luísa Pais, directora do Centro de Histocompatibilidade do Centro, por ter consentido a realização do meu estágio.

A todas as pessoas do Centro de Histocompatibilidade do Centro, principalmente às que fazem (ou fizeram) parte dos laboratórios de genética e genómica molecular, Olívia Simões, Ana Sofia, Isabel Velada, José Gomes, Rodrigo Nunes, e João Mendes.

À Diana Carvalho e à Sílvia Andrade, em especial, por todos os momentos de amizade e companheirismo que me proporcionaram, quer durante o meu percurso universitário, quer o longo do estágio realizado no Centro de Histocompatibilidade do Centro.

Aos meus pais e avó, pelo amor incondicional, carinho, apoio e dedicação demonstrados durante toda a minha vida.

À Maria Helena Oliveira, que nestes cinco anos foi como uma segunda mãe para mim. Obrigado pelo carinho, compreensão, apoio e dedicação com que me presenteou.

A todos os amigos e familiares que, directa ou indirectamente, me acompanharam e apoiaram.

Ao meu namorado, por todo o amor, e por ter estado sempre presente em todos os momentos.

Índice Geral

Índice Geral	iii
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xi
Abreviaturas.....	xiii
Resumo	xvii
Abstract	xviii
Capítulo 1.....	1
Introdução.....	1
I. Hepatite C	2
1. Breve enquadramento	2
2. Incidência	2
3. Formas crónica e aguda da doença.....	3
4. Transmissão.....	3
II. Vírus da Hepatite C	5
1. Características gerais.....	5
2. Genótipos e quasispecies	5
3. Organização do genoma e das proteínas virais.....	6
4. Ciclo de vida	7
4.1. Entrada na célula hospedeira.....	7
4.2. Replicação	9
4.3. Tradução.....	9
4.4. Modificações pós-traducionais e montagem viral	10
5. Tropismo viral.....	12
6. Regiões 5'UTR e 3'UTR	13
6.1. Região 5'UTR	13
6.2. Região 3'UTR	14
7. Proteínas estruturais.....	15
7.1. Core	15
7.2. Glicoproteínas do envelope viral	16
7.3. Proteína p7	16
8. Proteínas não estruturais	17
8.1. NS2	17

8.2.	NS3	17
8.3.	NS4A	18
8.4.	NS4B	18
8.5.	NS5A	19
8.6.	NS5B	20
III.	Resposta imune ao VHC	21
1.	Resposta imune inata	21
2.	Resposta imune adaptativa	22
3.	Interacção entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa	23
4.	Falha nos mecanismos de resposta ao VHC	24
4.1.	Evasão da resposta imune inata	24
4.2.	Evasão da resposta imune adaptativa	26
IV.	Diagnóstico do VHC	28
1.	Diagnóstico serológico	28
2.	Diagnóstico molecular	28
V.	Tratamento	29
1.	Terapia	29
2.	Resposta à terapia	30
3.	Factores que influenciam a resposta à terapia	31
3.1.	Expressão génica de mediadores imunológicos e resposta ao VHC	32
3.2.	Gene IL 28 e resposta ao VHC	34
4.	Novas terapêuticas e vacinas	35
VI.	Objectivos	37
1.	Estudo da variabilidade do genoma do VHC	37
1.1.	Estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3	37
3.	Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento	38
Capítulo 2.	39
Materiais e Métodos	39
I.	População em estudo	40
II.	Estudo da variabilidade do genoma do VHC	40
1.	Estudo da variabilidade das regiões 5'UTR e HVR1 do genoma do VHC	40
1.1.	Estudo da variabilidade da região 5'UTR	40
1.1.1.	Pacientes em estudo	40

1.1.2.	Extracção RNA viral a partir de amostras de soro.....	40
1.1.3.	Síntese de cDNA	43
1.1.4.	Nested PCR	45
1.1.5.	Electroforese	48
1.1.6.	Purificação com ExoSap.....	50
1.1.7.	Reacção de Sequenciação	51
1.2.	Estudo da variabilidade da região HVR1	54
1.2.1.	Pacientes em estudo	54
1.2.2.	Síntese de cDNA	54
1.2.3.	<i>Nested PCR</i>	56
2.	Estudo da variabilidade das regiões NS3 e NS5A do genoma do VHC.....	58
2.1.	Estratégias de amplificação e design de primers	59
2.1.1.	Estratégia 1.....	59
2.1.2.	Estratégia 2.....	60
2.2.	Protocolos experimentais	65
2.3.	Programas de PCR	66
III.	Avaliação da expressão génica de mediadores da actividade imunológica, antes, e em diferentes tempos de tratamento.....	69
1.	Pacientes em estudo	69
2.	Extracção de RNA de amostras em tubos PAX GENE.....	70
2.1.	Princípio.....	70
2.2.	Procedimento.....	70
3.	Síntese de cDNA	72
3.1.	Princípio.....	72
3.2.	Procedimento.....	72
4.	Amplificação e quantificação relativa do cDNA - Real time PCR.....	73
4.1.	Princípio.....	73
4.2.	Procedimento.....	74
IV.	Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento.....	77
1.	Doentes em estudo	77
2.	Procedimento.....	78
Capítulo 3.....	80	
Resultados e Discussão	80	
I. Estudo da variabilidade do genoma do VHC.....	81	

1.	Estudo da variabilidade da região 5'UTR	81
2.	Estudo da variabilidade da região HVR-1	83
3.	Estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3	86
II.	Avaliação da expressão génica de mediadores imunológicos	90
1.	Genes estudados	90
1.1.	STAT6	92
1.2.	IL-4	93
1.3.	IL-10	94
1.4.	IL-6	95
1.5.	IL-2	96
1.6.	IL-12	97
1.7.	IL-18	98
1.8.	IL-8	99
1.9.	SOCS-1	100
1.10.	CXCL9	101
1.11.	CXCL10	103
1.12.	CCL3	104
1.13.	TNF- α	105
1.14.	TGF- β 1	106
1.15.	IRF-2	107
1.16.	IRF-8	108
1.17.	IFIT1	109
1.18.	IFI27	110
1.19.	OAS-3	111
1.20.	GZMB	112
1.21.	FAS-L	113
2.	Diferenças no perfil de expressão dos pacientes	115
III.	Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento	117
Capítulo 3.	120
Conclusão.	120
Anexos	124
A.	Dados relacionados com o estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3 do genoma do VHC	124

Tabela XXXIX. Primers usados nas PCRs das regiões NS5A e NS3, e as respectivas temperaturas de <i>melting</i>. (Continuação)	125
B. Dados relacionados com o estudo da região 5'UTR do genoma do VHC	126
C. Dados relacionados com o estudo da expressão genica de mediadores imunológicos	128
D. Aminoácidos e ácidos nucleicos	134
Referências	136

Índice de figuras

Figura 1. Organização do genoma do VHC e a poli-proteína precursora das proteínas virais. (Rehermann 2009)	8
Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida do VHC. (Pereira and Jacobson 2009)	11
Figura 3. Evasão dos mecanismos de resposta imune inata pelo VHC. (Rehermann 2009)	25
Figura 4. Definição da resposta a Peg-IFN e RBV. A cinética dos níveis de RNA do VHC durante a terapia ajudam a prever a resposta.	30
Figura 5. Respostas mediadas por genes estimulados por IFN (ISG) na infecção pelo VHC.	34
Figura 6. Passos de extracção de RNA, no <i>BioRobotM48</i> , com o <i>MagAttract (Qiagen) Viral RNA M48</i> . (2010).....	42
Figura 7. Esquema ilustrativo, referente à sequenciação com recurso a terminadores marcados.....	52
Figura 8. Esquema representativo da estratégia 1 de amplificação das regiões NS3 e NS5A.	59
Figura 9. Esquema representativo da estratégia 2 de amplificação das regiões NS3 e NS5A.	61
Figura 10. Passos do método de extracção de RNA total, a partir de amostras de sangue, com o kit <i>PAXgene® Blood RNA (PreAnalytiX, QIAGEN)</i>	71
Figura 11. Número de mutações associadas à presença de duas bases no mesmo local da sequência, em pacientes respondedores e não respondedores.	82
Figura 12. Percentagem de mutações sinónimas vs não sinónimas.....	85
Figura 13. Percentagem de mutações sinónimas vs não sinónimas.....	85
Figura 14. Alterações na sequência de aminoácidos na região HVR1 (assinaladas com um rectângulo vermelho) provocam alteração na estrutura secundária, ao nível da proteína E2. .	86
Figura 15. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de STAT-6 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	92
Figura 16. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-4 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	93
Figura 17. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-10 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	94
Figura 18. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-6 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	95
Figura 19. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-2 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	96
Figura 20. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-12 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	98
Figura 21. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-18 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	99

Figura 22. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-8 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	100
Figura 23. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de SOCS-1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	101
Figura 24. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de CXCL9 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	102
Figura 25. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de CXCL10 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	103
Figura 26. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de CCL3 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	105
Figura 27. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de TNF- α antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	106
Figura 28. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de TGF- β 1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	107
Figura 29. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IRF2 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	108
Figura 30. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IRF8 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	109
Figura 31. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IFIT1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	110
Figura 32. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IFI27 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	111
Figura 33. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de OAS-3 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	112
Figura 34. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de GZMB antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	113
Figura 35. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de FAS-L antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.	114
Figura 36. Percentagem de pacientes relativa aos genótipos dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860.	118

Figura 37. Percentagem de pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) relativa aos genótipos C/C, C/T, e T/T, do polimorfismo rs12979860.....	119
Figura 38. Percentagem de pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) relativa aos genótipos T/T, T/G, e G/G, do polimorfismo rs8099917.	119

Índice de tabelas

Tabela I. Pacientes envolvidos no estudo da variabilidade da região 5'UTR (idade, sexo, genótipo e tipo de resposta).	41
Tabela II. Componentes da reacção de transcrição reversa com a AMV-RT.	44
Tabela III. Programa de temperaturas seguido na reacção de transcrição reversa com a AMV-RT.....	44
Tabela IV. Reagentes, e as respectivas quantidades, utilizados na primeira PCR.	46
Tabela V. Programa seguido na realização da primeira PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.	46
Tabela VI. Primers utilizados nas duas PCRs relativas à amplificação de uma porção da região 5'UTR.	47
Tabela VII. Reagentes, e as respectivas quantidades, utilizados na segunda PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.	47
Tabela VIII. Programa seguido na realização da segunda PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.....	48
Tabela IX. Programa seguido na reacção de sequenciação.	53
Tabela X. Pacientes envolvidos no estudo da variabilidade da região HVR1 (idade, sexo e genótipo).	54
Tabela XI. Reagentes fornecidos pelo <i>kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR</i> para a preparação da mistura reaccional.....	56
Tabela XII. Programa seguido na reacção de síntese de cDNA com o <i>kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR</i>	56
Tabela XIII. Reagentes, e respectivas quantidades, usados na primeira PCR da região HVR1. .	57
Tabela XIV. Programa seguido na amplificação da região HVR1.	57
Tabela XV. Primers utilizados na amplificação da região HVR1.	58
Tabela XVI. Primers usados na estratégia 1 de amplificação das regiões NS3 e NS5A dos genótipos 1b e 3a.....	60
Tabela XVII. Regiões amplificadas e os primers envolvidos, de acordo com a estratégia 1, para a NS3.	62
Tabela XVIII. Regiões amplificadas e os primers envolvidos, de acordo com a estratégia 1, para a NS5A.	63
Tabela XIX. Primers usados na estratégia 2 de amplificação das regiões NS3 e NS5A dos genótipos 1b e 3a.....	64
Tabela XX. Reagentes de PCR e respectivas concentrações experimentadas com <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> , <i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i> , e <i>Expand Long Range PCR System</i>	66
Tabela XXI. Programa de PCR sem <i>touchdown</i> , usado nas reacções de amplificação com <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> e <i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i>	67
Tabela XXII. Programa de PCR <i>touchdown</i> , usado nas reacções de amplificação com <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> e <i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i>	67
Tabela XXIII. Programa de PCR sem <i>touchdown</i> , usado nas reacções de amplificação com <i>Expand Long Range PCR System</i>	68
Tabela XXIV. Programa de PCR <i>touchdown</i> , usado nas reacções de amplificação com <i>Expand Long Range PCR System</i>	68

Tabela XXV. Pacientes envolvidos no estudo da expressão genica de mediadores imunológicos (sexo, idade, resposta, e amostras disponíveis).....	69
Tabela XXVI. Programa de temperatura para a síntese de cDNA com o kit <i>SuperScript® First-Strand SuperMix for qRT-PCR</i>	73
Tabela XXVII. Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de amplificação relativa ao método de PCR em tempo real.	75
Tabela XXVIII. Programa seguido nas reacções de amplificação, no PCR em tempo real.	75
Tabela XXIX. Pacientes envolvidos no estudo dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860, associados ao gene IL28B (Sexo, idade, genótipo e resposta à terapêutica).	77
Tabela XXX. Reagentes, e respectivas quantidades, utilizados na PCR relativa aos polimorfismos associados à região IL28B.....	78
Tabela XXXI. Primers usados nas reacções de amplificação das regiões relativas à localização dos polimorfismos associados ao gene IL28B.	78
Tabela XXXII. Programa seguido nas amplificação das regiões relativas à localização dos polimorfismos associados ao gene IL28B.....	79
Tabela XXXIII. Média e desvio padrão do número de mutações, para doentes respondedores e não respondedores.	82
Tabela XXXIV. Nº de mutações sinónimas e não sinónimas por paciente, o tipo de resposta... 84	
Tabela XXXV. Alterações ao nível das sequências aminoacídicas correspondentes à região HVR1, e comparação com a sequência de referência.....	84
Tabela XXXVI. Genes envolvidos no estudo de expressão génica ao nível de PBMCs.	91
Tabela XXXVII. Diferenças observadas na expressão génica de mediadores imunológicos em doentes não respondedores à terapêutica, em relação a respondedores.	115
Tabela XXXVIII. Número e percentagem de pacientes relativos aos genótipos dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860.....	117
Tabela XXXIX. Primers usados nas PCRs das regiões NS5A e NS3, e as respectivas temperaturas de <i>melting</i>	124
Tabela XL. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 1a ¹	126
Tabela XLI. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 1b ¹	127
Tabela XLII. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 3a.....	127
Tabela XLIII. Idade e sexo das pessoas cujas amostras serviram como controlo no estudo da expressão genica de mediadores imunológicos.	128
Tabela XLIV. Média e desvio padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados, em.....	129
Tabela XLV. Aminoácidos e respectivos códigos de uma e três letras. (IUPAC – <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)	134
Tabela XLVI. Códigos de designação de DNA. (IUPAC – <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)	135

Abreviaturas

aa – aminoácido

A – Adenina

ADAR – Adenosina desaminase específica de RNA, do inglês Adenosine Deaminase, RNA-Specific

ALT – Alanina Aminotransferase

AMV RT – Transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, do inglês Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase

APCs – Células apresentadoras de antígenos, do inglês *Antigen Presenting Cells*

ARF – Pauta de leitura alternativa, do inglês *Alternative Reading Frame*

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

bDNA – Técnica de diagnóstico molecular *branched DNA*

C – Citosina

CD – *Cluster of differentiation*

CLDN – Claudina

CTL – Linfócitos T citotóxicos, do inglês *Cytotoxic T Lymphocyte*

DAA – Agentes anti-virais directos, do inglês *Direct Antiviral Agents*

DC – Células dendríticas, do inglês *Dendritic Cells*

DC-SIGN – Lectina DC-SIGN, do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

cDNA – DNA complementar

dNTP – desoxirribonucleosídeo trifosfatado

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitidina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

dTTP – desoxitimidina trifosfato

ddATP – didesoxiadenosina trifosfato

ddCTP – didesoxicitidina trifosfato

ddGTP – didesoxiguanosina trifosfato

ddTTP – didesoxitimidina trifosfato

ddNTP – Didesoxirribonucleosídeo trifosfatado

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Desoxirribonucleic Acid*

dsRNA – RNA de cadeia dupla, do inglês *double stranded*

E1SS – Sequência sinal E1, do inglês *Signal Sequence*

EIAs – Ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzymatic Immunoassay*

eIF – Factor de iniciação eucariótico, do inglês *Eukaryotic Initiation Factor*

ER – Reticulo endoplasmático, do inglês *Endoplasmic Reticulum*

EVR – Resposta virológica precoce, do inglês *Early Virological Response*

G – Guanina

GAS – *Gamma-Activated Sequence Elements*

GTP – Guanosina trifosfato

HVR – Região hipervariável, do inglês *Hypervariable Region*

IFN – Interferão

IFN- α – Interferão alfa

IFN- β – Interferão beta

IKK ϵ – Proteína cinase IKK ϵ , do inglês *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon*

IPS-1 – proteína IFN- β , do inglês *Promoter Stimulator Protein 1*

IRES – Local de ligação ao ribossoma, do inglês *Internal Ribosomal Entry Site*

IRF – Factor regulador de interferão, do inglês *Interferon Regulatory Factor*

ISDR – região determinante de sensibilidade a interferão, do inglês *Interferon- α Sensitive Determining Region*

ISGF – Factor estimulador de interferão, do inglês *Interferon Stimulator Factor*

ISRE – Elemento de resposta estimulada por interferão, do inglês *IFN-stimulated response element*

IU – Unidades internacionais, do inglês *International Units*

Kb – kilobases

kDa – kiloDalton

LDL – Lipoproteína de baixa densidade, do inglês *Low-Density Lipoproteins*

LDL-R – Receptor de LDL, do inglês *LDL-Receptor*

L-SIGN – Lectina L-SIGN, do inglês *Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin*

MAPK – Proteína cinase activada por mitogénio, do inglês *Mitogen-activated protein kinase*

MHC – Complexo *major* de histocompatibilidade

min – minutos

mL – mililitros

MMV RT – Transcriptase reversa do vírus da leucemia murina, do inglês *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*

mRNA – RNA mensageiro

NANBH – Hepatite não A, não B, do inglês *non-A, non-B hepatitis*

NF-κB – Factor nuclear kappa B, do inglês *Nuclear Factor kappa B*

NK – *Natural killer*

NS – Não estrutural, do inglês *Non Structural*

nt – nucleótido

NTP – Nucleosídeo Trifosfatado

OAS – Oligoadenilato sintetase

OCLN – Ocludina

ORF – Pauta de leitura, do inglês *Opening Reading Frame*

PAMP – Perfil molecular associado a agentes patogénicos, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

pb – pares de bases

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral Mononuclear Blood Cells*

PCR – Reacção de polimerização em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Peg-IFN-α – Interferão alfa peguilado

PI – Inibidor de protease, do inglês *Protease Inhibitor*

PIAS – Proteína inibidora de STAT1 activada, *Protein Inhibitor of Activated STAT1*

PP2A – Proteína fosfatase 2A, do inglês *Protein Phosphatase 2A*

PKR – Receptor de proteína cinase, do inglês *Protein Kinase Receptor*

RBV – Ribavirina

RIG-I – *Retinoic Acid inducible Gene 1*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

ROS – Espécies reactivas de oxigénio, do inglês *Reactive oxygen species*

rRNA – RNA ribossomal

RT – Transcriptase reversa, do inglês *Reverse Transcriptase*

RVR – Resposta virológica rápida, do inglês *Rapid Virological Response*

SAP – Fosfatase alcalina *Shrimp*, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*

SNP – Polimorfismo ao nível de um único nucleótido, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*

SOCS – Supressor de sinalização por citocinas, do inglês *Suppressor Of Cytokine Signaling*

SR-BI receptor *scavenger* B tipo I

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)

SVR – Resposta virológica sustentada, do inglês *Sustained Virological Response*

T – Timina

TBK1 – Proteína cinase TBK1, do inglês *NF receptor-associated factor family member-associated NF-κB activator-binding kinase-1*

Th – *T helper*

TLR – receptor TLR, do inglês *Toll-Like Receptor*

TMA – Amplificação mediada por transcrição, do inglês *Transcription Mediated Amplification*

TMD – Domínio transmembranar, do inglês *Transmembranar Domain*

TJ – *Tight Junctions*

TNF – Factor de necrose tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor*

U – Uracilo

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

WHO – World Health Organization

Resumo

O vírus da hepatite C (VHC) é responsável pelo desencadeamento de hepatite C. Estima-se que aproximadamente 3 % da população esteja infectada. A infecção crónica corresponde à maioria dos casos, encontrando-se associada ao desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. A enorme variabilidade genética do VHC, associada à sua capacidade de evasão da resposta imune, constitui um travão ao desenvolvimento de estratégias eficazes no combate à hepatite C crónica. De facto, não há vacina, e o tratamento standard, baseado em interferão- α peguilado e ribavirina (Peg-IFN- α / RBV), apresenta taxas de sucesso variáveis e com efeitos secundários. Desta forma, surge a necessidade de encontrar métodos de predição de resposta dos pacientes, no sentido de desenvolver estratégias que possibilitem um melhor e mais eficaz acompanhamento dos doentes.

Os objectivos principais deste trabalho foram (i) estudar a variabilidade genética do VHC, ao nível das regiões NS5A, NS3, 5'UTR e HVR1; (ii) avaliar a expressão génica de mediadores imunológicos em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes, em diferentes tempos de tratamento com Peg-IFN / RBV; (iii) procurar uma associação entre os polimorfismos (SNPs) rs8099917 e rs12979860 relacionados com o IL28B, e o tipo de resposta à terapia.

Embora não tenha sido possível proceder ao estudo da variabilidade das regiões NS3 e NS5A do genoma do VHC, pensa-se que a resposta dos pacientes poderá encontrar-se associada à presença de variantes virais, e à ocorrência de mutações não sinónimas ao nível da HVR1. Ao nível dos estudos de expressão génica em PBMCs, observaram-se diferenças nos perfis de expressão de pacientes respondedores e não respondedores, antes do tratamento. A expressão de genes indutíveis por interferão tende a mostrar-se mais elevada em pacientes não respondedores, antes do tratamento. Relativamente aos polimorfismos associados ao gene IL28B, a percentagem de pacientes respondedores com os genótipos anteriormente associados a uma resposta positiva à terapia, mostrou-se um pouco superior à observada em não respondedores.

Os resultados obtidos, embora preliminares, podem sugerir focos de pesquisa posteriores, nomeadamente, no sentido de procurar factores que possam ajudar a efectuar uma predição da resposta dos pacientes à terapia e, simultaneamente, a elucidar os mecanismos que se encontram por detrás da evasão da resposta imune pelo VHC.

Palavras chave: vírus da hepatite C, interferão-alfa peguilado e ribavirina, resposta imune, variabilidade genética, expressão genica.

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) is responsible for the onset of hepatitis C. It is estimated that approximately 3% of the population is infected. Chronic infection correspond to the majority of the cases, being associated with the development of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The enormous genetic variability of HCV, associated with its capacity to evade the immune response, is hampering the development of effective strategies to combat chronic hepatitis C. In fact, there is no vaccine, and the standard treatment, based on pegylated interferon-alpha and ribavirin (Peg-IFN- α / RBV) presents success rates variables and side effects. Thus arises the need to find methods of predicting patient response, to develop strategies that enable better and more effective monitoring of patients.

The main objectives of this work were (i) study the genetic variability of HCV, at the level of the NS5A, NS3, 5'UTR and HVR1 regions (ii) to assess gene expression of immune mediators in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients at different times of treatment with Peg-IFN / RBV, (iii) search for an association between polymorphisms (SNPs) rs8099917 and rs12979860 related to the IL28B gene, and the type of response to therapy.

Although it has not been possible to study the variability of NS3 and NS5A regions of the HCV genome, it is believed that the patient response can be found associated with the presence of viral variants and the occurrence of non synonymous mutations at the level of HVR1. At the level of gene expression studies in PBMCs were observed differences in the expression profiles of responders and nonresponders patients before treatment. Inducible gene expression by interferon tend to show higher in non-responders, prior to treatment. For the IL28B gene associated polymorphisms, the percentage of responding patients with genotypes previously associated with a positive response to therapy, was slightly higher than in nonresponders.

The results, although preliminary, may suggest further research foci, namely, to seek factors that can help make a prediction of patient response to therapy and, simultaneously, to elucidate the mechanisms that lie behind the evasion of HCV immune response.

Keywords: hepatitis C, pegylated interferon-alfa and ribavirin, immune response, genetic variability, gene expression.

Capítulo 1.

Introdução

I. Hepatite C

1. Breve enquadramento

A hepatite C é uma doença que leva à inflamação do fígado, sendo causada pelo vírus da hepatite C (VHC). (A.D.A.M.) Em 1975, após o desenvolvimento de testes serológicos para os vírus da hepatite A e B, verificou-se que cerca de 65 % dos casos de hepatite associados a transfusões sanguíneas não eram causados pelos referidos vírus. Estes casos de hepatite foram então designados como casos de hepatite não A e não B (NANBH). (Feinstone, Kapikian et al. 1975). O vírus da hepatite C foi identificado em 1989, quando se clonou o genoma do principal agente associado aos casos de NANBH, a partir de moléculas de RNA viral presentes no plasma de chimpanzés infectados. (Choo, Kuo et al. 1989) Desde então, desenvolveram-se testes de detecção de anticorpos contra o vírus infeccioso, de onde se concluiu que este era o responsável pela maioria dos casos de NANBH, tendo sido designado como vírus da hepatite C. (Kuo, Choo et al. 1989)

2. Incidência

Os casos de hepatite C encontram-se distribuídos ao longo de todo o mundo (Adler, Goubau et al. 2002) (Lavanchy 2011) no entanto, os dados disponíveis acerca da epidemiologia da doença, nem sempre são os mais assertivos. Devido à ausência de sintomas numa fase inicial da doença, os indivíduos, muitas vezes, não têm conhecimento do seu estado clínico. Por outro lado, nalguns países, os estudos efectuados têm ainda um alcance limitado, abrangendo apenas determinados segmentos da população. (Shepard, Finelli et al. 2005) (Lavanchy 2011)

Apesar das falhas que possam existir ao nível dos dados epidemiológicos disponíveis, estima-se que existam 130 a 170 milhões de casos de infecção crónica pelo VHC por todo o mundo, sendo infectadas, por ano, cerca de 3 a 4 milhões de pessoas. Adicionalmente, mais de 350 000 pessoas morrerão por ano, devido a doenças relacionadas com a infecção pelo HCV.

Na Europa, calcula-se que aproximadamente 9 milhões de pessoas estejam infectadas com o VHC (WHO). De acordo com um estudo de revisão dos vários dados disponíveis até 2010 (Lavanchy 2011), a incidência de casos nos países da União Europeia será cerca de 1,1-1,3%, enquanto nos EUA rondará os 1-2%. No entanto, em certos países, podem registar-se taxas de

infecção bastante elevadas. A título de exemplo, cite-se o Egipto, o Paquistão e a China, onde, respectivamente, 22%, 4,8% e 3,2 % da população estará infectada. (WHO)

Em Portugal, e tal como foi referido recentemente num artigo da Lusa (Lusa 2011), não há dados concretos sobre a prevalência das hepatites; no entanto, com base em projecções da Organização Mundial de Saúde, estimam-se 170 mil portadores de hepatite C (cerca de 1-2%).

3. Formas crónica e aguda da doença

A hepatite C apresenta-se, clinicamente, de duas formas – aguda e crónica. A primeira caracteriza-se pela presença de sinais clínicos ou sintomas de hepatite até um período de cerca de 6 meses após o presumível tempo de exposição ao VHC (Blackard, Shata et al. 2008). Estes pacientes apresentam, normalmente, icterícia, fadiga, náuseas e níveis elevados de Alanina Aminotransferases (ALT) no soro. ((NIH) 2010) No entanto, apenas cerca de 20 % dos casos referentes à forma aguda da doença apresentam uma resolução espontânea da virémia, o que parece ocorrer com maior probabilidade em indivíduos jovens, do género feminino, caucasianos e/ou com baixos níveis de virémia. Já a forma crónica da doença, corresponde à maioria dos casos de hepatite C, cerca de 70 – 80 %. Caracteriza-se pela persistência de replicação viral, na presença de resposta imune, com detecção de RNA viral no soro ou no tecido hepático. (Blackard, Shata et al. 2008) Os pacientes com hepatite C crónica não manifestam, em grande parte dos casos, sintomas clínicos de doença hepática. Quando estes estão presentes são, normalmente, inespecíficos e intermitentes, e podem incluir fadiga, desconforto no quadrante superior direito abdominal, náuseas, falta de apetite, bem como dores musculares e nas articulações. ((NIH) 2010) Cerca de 15 – 20 % dos doentes desenvolvem cirrose num período de 10 – 30 anos, sendo que 1 a 5 %, por ano, destes pacientes, desenvolve hepatocarcinoma. (de Bruijne, Weegink et al. 2009)

4. Transmissão

A transmissão do VHC ocorre, essencialmente, através da exposição percutânea a sangue, ou produtos derivados de plasma, contaminados. (Ahad 2008) De acordo com dados disponibilizados pela WHO, o risco de contrair a infecção pelo VHC encontra-se associado a vários factores de risco, tais como, transfusões sanguíneas e transplante de órgãos (sem o

devido rastreio); casos de hemodiálise; consumo de drogas injectáveis, com partilha de seringas; exposição a material médico não esterilizado; exposição ao sangue; tratamentos de acupunctura, ou elaboração de tatuagens sem os devidos cuidados de esterilização de material; profissões relacionadas com a prestação de cuidados de saúde; comportamentos sexuais de risco, grávidas infectadas, e contacto domiciliário com pessoas infectadas (embora estes últimos com um menor risco associado).

Durante a segunda metade do século XX, o número de casos de infecção pelo VHC aumentou consideravelmente, nomeadamente, devido à transmissão através de sangue ou de produtos derivados, relacionada com práticas médicas inseguras. Actualmente, nos países desenvolvidos, a principal causa de transmissão prende-se com a partilha de agulhas entre consumidores de drogas injectáveis, enquanto nos países menos desenvolvidos, existe também uma preocupação acrescida com a falta de cuidados na manipulação de material injectável e/ou cortante, no que concerne aos serviços de saúde e de comunidade. (Dore, MacDonald et al. 2003) (Shepard, Finelli et al. 2005) (Averhoff, Glass et al. 2012)

Embora a transmissão possa também ocorrer sexualmente, ou de mãe para filho, estes dois últimos casos não são frequentes. A possibilidade de transmissão sexual é suportada por evidências de isolamento de RNA viral a partir de sémen e de esfregaço cervical. (Leruez-Ville, Kunstmann et al. 2000) (Manavi, Watkins-Riedel et al. 1999) (Tohme and Holmberg 2010) A via sexual é considerada pouco eficiente; no entanto, a actividade sexual com múltiplos parceiros, ou com um parceiro infectado, é considerada um factor de risco (Alter, Coleman et al. 1989) (Shepard, Finelli et al. 2005), sendo que, práticas resultantes em trauma e ulceração de mucosas podem constituir igualmente um factor a ter em conta. (Tohme and Holmberg 2010) A transmissão vertical, de mães para filhos, situa-se entre os 2-6%. No entanto, o risco aumenta no caso de as pacientes grávidas estarem co-infectadas com VIH, provavelmente, devido a um aumento dos níveis de VHC circulantes, causado por um efeito de imunossupressão. (Hayashida, Inaba et al. 2007) (Hurtado, Golden-Mason et al. 2010)

São várias as actividades humanas que envolvem comportamentos de risco, tais como procedimentos cosméticos, religiosos ou culturais. (Shepard, Finelli et al. 2005) Contudo, em aproximadamente 20 % das pessoas infectadas, a causa de transmissão é desconhecida. (Pondé 2011)

II. Vírus da Hepatite C

1. Características gerais

O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviridae* e ao género *Hepacivirus*. (Kupfer 2012) Constitui uma partícula aproximadamente esférica, com cerca de 60 nm de diâmetro, que possui um envelope lipídico, muito provavelmente, de origem membranar, e uma nucleocápside. (Gastaminza, Dryden et al. 2010) O seu material genómico é constituído por uma cadeia de RNA simples e de polaridade positiva (+). (Kupfer 2012) A nucleocápside é constituída pelas proteínas do core, sendo que, no envelope, se destacam as proteínas E1 e E2, que formam tetrameros (ou dímeros de heterodímeros), (Yu, Qiao et al. 2007; Blackard, Shata et al. 2008) (Kupfer 2012) muito importantes no reconhecimento de receptores ao nível da célula hospedeira. (Drummer, Maerz et al. 2003) (Ashfaq, Javed et al. 2011) O VHC possui uma capacidade replicativa de cerca de 10^{12} viriões por dia. (Neumann, Lam et al. 1998) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

2. Genótipos e quasispecies

Geralmente, o VHC divide-se em seis genótipos principais, que podem ser subdivididos em vários subtipos, de A a L (Simmonds, Bukh et al. 2005) (Sillanpaa, Melen et al. 2009), que constituem grupos muito próximos genética e epidemiologicamente. Os genótipos diferem entre si, em aproximadamente 31 a 33 % ao nível nucleotídico, sendo esta diferença de 20 a 25 % no caso dos subtipos. (Simmonds, Bukh et al. 2005)

De acordo com as estatísticas, os genótipos 1, 2 e 3 e os seus subtipos apresentam uma distribuição global, sendo que o genótipo 4 prevalece na África Oriental /Médio Oriente, o genótipo 5 na África do Sul, surgindo no Sudeste Asiático o genótipo 6. (Simmonds 2001) (Nguyen and Keeffe 2005) (Sillanpaa, Melen et al. 2009) Em Portugal, os genótipos mais frequentes são o 1b e o 3a. Nomeadamente, o genótipo 1b é responsável por cerca de metade dos casos de hepatite C, afectando o maior número de pessoas que foram infectadas por transfusão sanguínea. Já o genótipo 3a afecta principalmente os toxicodependentes intravenosos. Nos últimos anos tem-se assistido a um aumento da frequência do genótipo 4. (Roche) No entanto, a epidemiologia do VHC encontra-se em constante mudança, como consequência, por exemplo, dos movimentos migratórios, e do consumo intravenoso de

drogas, o que se pode observar, por exemplo, na Europa, onde a prevalência do genótipo 4 tem aumentado nos últimos anos. (Esteban, Sauleta et al. 2008) (Sillanpaa, Melen et al. 2009) Para além dos diferentes genótipos e subtipos do VHC, a variabilidade ocorre ainda ao nível individual, mediante a existência de quasispecies, ou seja, de populações de variantes virais distintas mas estreitamente relacionadas, pertencentes a um único indivíduo. As mutações virais ocorrem ao longo do tempo, espontaneamente, em resposta à pressão do sistema imunitário. (Simmonds 2004)

3. Organização do genoma e das proteínas virais

O genoma viral é constituído por uma cadeia única de RNA, de polaridade positiva (+), com cerca de 9.6 kb. (Choo, Kuo et al. 1989) (Bittar, Jardim et al. 2010) Tal como em muitos outros vírus de constituição genómica semelhante, esta molécula de RNA serve de RNA mensageiro (mRNA) para a tradução das proteínas virais. (Kupfer 2012) Como tal, a estrutura da molécula de RNA possui uma região em cadeia simples, que constitui a pauta de leitura – ORF (*Open Reading Frame*), onde se encontra a informação codificante de uma poliproteína precursora, com aproximadamente 3000 aminoácidos. (Bartenschlager, Frese et al. 2004) (Dalagiorgou, Vassilaki et al. 2011) Esta é posteriormente processada por proteinases virais e hospedeiras, de forma a originar 10 proteínas virais, de entre as quais se podem distinguir as proteínas estruturais, a enumerar, a proteína core e as proteínas transmembranares, E1, E2 e p7; e as não-estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. (Choo, Kuo et al. 1989) (Bittar, Jardim et al. 2010) (Figura 1.) É ainda conhecida a existência de uma proteína de função desconhecida, resultante de um desvio ribossomal, aquando da tradução, nos na região codificante da proteína core (primeira proteína na pauta de leitura). (Walewski, Keller et al. 2001) Esta nova proteína é conhecida como ARFP (*Alternative Reading Frame Protein*), proteína F (*Frameshift Protein*), ou core + 1 (indicação da localização da pauta de leitura alternativa). (Walewski, Keller et al. 2001) (Xu, Choi et al. 2001) (Dalagiorgou, Vassilaki et al. 2011)

4. Ciclo de vida

4.1. Entrada na célula hospedeira

O ciclo de vida do VHC inicia-se com a ligação à célula hospedeira e subsequente internalização. Os mecanismos por detrás destes processos são, contudo, complexos, carecendo ainda de investigação. O processo de ligação do VHC à membrana parece iniciar-se com a interacção entre as glicoproteínas virais e os glicosaminoglicanos presentes à superfície da célula. (Germi, Crance et al. 2002) Este passo ocorrerá de forma simultânea à interacção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL – *Low-Density Lipoproteins*) com os receptores LDL-R (LDL-Receptor), uma vez que se admite a associação de LDLs às partículas virais. (Dubuisson, Helle et al. 2008) O passo seguinte caracteriza-se por consecutivas interacções entre o receptor scavenger B tipo I (SR-BI) e a tetraspanina CD281. (Scarselli, Ansuini et al. 2002) (Pileri, Uematsu et al. 1998). Mostrou-se que estes receptores interagem com a glicoproteína E2. A CD81 é composta por quatro sequências transmembranares, um pequeno *loop* extracelular, e um grande *loop* extracelular (LEL – *Large Extracellular Loop*) que contém um motivo CCG conservado, envolvido na formação de pontes dissulfeto. O domínio LEL é a região crítica para a interacção com a proteína E2 do envelope. (Flint et al. 2006). O receptor SR-BI contém dois pequenos domínios citoplasmáticos, duas sequências transmembranares e um grande *loop* extracelular altamente glicosilado. (Connelly and Williams 2004) (Dubuisson, Helle et al. 2008) No entanto, no caso deste último, sendo SR-BI um receptor multiligante, funciona também como receptor para as LDLs. (Connelly and Williams 2004) Está ainda por determinar qual destas interacções tem um maior peso no processo de entrada celular do VHC. (Dubuisson, Helle et al. 2008) Evidências mais recentes indicam que ocorre uma subsequente transferência do vírus para as *tight junctions* (TJ), um complexo proteico localizado entre hepatócitos adjacentes. Foi visto que dois componentes das TJ, a claudina-1 (CLDN1) e a ocludina (OCLN) desempenham um papel importante nos passos a jusante do processo de entrada do vírus, provavelmente após a ligação e interacção com CD81. (Evans, von Hahn et al. 2007) (Benedicto, Molina-Jimenez et al. 2009) (Furuse and Tsukita 2006) As claudinas são pequenas proteínas que contêm dois *loops* extracelulares, três domínios intracelulares, e quatro sequências transmembranares. (Furuse and Tsukita 2006) . No primeiro *loop* extracelular da claudina foram identificados os resíduos envolvidos na entrada do VHC. (Dubuisson, Helle et al. 2008) A internalização do vírus dá-se por endocitose mediada por clatrina (Blanchard, Belouzard et al. 2006) (Dubuisson, Helle et al. 2008), ocorrendo a fusão nos endossomas primários. O pH ácido dos endossomas levará a alterações conformacionais

nas proteínas do envelope, o que resultará num processo de fusão membranar. (Meertens, Bertaux et al. 2006) (Dubuisson, Helle et al. 2008)

Outras moléculas foram propostas como receptores, ou co-receptores putativos para o VHC, tais como as lectinas ligantes de manose DC-SIGN e L-SIGN, embora a sua contribuição para a entrada celular do VHC seja ainda pouco conhecida. (Helle and Dubuisson 2008) (Barth, Liang et al. 2006) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

Após o processo de fusão membranar, ocorre a descapsidação, processo pelo qual o RNA viral é libertado a partir do interior da nucleocápside, no citosol. Este é, no entanto, um processo ainda pouco conhecido. (Pawlotsky, Chevaliez et al. 2007)

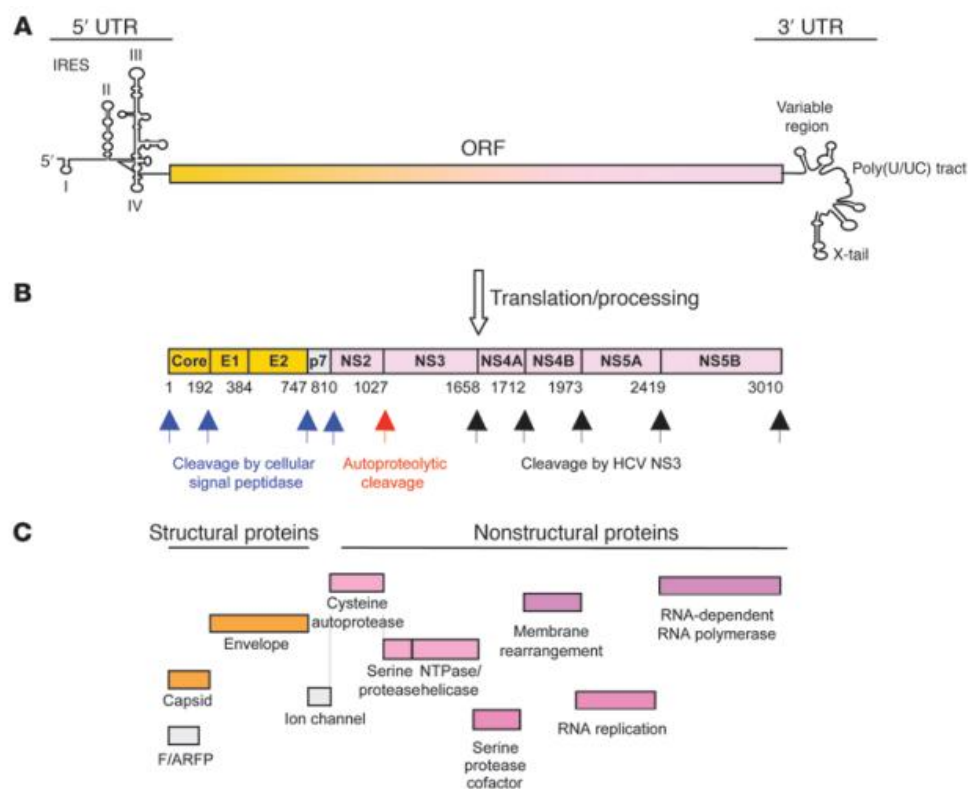


Figura 1. Organização do genoma do VHC e a poli-proteína precursora das proteínas virais. (Rehermann 2009)

(A) A cadeia simples de RNA viral codifica uma longa pauta de leitura (*Open Reading Frame* – ORF), flanqueada por duas regiões não codificantes, 5'UTR e 3'UTR (*Untranslated Region* – UTR), que contêm sinais para a síntese da proteína viral e de RNA, bem como da coordenação de ambos os processos. A tradução é iniciada através do local interno de ligação ao ribossoma (*Internal Ribosomal Entry Site* – IRES), na região 5'UTR. U, uridina; C, citidina. (B) A poli-proteína é processada por proteases celulares e virais. Os números abaixo da proteína indicam as posições dos aminoácidos nos locais de clivagem. (C) Funções das 10 proteínas não estruturais e virais resultantes. Uma proteína F (*frameshift*) é traduzida a partir de uma pequena região de leitura alternativa (*alternate reading frame* – ARF).

4.2. Replicação

Uma vez que ocorre a descapsidação, são libertadas, para o citoplasma moléculas de RNA genómico de cadeia única (+) no citoplasma, que são usadas para os processos, quer de tradução, quer de replicação, no citoplasma. (Ashfaq, Javed et al. 2011) Embora os mecanismos responsáveis pelo processo de replicação do genoma do VHC não sejam totalmente conhecidos, pensa-se, por analogia com outros vírus de RNA de cadeia única (+), que a replicação seja semi-conservativa e assimétrica, envolvendo dois passos, catalizados pela proteína viral NS5B, uma RNA polimerase dependente de RNA. Em primeiro lugar, a cadeia positiva de RNA (+) será usada para a síntese de uma molécula de RNA intermediária, de polaridade negativa (-). Num segundo passo, a cadeia de RNA (-) servirá de molde para a produção de numerosas cadeias de RNA (-). A produção de moléculas de RNA (+) é cerca de 10 vezes maior, relativamente à produção de moléculas de RNA (-). (Bartenschlager, Frese et al. 2004) A replicação ocorre na *membranous web*, uma estrutura derivada das membranas do retículo endoplasmático, e que é formada por pequenas vesículas embebidas numa matriz membranosa, à qual se encontram associadas proteínas celulares e proteínas não estruturais do vírus, que formam o complexo de replicação. (Egger, Wolk et al. 2002) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Os rearranjos das membranas celulares, resultantes da infecção por vírus de RNA (+), são um pré-requisito necessário à formação da *membranous web*. Adicionalmente, a proteína NS4B parece ser suficiente para induzir a formação desta estrutura, recrutando proteínas celulares responsáveis pela formação de vesícula, ou induzindo ela própria o processo. (Egger, Wolk et al. 2002) (Gretton, Taylor et al. 2005)

4.3. Tradução

As moléculas de RNA genómico de cadeia única (+) no citoplasma, presentes no citoplasma após a descapsidação, juntamente com as novas moléculas de RNA sintetizadas, funcionam como RNA mensageiro para a síntese da poliproteína do VHC. A tradução do genoma do VHC ocorre no retículo endoplasmático rugoso (Ashfaq, Javed et al. 2011) (El-Hage and Luo 2003) (Gosert, Egger et al. 2003), sob o controlo do IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*), região genómica do VHC que compreende domínios de II a IV da 5'UTR, abrangendo os primeiros nucleótidos da região codificante do core. O domínio I da 5'UTR não faz parte do IRES; no entanto, desempenha um papel importante na modulação da tradução dependente de IRES. (Friebe, Lohmann et al. 2001); (Luo, Xin et al. 2003) O IRES medeia a iniciação de um

processo de tradução independente de cap, ao contrário do que se sucede com a tradução de outras moléculas de RNA celular, para a qual é necessária a ligação de cap à maquinaria ribossomal. (Ashfaq, Javed et al. 2011) O processo mediado por IRES ocorre através do recrutamento, de proteínas quer celulares, tais como os factores de iniciação (eIF) 2 e 3, quer virais. (Ji, Fraser et al. 2004); (Otto and Puglisi 2004) O IRES possui a capacidade de formar um complexo de pré-iniciação estável, através da ligação directa à subunidade 40S ribossomal, sem a necessidade de factores canónicos de iniciação da tradução (Otto, Lukavsky et al. 2002) (Spahn, Kieft et al. 2001) A subunidade 40S associa-se com o eIF3, e o complexo ternário então formado junta-se ao eIF2, ao GTP, e ao tRNA iniciador, formando o complexo 48S. Na partícula 48S, o tRNA é posicionado na posição P da subunidade 40S, emparelhado com o codão de iniciação do mRNA. Após a hidrólise do GTP, o eIF2 liberta o tRNA iniciador e dissocia-se do complexo. Um segundo passo de hidrólise de GTP, que envolve o factor de iniciação eIF5B, permite a associação da subunidade 60S ao complexo, formando o ribossoma 80S funcional, que inicia a síntese das proteínas virais.

Algumas proteínas virais parecem estar relacionadas com a eficiência traducional do IRES, tais como a proteína core e as proteínas não estruturais NS4A e NS5B. Adicionalmente, a região 3'UTR do VHC poderá igualmente modular a tradução dependente de IRES, embora haja ainda alguma controvérsia relativamente a esta questão. (Ji, Fraser et al. 2004) (Kieft, Zhou et al. 2001) (Otto and Puglisi 2004)

4.4. Modificações pós-traducionais e montagem viral

A poliproteína precursora do VHC gerada após a tradução encontra-se sinalizada para a membrana do retículo endoplasmático, ocorrendo a translocação do ectodomínio E1 para o lúmen do retículo endoplasmático, num processo mediado pela sequência sinal interna, localizada entre as sequências do core e da proteína E1 (E1SS – E1 *Signal Sequence*). A clivagem da sequência sinal, por peptidases celulares, origina uma forma imatura da proteína core (P23). (McLauchlan, Lemberg et al. 2002) O péptido sinal é posteriormente processado pela peptidase celular SPP (proteína residente na membrana do retículo endoplasmático), facto que resulta na libertação da forma madura da proteína core (P21) para a face citoplasmática do ER. (Fig. 3) Esta peptidase sinal celular assegura também a clivagem no ponto de junção E1-E2, no lúmen do ER. Outras peptidases celulares levam a cabo a clivagem no terminal carboxílico no final da E2, e entre a p7 e a NS2. As proteínas E1 e E2 sofrem, posteriormente, vários passos de maturação, incluindo N-glicosilação, bem como conformação

e montagem dos heterodímeros E1-E2. (Penin, Dubuisson et al. 2004) A auto-protease dependente de zinco NS2-3 assegura a clivagem *cis*, que separa a NS2 da NS3. A NS3, associada à NS4A, que funciona como co-factor, promove a clivagem *cis* no ponto NS3-NS4A, bem como a clivagem *trans* nos restantes pontos de junção, incluindo NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, e NS5A-NS5B. Os locais de clivagem reconhecidos pela protease NS3-NS4A possuem em comum a sequência Asp/GluXXXXCys/Thr-Ser/Ala, ocorrendo as clivagens *trans* a jusante do resíduo de cisteína, e a clivagem *cis* a jusante do resíduo de treonina. (Bartenschlager and Lohmann 2000) (Lindenbach and Rice 2005) Quanto à montagem viral e à libertação de novos viriões, ainda pouco se sabe. No entanto, a encapsidação do genoma parece ocorrer no retículo endoplasmático, pelo que se pensa que as proteínas core multimerizam e encapsidam o RNA viral na face citoplasmática do ER. A libertação de novos viriões no espaço pericelular ocorrerá através da via secretora. (Bartenschlager and Lohmann 2000) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

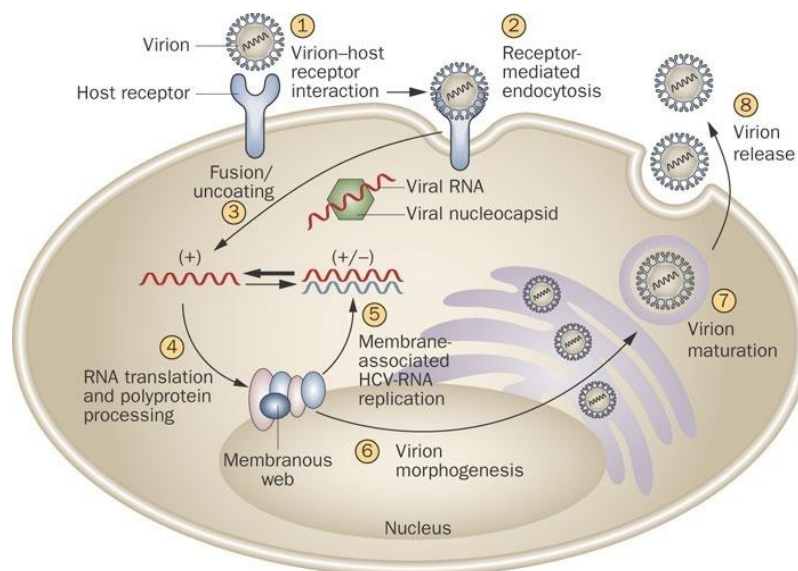


Figura 2. Esquema representativo do ciclo de vida do VHC. (Pereira and Jacobson 2009)

Viriões de VHC extracelulares interagem com moléculas receptoras à superfície da célula (1) e entram na célula por um processo de endocitose mediada por receptores (2). Após a fusão mediada por glicoproteínas do VHC, a nucleocápside do viriões (que contém o RNA viral) é libertada no citoplasma (3). O RNA genómico é traduzido, de forma a gerar uma poliproteína, posteriormente processada em 10 proteínas virais maduras. O retículo endoplasmático é modificado por factores celulares e virais, de forma a gerar uma estrutura membranar, *membranous web*, que constitui o principal local de amplificação do RNA viral (4). Finda a tradução, ocorre a replicação do RNA viral, através da síntese de cadeias positivas, a partir de intermediários replicativos de cadeia negativa (5). Parte do RNA sintetizado é empacotado nos nucleocápsídeos e associado com glicoproteínas virais, um processo que ocorre em associação com o retículo endoplasmático (6) e envolve a via secretora, através da qual ocorre a maturação dos viriões (7). Os viriões maduros são, então, libertados, completando o ciclo de vida (8).

5. Tropismo viral

A partir do momento que o vírus se dissemina num organismo, a sua distribuição entre e dentro dos tecidos do hospedeiro torna-se um factor determinante da sua patogénese. No entanto, a distribuição do vírus pelos tecidos é um processo dinâmico determinado diversos factores, que incluem a velocidade de replicação viral, a presença de receptores virais específicos, a taxa de mutação viral, a susceptibilidade hospedeira e genes de resistência, e a imunidade inata e adaptativa. (Bernard N. Fields 2007) O VHC é considerado um vírus hepatotrópico, pelo que os hepatócitos são os seus principais alvos. (Brian W. J. Mahy 2010) É sabido que os receptores celulares CD81, SR-B1, CLDN1, e OCLN, desempenham um papel fundamental na entrada do VHC (Ploss, Evans et al. 2009) (Scarselli, Ansuini et al. 2002) (Zeisel, Koutsoudakis et al. 2007) e, conseqüentemente, no seu tropismo celular (Shiffman 2011). Há evidências de que estes receptores se encontram expressos numa variedade de tecidos, apresentando, contudo, uma expressão mais elevada ao nível do fígado (Su, Wiltshire et al. 2004) (Fletcher, Yang et al. 2010) A co-expressão, os níveis de expressão e a exacta localização celular destes receptores, parecem ser factores determinantes na adsorção e entrada celular do VHC. (Reynolds, Harris et al. 2008) Nos últimos anos, foram identificados também vários factores de restrição envolvidos na protecção das células contra as infecções virais, tais como o EW1- 2wint. (Goff 2004) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Esta molécula é uma proteína associada ao CD81, que é capaz de inibir a entrada a entrada celular do VHC, bloqueando a interacção entre as glicoproteínas do envelope viral e o CD81. O EW1- 2wint poderá ainda interferir na polimerização de actina durante a entrada viral, ou bloquear as vias de sinalização necessárias para o processo. (Rocha-Perugini, Montpellier et al. 2008) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Foi mostrado que a molécula em questão é expressa em diferentes linhas celulares, apresentando-se, contudo, ausente em hepatócitos. Estes factores levam a crer que, não só a presença de receptores específicos, mas também a ausência de determinados inibidores poderá contribuir para o hepatotropismo do VHC. (Dubuisson, Helle et al. 2008)

Apesar de o VHC ser principalmente hepatotrópico, foi evidenciada a detecção de RNA viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), embora não se saiba ainda ao certo se ocorre replicação viral ao nível destas células. (Dustin and Rice 2007) (Fletcher, Yang et al. 2010) Foi igualmente detectado RNA viral em fluido cérebro-espinal, e no cérebro de pacientes com anomalias neuropatológicas. (Morgello 2005) (Weissenborn, Tryc et al. 2009) (Fletcher, Yang et al. 2010). Embora existam ainda muitas dificuldades, no que concerne à obtenção de sistemas eficazes para o estudo do processo de replicação do VHC, este parece não estar confinado apenas a células hepáticas,

tendo-se observado a ocorrência de replicação em linhas de células não hepáticas como, por exemplo, por exemplo, em células 293, derivadas de rim embrionário humano. (Zhu, Guo et al. 2003) (Ali, Pellerin et al. 2004)

6. Regiões 5'UTR e 3'UTR

Apesar de o RNA do VHC apresentar um elevado grau de variabilidade, como resultado da elevada taxa mutacional verificada durante a replicação, a região 5'UTR e a extremidade da 3'UTR são as zonas mais conservadas do genoma do VHC, em termos quer de sequência primária, quer de estrutura secundária. (Choo, Richman et al. 1991) (Miller and Purcell 1990) Logo, estas regiões desempenharam, à partida, importantes papéis nos processos de tradução viral e / ou replicação.

6.1. Região 5'UTR

A região 5'UTR (*Untranslated Region*) possui 341 nucleótidos, observando-se um grau de conservação superior a 90 % entre as sequências dos diferentes genótipos do VHC. (Bukh, Purcell et al. 1992) As estruturas secundária e terciária desta região são, de igual modo, altamente conservadas. (Honda, Brown et al. 1996) (Honda, Beard et al. 1999) Com base em diversos estudos de análise da região genómica em questão, foram identificados quatro domínios principais (domínios I-IV). (Honda, Brown et al. 1996) (Smith, Mellor et al. 1995) Apesar de o papel directo da região 5'UTR na replicação ser ainda pouco conhecido, sabe-se que os primeiros 125 nucleótidos que constituem os domínios I e II, são essenciais para a replicação do RNA viral. (Friebe, Lohmann et al. 2001) No entanto, o domínio I, que compreende os primeiros 40 nucleótidos da 5'UTR, não é essencial para a tradução; já o mesmo não ocorre com o domínio II, que faz parte do IRES. O IRES, que abrange os domínios II a IV da 5'UTR e os primeiros nucleótidos da região codificante do core, medeia a tradução independente de cap da ORF do VHC. (Brown, Zhang et al. 1992) (Friebe, Lohmann et al. 2001) O domínio II é um *stem* com vários *loops* internos. O domínio IV constitui um pequeno *hairpin* que inclui o códon de iniciação AUG. O domínio III contém, na sua zona basal, um *pseudoknot*, que une os domínios II e III, e encontra-se emparelhado directamente com a sequência a jusante do domínio IV. (Otto and Puglisi 2004) (El Awady, Azzazy et al. 2009) Os domínios II e III são relativamente mais complexos do que o domínio IV, contendo múltiplos *stems* e *loops*. (Honda, Beard et al. 1999) O segmento correspondente ao domínio III é altamente conservado

ao nível da sequência nucleotídica primária, bem como ao nível da estrutura secundária e terciária. A parte basal do domínio III, incluindo principalmente o *pseudoknot* e o *stem loop* d, inclui os elementos de estrutura secundária que determinam a ligação do IRES à subunidade 40S. Adicionalmente, pensa-se que a região basal do domínio III seja necessária para um correcto posicionamento do codão de iniciação no centro descodificante da subunidade 40S. (Otto and Puglisi 2004) (El Awady, Azzazy et al. 2009) A parte apical do domínio III liga-se ao factor eIF3, sendo necessária para a ligação entre a subunidade 40S e o eIF3. (El Awady, Azzazy et al. 2009)

6.2. Região 3'UTR

A 3'UTR do VHC possui cerca de 200 a 235 nucleótidos, que consistem, tipicamente, em três regiões distintas, enumerando na direcção 5' – 3', uma região variável, uma extensão poli (U/UC), e uma região X com 98 nucleótidos altamente conservada. (Blight and Rice 1997) (Tanaka, Kato et al. 1996) A região variável encontra-se imediatamente a seguir ao codão de finalização de tradução da poliproteína, e é variável ao nível da composição e comprimento da sequência (de 27 a 70 nucleótidos). (Kolykhalov, Feinstone et al. 1996) (Yanagi, Purcell et al. 1997) Através de análise computacional foi possível identificar duas possíveis estruturas em *loop* na região variável, estendendo-se o primeiro *stem-loop* para a região 3' da sequência codificante da proteína NS5B. (Han and Houghton 1992) (Kolykhalov, Feinstone et al. 1996) O tracto poli (U/C) consiste numa extensão poli (U) e numa região C(U)_n, definida como região transicional, que varia muito em comprimento, mas pouco em termos de sequência. (Tanaka, Kato et al. 1996) O comprimento desta região parece estar relacionado com a capacidade de replicação. (Friebe and Bartenschlager 2002) (Yi and Lemon 2003) A região X forma 3 estruturas em *stem-loop* estáveis, que se encontram altamente conservadas ao longo dos génotipos. (Blight and Rice 1997) (Kolykhalov, Feinstone et al. 1996)

Não se observa a existência de uma sequência poli-A na 3'UTR; no entanto, encontra-se envolvida, e principalmente a região X, num processo de regulação da tradução, de um modo em muito semelhante ao que ocorre com a sequência poli(A) nos mRNAs de outros vírus de RNA.

Foi observado que as sequências 3'UTR desempenham um papel essencial na replicação do RNA do VHC. (Friebe and Bartenschlager 2002) (Yi and Lemon 2003) De acordo com vários estudos, a região X interage, com a RNA polimerase NS5B. (Cheng, Chang et al. 1999) (Oh, Sheu et al. 2000) No entanto, esta região é também necessária para uma tradução eficiente. (Ito, Tahara et al. 1998) O tracto poli (U/C) é também um factor importante para a replicação do

RNA. (Friebe and Bartenschlager 2002) Pensa-se que esta região poderá intervir na circularização do genoma viral, processo que se propôs ser importante para a eficiência da replicação noutros vírus flavivírus. (Khromykh, Meka et al. 2001) A sequência desta zona da 3'UTR liga-se a várias proteínas que medeiam a interacção RNA-RNA e / ou a ligação do complexo de replicação ao RNA.

7. Proteínas estruturais

7.1. Core

A proteína core é a primeira na sequência da poliproteína inicialmente formada, constituindo a nucleocápside do VHC. (Bukh, Purcell et al. 1994) (McLauchlan 2000) Podem distinguir-se duas formas da proteína core, imatura e madura. A primeira, designada por p23, contém 23 kDa; a segunda possui 21 kDa e é conhecida por p21. (Yasui, Wakita et al. 1998) A sua forma imatura contém 191 aa, e pode dividir-se em 3 domínios, com base na sua hidrofobicidade. (Bukh, Purcell et al. 1994) (McLauchlan 2000) O domínio I (aa 1 – 117) contém principalmente resíduos básicos, possuindo duas pequenas regiões hidrofóbicas. O domínio II (aa 118 – 174) contém menos resíduos básicos, e o seu C-terminal corresponde ao final da core p21 (forma madura da proteína core). O domínio III (aa 175 – 191) é altamente hidrofóbico, e actua como sequência sinal para a proteína E1 do envelope. (Bukh, Purcell et al. 1994) O domínio I permite a ligação da core ao RNA, ao nível dos aa 1 – 74. (Santolini, Migliaccio et al. 1994) Este domínio é extremamente hidrofílico, e as cargas positivas dos seus resíduos básicos interagirão com as cargas negativas do esqueleto de fosfato dos ácidos nucleicos, mediando a ligação ao RNA viral. (Fan, Yang et al. 1999) (Santolini, Migliaccio et al. 1994) De facto, este domínio parece ser responsável por mediar a montagem da cápside, interagindo com várias proteínas celulares. O domínio II, devido à sua hidrofobicidade, medeia as interacções entre os lípidos e as proteínas de membrana. Quanto ao domínio III, apesar de não se encontrar presente na forma madura da proteína, desempenha um papel importante na estabilidade do core, sendo que a sua clivagem poderá estar envolvida na associação da core a vias celulares que previnem a sua degradação. (Polyak, Klein et al. 2006)

7.2. Glicoproteínas do envelope viral

O VHC possui duas glicoproteínas no envelope, nomeadamente a E1 e a E2, que se caracterizam por um ectodomínio N-terminal altamente glicosilado e por uma região C-terminal hidrofóbica, que serve de âncora membranar. Após a sua síntese, estas proteínas associam-se, formando um heterodímero não covalente, sendo que os domínios transmembranar destas proteínas desempenham um papel essencial neste processo, bem como na localização subcelular do heterodímero formado. (Lavie, Goffard et al. 2006)

As proteínas E1 e E2 encontram-se altamente glicosiladas, sendo modificadas por N-glicosilação. Este processo ocorre através da transferência de um oligossacarídeo de um intermediário lipídico para um resíduo de Asn (Asparagina), na sequência consenso Asn-X-Thr/Ser da proteína, onde X representa um qualquer aminoácido excepto Pro. (Gavel and von Heijne 1990) A adição do glicano é catalizada pela enzima oligossacariltransferase. A E1 contém 4 a 5 glicanos no seu N-terminal, enquanto a E2 apresenta cerca de 11 locais de N-glicosilação (Drummer, Maerz et al. 2003) (Goffard, Callens et al. 2005) contudo, o número de locais de glicosilação é variável de acordo com o genótipo. A presença dos glicanos assume um papel importante na formação dos heterodímeros E1-E2, bem como nos processos de variação antigénica (Slater-Handshy, Droll et al. 2004) As glicoproteínas E1 e E2 são cruciais nos mecanismos de entrada do VHC na célula hospedeira. Evidências anteriores suportam que, durante este processo, a E1 funciona como subunidade fusogénica, e a E2 como ligando para os receptores membranares. (Drummer, Maerz et al. 2003) (Goffard, Callens et al. 2005) De facto, vários receptores membranares foram sugeridos como mediadores das interações entre o envelope do VHC e a célula hospedeira, tal como já foi anteriormente referido.

A E2 contém ainda duas regiões hipervariáveis (HVR), nomeadamente, a HVR1 e a HVR2, que se encontram sob constante pressão selectiva por mutação, provavelmente, por serem potenciais alvos para neutralização de anticorpos. (Boulestin, Sandres-Saune et al. 2002) (Polyak, McArdle et al. 1998)

7.3. Proteína p7

A proteína p7 é um polipéptido com 63 aminoácidos, localizada entre as sequências de E2 e NS2, na poliproteína precursora. (Griffin, Beales et al. 2003) (Ashfaq, Javed et al. 2011) A p7 localiza-se, inicialmente, ao nível do retículo endoplasmático, como proteína integral de membrana. (Carrere-Kremer, Montpellier-Pala et al. 2002) (Steinmann, Penin et al. 2007) Assim, observam-se dois domínios transmembranares (TMDs). (Griffin, Beales et al. 2003)

(Ashfaq, Javed et al. 2011), em forma de hélice, que se encontram conectados por um *loop* citoplasmático e orientados em direcção ao lúmen do ER. (Patargias, Zitzmann et al. 2006) (Carrere-Kremer, Montpellier-Pala et al. 2002) (Steinmann, Penin et al. 2007) Foi demonstrado que o TMD do C-terminal pode funcionar como sequência sinal, no processo de translocação da proteína NS2 para o lúmen do retículo endoplasmático. As proteínas p7 podem oligomerizar (Griffin, Beales et al. 2003) (Ashfaq, Javed et al. 2011) e formar canais iónicos, que permitem a passagem selectiva de iões (Griffin, Beales et al. 2003) (Premkumar, Wilson et al. 2004) (Steinmann, Penin et al. 2007), e que parecem desempenhar um papel essencial na infecção pelo VHC. A proteína p7 mostrou ser essencial nos processos de montagem viral e libertação de viriões infecciosos. (Steinmann, Penin et al. 2007) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

8. Proteínas não estruturais

8.1. NS2

A NS2 é uma proteína transmembranar que possui cerca de 21 – 23 kDa. O N-terminal desta proteína contém resíduos altamente hidrofóbicos, que formam três ou quatro hélices transmembranares que se inserem na membrana do retículo endoplasmático. Quanto à região C-terminal, esta localiza-se no citoplasma, e forma, juntamente com o domínio N-terminal da NS3, a protease NS2/NS3, que é responsável pela clivagem intramolecular entre a NS2 e a NS3, entre os aminoácidos 1026 e 1027. (Grakoui, McCourt et al. 1993) (Ashfaq, Javed et al. 2011) A proteína NS2 é essencial para que seja levado a cabo o ciclo de replicação viral. (Khromykh and Westaway 1997) (Pietschmann, Kaul et al. 2006) (Ashfaq, Javed et al. 2011),

8.2. NS3

A NS3 é uma proteína de 67 kDa, com actividade multifuncional. Os 180 aminoácidos N-terminais definem a sua actividade de protease serínica, enquanto os seus cerca de 450 aminoácidos C-terminais são responsáveis pelas suas actividades de NTPase/helicase, sendo subdivididos em três domínios. (Yao, Reichert et al. 1999)

A actividade catalítica atribuída ao domínio protease da NS3 deve-se à presença de três resíduos de aminoácidos (tríade catalítica), nomeadamente, His-1083, Asp-1107 e Ser-1165. (Bartenschlager, Ahlborn-Laake et al. 1994) (Grakoui, McCourt et al. 1993) A proteína NS4A

funciona como co-factor para actividade de protease serínica da NS3, constituindo, ambas as componentes proteicas, um dímero não covalente, designado por protease serínica NS3-4A. Esta é responsável pela clivagem de quatro locais na poliproteína, nomeadamente, entre NS3-4A, NS4A-4B, NS4B-5A e NS5A-5B, na poliproteína precursora. (Bartenschlager, Ahlborn-Laake et al. 1994) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

A actividade enzimática da NS3 NTPase/helicase é indispensável para a replicação do RNA viral. Foram atribuídas funções putativas a este complexo enzimático, tais como o desenrolamento dos intermediários de cadeia dupla do RNA, a eliminação das estruturas secundárias, ou a separação do genoma viral das proteínas às quais se encontrem ligadas. (Serebrov and Pyle 2004) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

8.3. NS4A

A NS4A é uma proteína com 54 aminoácidos. Como foi já referido, esta proteína actua como co-factor da proteína NS3, na sua vertente de protease serínica, sendo a interacção entre a NS4A e a NS3 mediada pelo C-terminal da NS4A. Esta interacção permite a activação do local activo da NS3. A porção N-terminal da NS4A é altamente hidrofóbica, e está envolvida na sinalização da proteína NS3 para o retículo endoplasmático (Wolk, Sansonno et al. 2000) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

De acordo com o que foi proposto, os últimos aminoácidos da NS4A formam uma hélice transmembranar, que serve de âncora para o complexo NS3/NS4A no ER. (Kim, Morgenstern et al. 1996) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

8.4. NS4B

A NS4B é uma pequena proteína com 27 kDa, que desempenha um importante papel no recrutamento de outras proteínas virais. Estudos de topologia permitiram identificar quatro domínios transmembranares. Os terminais amínico e carboxílico encontram-se, maioritariamente voltados para o lúmen do ER. (Lundin, Lindstrom et al. 2006) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

Estudos de microscopia electrónica evidenciaram alterações morfológicas induzidas pela NS4B, que resultam na formação da *membranous web*, que alberga o complexo de replicação. (Egger, Wolk et al. 2002) (Ashfaq, Javed et al. 2011) De facto, a NS4B é uma proteína integral de membrana, sendo sinalizada para o ER, e co-localizando-se com outras proteínas não estruturais na membrana do ER. (Hugle, Fehrmann et al. 2001) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

Adicionalmente, a NS4B interage com a NS4A e, desta forma, também com a NS3 e a NS4, de forma indirecta. (Lin, Wu et al. 1997) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

A NS4B possui uma hélice anfifática no seu terminal amínico, que se encontra conservada entre todos os isolados virais de VHC, sugerindo um papel crítico no processo de infecção. A sequência da NS4B revela ainda a presença de um motivo ligante de nucleótidos. Este, apresenta vários elementos conservados, de entre os quais, alguns que se encontram presentes em proteínas ligantes de GTP. Adicionalmente, a NS4B possui capacidade de ligação a GTP, e de hidrólise de nucleótidos, o que indica actividade de GTPase. (Einav, Elazar et al. 2004) No entanto, as possíveis implicações destes factores na replicação e capacidade de infecção do vírus carecem ainda de muita investigação.

8.5. NS5A

A NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica, que existe em diferentes estados de fosforilação, tendo-se observado duas formas da proteína, uma num estado de fosforilação basal, com 56 kDa, e uma hiperfosforilada, com 58 kDa, que se designam, respectivamente, por p56 e p58. (Kaneko, Tanji et al. 1994) (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004) Esta proteína pode organizar-se em três domínios, nomeadamente, domínio I (a.a. 1-213), domínio II (a.a. 250-302), e domínio III (a.a. 355-447) (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004), não possuindo domínios membranares. No entanto, o domínio I possui uma hélice anfifática N-terminal, que parece mediar a associação da NS5A à membrana. (Brass, Bieck et al. 2002) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

A NS5A desempenha um importante papel na replicação, sendo que a associação da NS5A com outras proteínas virais sugere a sua presença no complexo de replicação. (Neddermann, Clementi et al. 1999) Adicionalmente, as mutações presentes na NS5A mostraram ser essenciais para a replicação. (Lohmann, Korner et al. 1999) (Ashfaq, Javed et al. 2011) A capacidade da NS5A ligar ao RNA é observada ao longo de todos os genótipos do VHC testados até à data (Foster, Belyaeva et al. 2010) (Hwang, Huang et al. 2010), sendo que alguns estudos mostraram que a NS5A se pode ligar às regiões 5'UTR e 3'UTR do genoma do VHC. Tal facto levou a crer que a NS5A poderá ter uma função importante no *switch* entre a tradução e a replicação, durante o ciclo de vida do VHC. (Huang, Hwang et al. 2005) (Foster, Belyaeva et al. 2010)

A NS5A é uma metaloproteína de zinco. (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004) A análise estrutural desta proteína revelou a presença de um complexo de zinco, no N-terminal, que desempenha um importante papel na integridade estrutural da proteína. (Moradpour,

Brass et al. 2005) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Assim, a NS5A coordena um único átomo de zinco por molécula, através de um motivo proteico, com quatro resíduos de cisteína (C) essenciais, no domínio I, segundo a fórmula $CX_{17}CXCX_{20}C$. Este motivo encontra-se conservado entre *hepacivírus* e *pestivirus*. Alguns resultados indicaram que o zinco é necessário para a função da NS5A na replicação do VHC. (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004)

As funções da NS5A serão muito importantes ao nível da modulação da resposta imune mediada por IFN- α . O domínio II contém uma região da NS5A definida como *Interferon- α Sensitive Determining Region* (ISDR, a.a. 237-276). (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004) Esta região e 26 aminoácidos a jusante da região ISDR mostraram ser essenciais para a interacção com a proteinase cinase K dependente de RNA de cadeia dupla induzida por interferão (Gale, Korth et al. 1997) (Pawlotsky, Germanidis et al. 1998) (Tellinghuisen, Marcotrigiano et al. 2004) A NS5A poderá ter numerosas interacções com proteínas que afectam os processos de sinalização celular. Nomeadamente, esta proteína pode modular três vias MAPK principais, envolvidas na sinalização mitogénica da célula, que regula o crescimento e activação. Desta forma, a NS5A seria capaz de regular a sinalização celular por mecanismos pró e anti-apoptóticos. A NS5A poderá ainda interferir nas vias de espécies reactivas ao oxigénio (ROS) e de fosfatidilinositol 3- cinase, o que pode levar à transformação dos hepatócitos e à formação de hepatocarcinoma. (Macdonald, Crowder et al. 2004)

8.6. NS5B

A NS5B é uma proteína com 65 kDa. (Behrens, Tomei et al. 1996) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Quanto à sua organização estrutural, a NS5B possui uma “forma de mão direita”, sendo possível identificar domínios em forma de dedos, palma e polegar, que envolvem, no seu interior, um local activo. (Lesburg, Cable et al. 1999) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Os seus 21 aminoácidos C-terminais são altamente hidrofóbicos, e formam uma cauda, que permite a ancoragem da proteína à membrana. (Moradpour, Brass et al. 2004)

A NS5B desempenha um papel crucial na replicação do RNA do VHC. Possui actividade de RNA polimerase dependente de RNA, constituindo a subunidade catalítica do complexo de replicação. (Behrens, Tomei et al. 1996) (Ashfaq, Javed et al. 2011) Esta RNA polimerase dependente de RNA não possui actividade de *proofreading*, o que se reflecte numa taxa de erro de cerca de 10^{-4} mutações por genoma por ciclo de replicação. Disto resulta uma enorme heterogeneidade viral em cada paciente, responsável pela existência de quasispecies. (Mathy, Ma et al. 2008) Alguns estudos sugerem o envolvimento da cauda C-terminal da NS5B na síntese de RNA e na regulação do local activo. (Lohmann, Korner et al. 1997) (Ranjith-Kumar,

Gutshall et al. 2002) A análise da sua sequência permitiu também identificar um motivo aminoacídico GDD, que é essencial para a sua actividade de polimerase. (Yamashita, Kaneko et al. 1998) (Ashfaq, Javed et al. 2011) A síntese de RNA do VHC, embora possa ocorrer por um mecanismo dependente de primer, parece dar-se, preferencialmente, por um processo designado síntese *de novo*. (Bressanelli, Tomei et al. 2002) (Ferrari, Wright-Minogue et al. 1999) Este processo caracteriza-se pela não necessidade de um primer iniciador, sendo a primeira ligação fosfodiéster formada entre um nucleótido de iniciação, normalmente, uma purina trifosfato, e um segundo nucleosídeo trifosfato (NTP) (Paul, van Boom et al. 1998) (Ranjith-Kumar, Kim et al. 2002)

O processo de replicação ocorrerá, como foi anteriormente referido, numa estrutura denominada *membranous web*, na qual se encontrarão as proteínas intervenientes no processo de replicação, formando o complexo de replicação, do qual faz parte a NS5B. De facto, as proteínas não estruturais do VHC encontram-se co-localizadas com a NS5B na membrana do ER. (Behrens, Tomei et al. 1996) (Brass, Bieck et al. 2002) Adicionalmente, outros resultados sugerem que a NS5B se liga à NS3, sendo que a NS3 interage, por sua vez, com a NS4A e, possivelmente, com a NS4B e a NS5B. (Piccininni, Varaklioti et al. 2002) A NS5A pode interagir com as proteínas NS3, NS3, NS3A, NS4B e NS5B (Blight, Kolykhalov et al. 2000) (Krieger, Lohmann et al. 2001). A actividade da NS5B poderá ainda ser modulada pela NS5A. (Shirota, Luo et al. 2002)

III. Resposta imune ao VHC

1. Resposta imune inata

Em células *mammalian*, a primeira linha de resposta (resposta inata), contra a infecção viral, caracteriza-se por uma série de eventos, que geram um estado anti-viral na célula infectada. (Jr 2006) No caso da infecção pelo VHC, este início de resposta dá-se ao nível dos hepatócitos. (Gale 2003) Os processos são desencadeados por um conjunto de características físicas associadas aos vírus, designadas por assinaturas PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*), que são reconhecidas por proteínas receptoras específicas ao nível celular, ou receptores PAMP. (Pascu, Martus et al. 2004) No genoma do VHC, ao nível das regiões 5'UTR e 3'UTR, foram encontradas assinaturas PAMP específicas, nomeadamente, motivos de poliuridina, e regiões com estrutura de cadeia dupla (dsRNA) e de *stem loop*. (Tuplin, Wood et al. 2002) (Simmonds, Tuplin et al. 2004) Aquando da infecção, estas regiões são reconhecidas pelos receptores PAMP RIG-I (*Retinoic Acid inducible Gene 1*) e TLR3 (Alexander 2002)

(Yoneyama, Kikuchi et al. 2004). O TLR-3 interage com as regiões dsRNA nos endossomas, enquanto o RIG-I reconhece o motivo de poliuridina no citoplasma. Subsequentemente, o RIG-I e o TLR-3 recrutam, respectivamente, IPS-1 (*IFN- β promoter stimulator protein 1*) e TRIF (*Toll-IL-1- receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β*). Estes processos resultam na activação de NF- κ B, bem como das cinases IKK ϵ e TBK1 (*NF receptor-associated factor family member-associated NF- κ B activator-binding kinase-1*). As duas cinases referidas fosforilam moléculas de IRF-3, que dimerizam. Os dímeros de IRF-3 fosforilados e as moléculas de NF- κ B são translocados para o núcleo, actuando em sinergia na activação da transcrição do gene IFN- β . A produção de IFN- β resulta num sistema de sinalização autócrino e parácrino, resultando a ligação de IFN- β aos receptores celulares na activação da via Jak-STAT. As proteínas cinases Jak e Tyk1 encontram-se ligadas aos receptores IFN- α/β e, uma vez activadas, fosforilam as proteínas STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) 1 e 2, em resíduos de serina e treonina críticos para a activação das mesmas. Este processo resulta na formação de heterodímeros STAT1-STAT2, que se associam a IRF9, originando o complexo trimérico ISGF3, um factor de transcrição. Este é translocado para o núcleo, ligando-se a ao elemento de resposta estimulada por interferão (ISRE – *IFN-stimulated response element*), na região promotora de genes estimulados por interferão (ISG – *Interferon Stimulated Genes*). Da estimulação da transcrição de ISGs resulta a produção do sistema OAS1/RNase L, que degrada o RNA celular e viral; da *ADAR1* específica de RNA, que converte os resíduos de adenosina em inosina, nas estruturas dsRNA, mutando e destabilizando a estrutura secundária do RNA viral; de P56 e PKR, que inibem a tradução de RNA (viral e celular); e de IRF-7, que estimula a produção de vários tipos de IFN- α . [revisão (Rehermann 2009)] A produção de IFN- α resulta numa amplificação da resposta celular e no prolongamento da produção de IFN. Por outro lado, induz a maturação de células imunes efectoras, induzindo, indirectamente, a modulação da resposta imune adaptativa no combate à infecção viral. (Biron 1999)

2. Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa consiste, quer na resposta imunes humoral, através da produção de anticorpos neutralizantes pelas células B, quer pela resposta imune celular, pela acção de células T auxiliares CD4+ (Th – *T helper*) e de células T citotóxicas CD8+ (CTLs – *Cytotoxic T Lymphocytes*). (Ashfaq, Javed et al. 2011)

Relativamente ao primeiro caso, e no que diz respeito ao VHC, é possível detectar anticorpos específicos ao VHC, 7 a 8 semanas após a infecção (Pawlotsky 1999) No entanto,

não se sabe ainda ao certo se estes anticorpos neutralizam a infectividade do VHC. [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

Já a resposta imune celular desempenha um importante papel na resolução viral. (Thimme, Oldach et al. 2001) (Diepolder, Zachoval et al. 1996) [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)] As células TCD4⁺ efectoras podem formar duas subpopulações, Th1 e Th2. A primeira (Th1) é responsável por muitas funções da imunidade mediada por células, tais como a activação de CTLs, encontrando-se também associada com a promoção excessiva de inflamação; a segunda (Th2) encontra-se principalmente relacionada com a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos. As subpopulações que se distinguem pelo perfil das citocinas que produzem. As células Th1 secretam citocinas como IL-2, IFN- γ , e TNF. Já as Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e as suas funções são muito importantes ao nível da activação de células B e, como tal, da resposta humoral. Normalmente, a resposta Th1 exerce um efeito negativo na regulação de Th2, e vice-versa. (Kuby 2003) A resposta Th1 parece ser um factor extremamente importante na protecção contra a infecção pelo VHC. (Diepolder, Zachoval et al. 1995) (Wan, Kung et al. 2009) As células TCD4⁺ reconhecem antigénios apresentados por moléculas MHC II presentes na superfície de células apresentadoras de antigénios (APCs – *Antigen Presenting Cells*), e desempenham múltiplas funções efectoras, incluindo a activação directa de macrófagos e de células B específicas de antigénios, bem como de células TCD8⁺. As células TCD8⁺ reconhecem antigénios apresentados por moléculas MHC I presentes na superfície de células infectadas, exercendo diferentes funções, quer causando a morte das células infectadas através da produção de granzima e perforina, quer inibindo a replicação viral sem causar morte celular, pela secreção de citocinas como, IFN- γ e TNF- α . (Guidotti and Chisari 2001) [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

3. Interacção entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa

Como já foi anteriormente referido, a produção de IFN- α resulta na modulação indirecta da resposta imune adaptativa, uma vez que induz a maturação de células apresentadoras de antigénios, resultando na produção de outras citocinas inflamatórias por células hepáticas residentes. (Biron 1999) O IFN- α influencia a maturação de células dendríticas, modulando a apresentação de antigénios por parte das mesmas (Colonna, Trinchieri et al. 2004) (Barth, Ulsenheimer et al. 2005), sendo que a apresentação de antigénios por células dendríticas, sob a influência de IFN- α , contribui para a diferenciação das células TCD4⁺ no fenótipo Th1, que está associado à resolução da infecção por VHC. (Shoukry, Cawthon et al. 2004) A produção de IFN- α durante a infecção pelo VHC pode, desta forma, contribuir indirectamente para a

maturação de células TCD4+ em células Th1. (Jr 2006) As células dendríticas estão também envolvidas na modulação da actividade das células T CD8+. Os sinais co-estimulatórios que ocorrem durante a apresentação de antígenos a células TCD8+ podem determinar se a célula é, ou não, activada. (Cooper, Erickson et al. 1999) (Shoukry, Cawthon et al. 2004) Nomeadamente, as assinaturas PAMP presentes nos produtos de fagocitose das células dendríticas induzem, através da interacção com TLR3, a produção de IFN- α . (Schulz, Diebold et al. 2005) O IFN- α produzido pelas células dendríticas induz, desta forma, a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas, que promovem a activação de células T CD8+. (Jr 2006)

O IFN- α promove ainda activação e proliferação das células *Natural Killer* (NK), que actuam através da lise das células infectadas. (Biron 1999) (Loza and Perussia 2004) Adicionalmente, as células NK activadas produzem IFN- γ . (Shoukry, Cawthon et al. 2004). Os receptores de IFN- γ , uma vez activados, levam à formação de homodímeros de moléculas STAT fosforiladas, que são translocados para o núcleo, actuando ao nível dos GAS (*Gamma-Activated Sequence Elements*), promovendo a transcrição dos genes que lhes estão associados (Der et al., 1998). Nos hepatócitos, os genes sob o controlo de GAS apresentam uma sobreposição significativa com os que são expressos na resposta a IFN α/β . (Cheney et al., 2002) Os elementos GAS encontram-se ainda presentes nos genes cujos produtos estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos. [revisto em (Jr 2006)] Desta forma, a produção de IFN- γ poderá ser um factor importante no combate à infecção pelo VHC.

4. Falha nos mecanismos de resposta ao VHC

O VHC causa, na maioria dos pacientes infectados, uma infecção crónica, que surge associada a uma atenuação e / ou evasão dos mecanismos de resposta ao VHC. A elucidação dos processos pelos quais o VHC actua torna-se necessária e indispensável ao desenvolvimento de novas estratégias de combate e prevenção da doença.

4.1. Evasão da resposta imune inata

O VHC atenua a resposta inata antiviral de várias formas, ao nível da resposta IFN, mediante a acção das proteínas virais (Figura 3). A protease NS3/NS4A inibe a acção de TRIF e IPS-1, bloqueando a sinalização desencadeada por TLR3 e RIG-I. Por outro lado, a proteína core interfere ao nível da sinalização JAK/STAT e da produção de ISGs. Nomeadamente, inibe acção

de STAT1, induzindo a sua degradação; activa SOCS3, um inibidor da via JAK/STAT; activa a proteína fosfatase 2A (PP2A) que, através da indução de outras moléculas inibitórias, reduz a actividade transcripcional do complexo factor ISG3; inibe a ligação do complexo factor ISG3 aos genes estimulados por interferão. [revisto (Rehermann 2009)] A proteína E2 inibe a actividade do receptor da proteína cinase R (PKR). A NS5A, particularmente a sua região ISDR, desempenha um importante papel na capacidade de resposta ao à terapia baseada em interferão. Esta proteína interfere com a via 2-5 OAS/RNaseL, ligando-se à 2-5 OAS; liga-se directamente ao PKR, e sub-regula a expressão de PKR; e induz IL-8, que inibe as funções anti-virais desencadeadas por IFN. [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

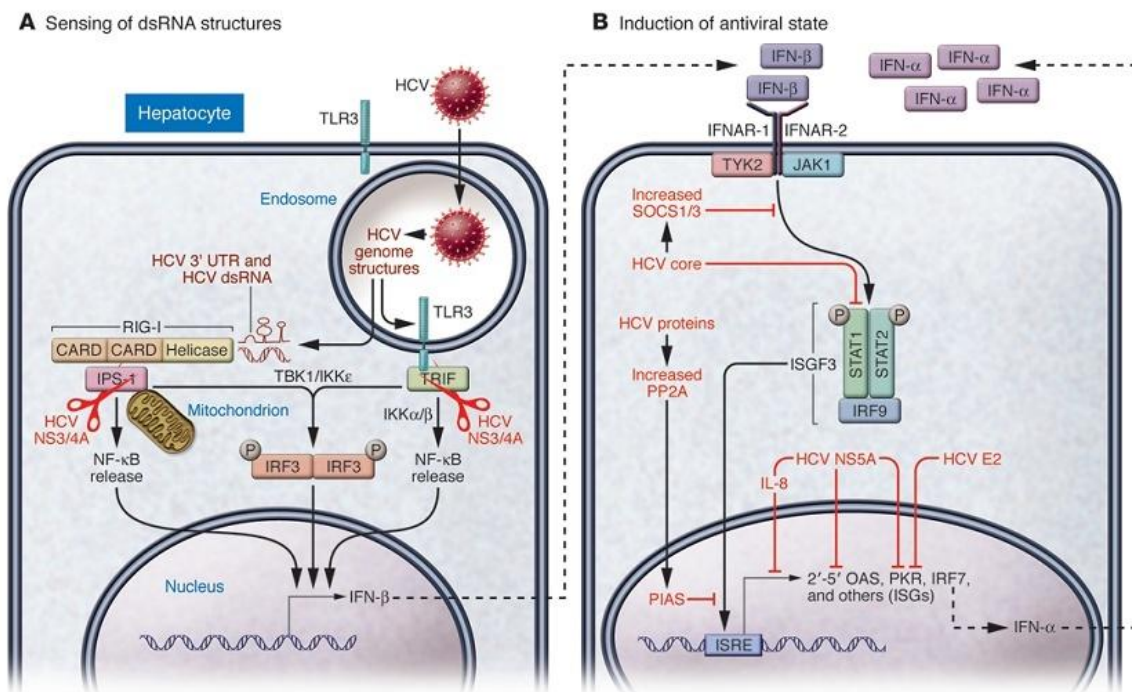


Figura 3. Evasão dos mecanismos de resposta imune inata pelo VHC. (Rehermann 2009)

(A) Os hepatócitos sentem as estruturas secundárias do RNA do VHC (dsRNA), através dos receptores RIG-I e TLR3. Estes receptores activam, por meio das moléculas adaptadoras IPS-1 e TRIF, respectivamente, o NF-κB e as cinases IKKε e TBK1 (*TNF receptor-associated factor family member-associated NF-κB activator-binding kinase-1*). A IKKε e a TBK1 fosforilam o factor de transcrição IRF3, que dimeriza, é translocado para o núcleo, e activa a transcrição do gene *IFN-β* em sinergia com o NF-κB. A protease NS3/4A do VHC cliva as moléculas adaptadoras TRIF e IPS-1, bloqueando assim a sinalização induzida por TLR3 e RIG-I. (B) A ligação do IFN-β ao receptor IFN-α/β (IFNAR-1 e -2) activa a via JAK/STAT. Especificamente, a activação das cinases TYK2 e JAK1 resulta na formação, fosforilação e montagem do complex trimérico que constitui o factor de transcrição ISG3, e que consiste no heterodímero STAT1-STAT2 e em IRF9. Este complexo é translocado para o núcleo, liga-se aos elementos de resposta estimulados por interferão (ISREs – *IFN-stimulated response elements*) na

região do promotor das ISGs, e induz a produção de 2'-5' OAS, PKR, and IRF7. O core do VHC interfere na via JAK/STAT através da indução de SOCS1/3 e da inibição da fosforilação de STAT1. A poliproteína do VHC induz a proteína fosfatase 2A (PP2A), que interfere com a metilação de STAT1, aumentando a ligação à proteína inibidora de STAT1 activada (PIAS). A interacção STAT1/PIAS impede a ligação do complexo ao elemento de resposta estimulado por interferão, e impede a transcrição das ISGs. As proteínas E2 e NS5A inibem a função de várias ISGs.

4.2. Evasão da resposta imune adaptativa

De acordo com vários estudos [revistos em (He 2006)], nos pacientes que desenvolvem infecção aguda, observa-se uma vigorosa resposta mediada por células T, específica ao VHC, nomeadamente, por células T CD4+ e T CD8+ (Takaki, Wiese et al. 2000) (Thimme, Oldach et al. 2001) (Lauer, Barnes et al. 2004) Esta resposta é detectada na fase inicial da doença, e prolonga-se durante vários anos após a resolução do vírus. Pelo contrário, os pacientes que desenvolvem infecção crónica, apresentam, normalmente, respostas T fracas e / ou de curta duração, bem como defeitos nas funções efectoras de células T específicas. [revisto em (He 2006)] As respostas mediadas por células T com este perfil resultam, normalmente, num baixo controlo da virémia e na sua persistência. (Thimme, Oldach et al. 2001) As evidências anteriores sugerem que uma resposta eficaz no combate à infecção pelo VHC seja essencialmente do tipo Th1, o que leva a pensar que a resposta Th2 se encontre, neste caso, sub-regulada. Foi também demonstrado que os níveis de IL-4 e IL-10 se encontravam elevados em doentes hepatite C crónica (Tsai, Liaw et al. 1997), enquanto os pacientes que desenvolvem uma infecção crónica mostram uma resposta predominantemente Th2, que subregula a resposta Th1. (Rehermann and Nascimbeni 2005) No entanto, embora alguns artigos tenham revelado baixos níveis de IFN- γ em pacientes VHC (Cecere, Marotta et al. 2004), ou um não aumento nos níveis de citocinas Th1 (Shapiro, Gershtein et al. 1998), outros estudos revelaram que os níveis séricos das citocinas Th1, incluindo o IFN- γ e a IL-2, encontravam-se elevadas em pacientes infectados com VHC (Cacciarelli, Martinez et al. 1996) (Cribier, Schmitt et al. 1998). [revisto em (Wan, Kung et al. 2009)] Nos pacientes com infecção crónica, a presença de células T CD8+ específicas pode controlar parcialmente a replicação viral, contribuindo para a progressão da doença. No entanto, as respostas imunes celulares mediadas por células, como TCD4+ e por células T CD8+ citotóxicas, causam longas reacções inflamatórias, que podem resultar em cirrose e hepatocarcinoma. (Gremion and Cerny 2005) Por outro lado, durante a infecção aguda, observa-se, inicialmente, um período transiente de disfunção de células T CD8+ (Lechner, Wong et al. 2000) (Thimme, Oldach et al. 2001), sugerindo tal, que uma sub-regulação transiente de células T CD8+ poderá representar uma

estratégia, no sentido de limitar os danos nos tecidos, causados pelas células T CD8+ citotóxicas, durante a fase inicial da infecção, quando se verifica um pico de replicação viral. [revisto em (He 2006)]

Devido à elevada taxa de inserção de erros, por parte da RNA polimerase dependente de RNA, aquando da replicação, o escape mutacional do vírus à resposta imune adaptativa torna-se uma das principais estratégias de evasão da resposta imune pelo VHC. Nomeadamente, as alterações ao nível da sequência da região hipervariável da glicoproteína E2 resultam no escape do vírus à resposta mediada por células T. (Ashfaq, Javed et al. 2011) Foram também observadas substituições aminoacídicas virais que inibem o reconhecimento específico do VHC por células T em pacientes com infecção crónica. (Chang, Rehmann et al. 1997) (Frasca, Del Porto et al. 1999) As mutações do VHC afectam a especificidade das respostas mediadas por células T CD8+ específicas, através da diminuição da afinidade de ligação entre o epítipo antigénico e a molécula MHC, diminuindo o reconhecimento pelos receptores T (TCR – *T Cell Receptor*) e afectando negativamente o processamento de antígenos do VHC [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

Um outro mecanismo de evasão possível é a indução de anergia nas células T específicas ao VHC, ou seja estas células perdem a sua funcionabilidade. As células T CD8+ específicas poderão ser afectadas na sua capacidade proliferativa, citotoxicidade, e na produção de TNF- α e IFN- γ (Spangenberg, Viazov et al. 2005) [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)] Podem encontrar-se células TCD8+ em diferentes estádios de diferenciação, sendo que as células TCD8+ completamente diferenciadas são essenciais para um controlo bem sucedido da infecção pelo VHC. Foi observado que pacientes respondedores à terapia manifestavam um surgimento mais rápido destas células, bem como uma maior frequência das mesmas. Desta forma, propôs-se que o VHC pudesse actuar de forma a bloquear ou a redireccionar a diferenciação de células TCD8+. (Caetano, Martinho et al. 2008)

Uma outra hipótese, é a possível infecção das células dendríticas (DCs – Dendritic cells) pelo VHC. Estas células são células muito importantes, não só no que diz respeito à apresentação de antígenos, mas também na indução da resposta imune adaptativa, de tolerância autoimune, e também no que diz respeito à imunidade inata anti-viral, mediante a produção de IFNs do tipo I. [revisto em (He 2006)] Alguns estudos mostraram a presença de sequências de RNA do VHC, incluindo, os intermediários de cadeia negativa, em DCs isoladas a partir de pacientes com infecção crónica. (Bain et al., 2001; Goutagny et al., 2003; Tsubouchi et al., 2004a) sugerem a possibilidade de replicação do VHC em DCs. [revisto em (He 2006)] reuiu vários estudos *in vitro* que sugerem mecanismos de disfunção de DCs por parte do VHC.

Contudo, estes tipo de estudos não reflecte necessariamente o ambiente *in vivo*, sendo necessária ainda investigação adicional.

IV. Diagnóstico do VHC

No entanto, no diagnóstico da hepatite é também importante efectuar testes uma avaliação dos níveis de várias enzimas hepáticas. Nomeadamente, elevados níveis sanguíneos de transaminases AST e ALT podem estar relacionados, embora nem sempre, com o estado de severidade da inflamação do fígado. A biopsia hepática constitui o método mais exacto de diagnóstico, permitindo determinar a causa e a extensão da doença. No entanto, é um método invasivo, com alguns riscos e limitações associados, o que faz com que nem sempre seja indicado. (Kennard 2006) (Poynard, Imbert-Bismut et al. 2004) O diagnóstico para a detecção do VHC deve ser efectuado em todos os pacientes que apresentem elevados níveis de aminotransferases, com doença hepática crónica de etiologia desconhecida, ou que possua um historial de risco associado à transmissão do VHC. (Sarrazin 2012) Para tal, efectuam-se ensaios serológicos (diagnóstico serológico) e moleculares (diagnóstico molecular).

1. Diagnóstico serológico

Os testes serológicos baseiam-se em testes imunoenzimáticos desenhados para detectar a presença de anticorpos anti-VHC, no soro ou no plasma. (Colin, Lanoir et al. 2001) Os ensaios imunoenzimáticos (EIAs) de terceira geração permitem a detecção anticorpos contra vários epítipos do VHC (Chevaliez and Pawlotsky 2007), e mostraram uma especificidade de 99 % em pacientes com infecção crónica. (Colin, Lanoir et al. 2001) Os falsos positivos são mais prevalentes em populações com uma incidência de VHC relativamente baixa, enquanto os falsos negativos encontram-se mais relacionados com casos de imunossupressão (infecção por VIH ou transplantação). (Bacon 2011)

2. Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular efectua-se através de ensaios que são desenhados para medir a presença do RNA do VHC, com base na região 5'UTR (a região mais conservada do genoma do VHC) (Drexler 2009) É possível efectuar a avaliação dos níveis de RNA do VHC no sangue é possível entre uma a três semanas após a infecção, cerca de um mês antes da produção de

anticorpos. (Scott and Gretch 2007) Actualmente, encontra-se definida pela WHO uma unidade internacional padrão para a quantificação do RNA do VHC (IU), que é usada nos testes quantitativos comerciais actuais. Os testes moleculares permitem obter resultados quer qualitativos, cujo objectivo é apenas a detecção, quer quantitativos. Apesar de antigamente testes qualitativos terem sido considerados mais sensíveis, o seu uso tem-se tornado mais limitado, sendo que, actualmente, os ensaios de PCR em tempo real quantitativos ofereçam resultados com sensibilidades a quantidades inferiores a 10–50 IU/mL. A especificidade destes ensaios varia de 98 a 99 %. (Bacon 2011) Os ensaios de detecção qualitativa baseiam-se no princípio de amplificação “direccionada”, através do uso da clássica reacção de polimerização em cadeia (PCR), da PCR em tempo real, ou da amplificação mediada por transcrição (TMA) (Pawlotsky 2002) Estas técnicas, de um modo geral, têm como base a amplificação e / ou transcrição dos ácidos nucleicos virais, para níveis detectáveis, com recurso a sondas específicas de hibridização, que permitem a detecção dos produtos. Para a detecção quantitativa do RNA do VHC são usadas técnicas como PCR em tempo real, ou como o *branched* DNA (bDNA). [revisto em (Chevaliez and Pawlotsky 2007)]

V. Tratamento

1. Terapia

O tratamento relativo à fase aguda da hepatite C é muito limitado, uma vez que raramente a doença é detectada nest fase. A terapia standard, actualmente administrada em pacientes com hepatite C crónica, assenta numa combinação entre Interferão α peguilado (Peg-IFN- α) e Ribavirina (RBV).

O IFN- α é uma molécula muito importante nos mecanismos de resposta anti-viral, mas cuja produção é, normalmente, atenuada por mecanismos de evasão do VHC sendo, como tal, administrada no tratamento. A peguilação do interferão alfa resulta num prolongamento do seu tempo de semi-vida. Como resultado, a administração de menores quantidades de interferão alfa peguilado promove níveis mais constantes de interferão no sangue. A ribavirina actua ao nível da modulação imune da sinalização da via de IFN, e possui um efeito anti-viral directo na RNA polimerase dependente de RNA, resultando numa diminuição da infectividade viral. (Feld and Hoofnagle 2005) Encontram-se disponíveis dois tipos de peg-IFN alfa, peg-IFN-alfa 2a (Pegassays), e peg-IFN alfa 2b (PegIntron), com tempos de semi-vida diferentes. [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

2. Resposta à terapia

É possível atingir uma cura do vírus. Uma pessoa diz-se curada do VHC, quando o vírus deixa de ser detectado no seu sangue, mesmo quando do uso de testes de diagnóstico muito sensíveis. Considera-se que a resposta à terapia para hepatite C é bem sucedida, quando o RNA do VHC é indetectável em amostras de sangue 6 meses após o tratamento, ou seja, quando se atinge a resposta virológica sustentada, ou SVR (figura 4). (Ghany, Strader et al. 2009) Torna-se importante atingir este patamar de tratamento, uma vez que se reduz o risco de progressão da doença hepática. (Veldt, Heathcote et al. 2007) No entanto, em certos casos, a diminuição do RNA viral para níveis indetectáveis ocorre muito antes das 6 semanas após o tratamento. É necessário ter este factor em conta, uma vez que a duração do tratamento pode variar de acordo com o tipo de resposta. Por exemplo, os pacientes que atinjam a resposta virológica sustentada (RVR) (figura 4), tratamento, a duração da terapia é reduzida para 24 semanas (ao invés da duração standard de 48 semanas). (Ghany, Strader et al. 2009)

A terapia combinada de Peg-IFN- α e (RBV) tem uma taxa de erradicação do VHC de cerca 75 a 90 %, em pacientes com os genótipos virais 2 e 3, embora apenas de 45 a 52 % na presença dos genótipos 1 e 4. (Deutsch and Hadziyannis 2008)

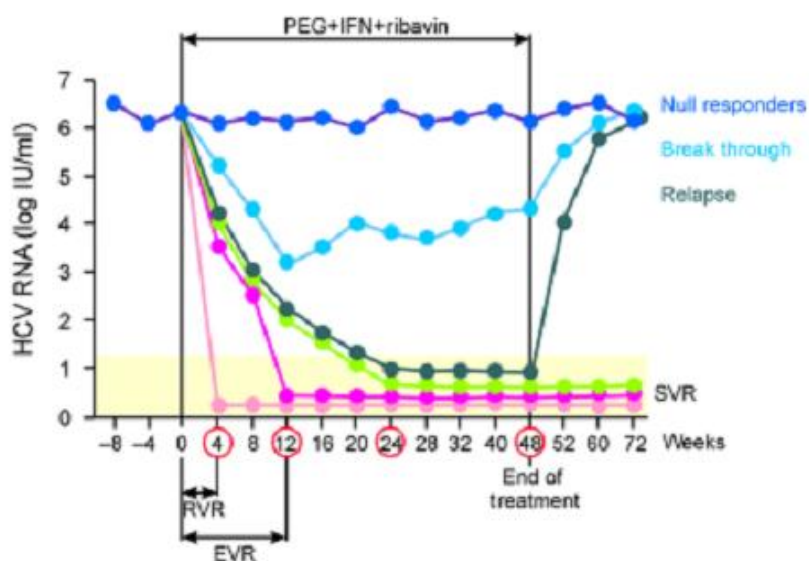


Figura 4. Definição da resposta a Peg-IFN e RBV. A cinética dos níveis de RNA do VHC durante a terapia ajudam a prever a resposta.

A resposta virológica rápida, ou RVR, é definida pela não detecção de RNA de VHC na 4ª semana de tratamento. A resposta virológica precoce, ou EVR, significa que na 12ª semana de tratamento, o RNA viral não é detectável (EVR completa), ou então, apresenta uma diminuição de mais de 100 vezes (2 log) comparativamente aos níveis iniciais. A resposta virológica sustentada, ou SVR, é caracterizada pela ausência de detecção RNA do VHC, após 24 semanas (6 meses) de tratamento. O reaparecimento de

RNA do VHC no soro durante o tratamento é definido como *breakthrough*. O termo *relapse* é usado o RNA viral é novamente detectado após a descontinuação da terapia. Os pacientes que não respondem à terapia são descritos como não respondedores, quando falham na eliminação do vírus após 24 semanas de tratamento; respondedores nulos, quando não se observa uma diminuição superior a 100 vezes na 24ª semana de terapia; e respondedores parciais, quando atingem uma EVR, mas ainda apresentam níveis de RNA viral detectáveis 24 semanas após o tratamento.

Nos casos em que a resposta não é bem sucedida, os pacientes podem, ou não, ter chegado a atingir níveis indetectáveis de RNA viral, que posteriormente voltaram a aumentar (recaída). De qualquer forma possuem a hipótese de voltar a receber tratamento. No entanto, nestes casos, a probabilidade da resposta ser bem sucedida é bastante baixa, principalmente nos casos em que nunca se chegou a observar uma descida do RNA viral para valores indetectáveis. (Poynard, Colombo et al. 2009) (Rustgi, Lee et al. 2009) (Yoshida, Sherman et al. 2009)

3. Factores que influenciam a resposta à terapia

Vários factores podem influenciar a resposta a terapia standard, tais como, factores virais e intrínsecos, bem como mecanismos moleculares induzidos pelas proteínas do VHC, no sentido de inibir a via do IFN. (Asselah, Estrabaud et al. 2010)

Dentro dos factores virais, podem considerar-se a presença de diferentes genótipos e quasispecies, bem como a carga viral antes do tratamento e a cinética viral. Normalmente, os pacientes infectados com os genótipos 2 e 3 apresentam taxas de SVR mais elevadas, (de 75 a 90 %) relativamente a pacientes com os genótipos 1 e 4 (de 45 a 52 %). (Deutsch and Hadziyannis 2008) Já o genótipo 4 apresenta taxas de SVR mais elevadas relativamente ao genótipo 1, mas inferiores às do genótipo 3. Por outro lado, a elevada capacidade de produção de mutantes leva à selecção de mutações adaptativas nas sequências das proteínas do VHC e, subsequentemente, a um aumento da falha dos mecanismos de resposta. [revisado em (Ashfaq, Javed et al. 2011)] Nomeadamente, foi proposto que as mutações ao nível da sequência da região ISDR da NS5A podem representar um factor predictivo na sensibilidade ou resistência ao tratamento com IFN- α . (Enomoto, Sakuma et al. 1995) Pacientes com elevadas carga virais antes do tratamento (800 000 UI/ml) apresentam uma menor sensibilidade ao tratamento (Jensen, Morgan et al. 2006) (Berg, Sarrazin et al. 2003)

Podem observar-se diferentes factores intrínsecos relacionados com baixos índices de resposta à terapia, tais como, a idade elevada, o sexo masculino, a etnia Afro-Africana, a

obesidade, a cirrose, a esteatose, e a resistência à insulina. (Asselah, Rubbia-Brandt et al. 2006) (Moucari, Asselah et al. 2008)

Factores genéticos, como a presença de polimorfismos ao nível de um nucleótido (SNPs) no genoma humano (Tanaka, Nishida et al. 2009) (Rauch, Kutalik et al. 2010) bem como o surgimento de diferentes perfis de expressão de ISGs e de diversas citocinas, podem representar uma importante componente na predição de resposta ao tratamento. (Asselah, Bieche et al. 2008) (Younossi, Baranova et al. 2009)

Também a co-infecção com outros vírus, nomeadamente, com VIH e VHB, constitui um indicador negativo de resposta. (Dhiman and Chawla 2005) [revisto em (Ashfaq, Javed et al. 2011)]

Observa-se ainda que os efeitos co-laterais associados à terapia resultam numa descontinuação em cerca de 20 % dos pacientes. (Ashfaq, Javed et al. 2011) A administração de IFN- α encontra-se associada a diversos efeitos secundários, incluindo leucopenia, trombocitopenia, neutropenia, depressão e fadiga. A adição de ribavirina, embora aumente a SVR, encontra-se associada a efeitos secundários, como por exemplo, anemia hemolítica. (Lin, Kim et al. 2006) (Ashfaq, Javed et al. 2011)

3.1. Expressão génica de mediadores imunológicos e resposta ao VHC

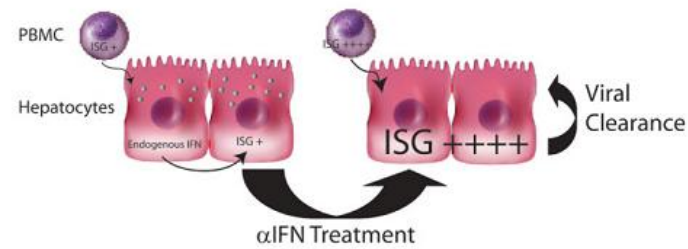
Têm-se observado esforços cada vez maiores, no sentido de encontrar métodos que permitam efectuar uma previsão da resposta ao tratamento, nomeadamente, devido aos ainda elevados custos da terapia, e aos efeitos secundários associados. Nesse sentido, é de salientar os estudos efectuados ao nível da expressão génica no fígado.

Bieche (Bieche, Asselah et al. 2005) observou, por real-time RT-PCR, que as alterações mais significativas na expressão génica em pacientes com hepatite C crónica não tratada e fibrose leve afectam principalmente a rede transcricional regulada por IFNs, incluindo *IFN α/β -inducible genes* (STAT1, STAT2, ISGF3G/IRF9, IFI27, G1P3, G1P2, OAS2 e MX1) e *IFN γ -inducible genes* (CXCL9, CXCL10 e CXCL11). A desregulação destes genes viu-se ser principalmente específica para os casos de VHC. Resultados semelhantes foram encontrados numa análise de microarrays de DNA, em nove indivíduos com hepatite C crónica. (Helbig, Lau et al. 2005) Uma proporção significativa de genes sobre-regulados na hepatite C crónica eram potenciais ISGs (*interferon stimulated genes*), sugerindo uma resposta em curso para o IFN endógenos e / ou ds RNA. Num outro estudo, a selecção de genes associados com a desregulação da expressão

génica do fígado durante a infecção pelo VHC foi estudada por RT-PCR, de acordo com a resposta ao tratamento. (Asselah, Bieche et al. 2008) Foi identificada uma assinatura de dois genes, IFI27 e CXCL9, que permitiu prever com precisão a resposta ao tratamento em 79,3 % dos pacientes do conjunto de validação, com uma precisão preditiva de 100 % e 70 % em pacientes não respondedores, e atingidores de SVR, respectivamente. Desta forma, pacientes não respondedores e SVR assumem perfis génicos diferentes antes do tratamento. Chen (Chen, Borozan et al. 2005) observou que os níveis basais de expressão de genes estimulados por IFN se encontravam mais elevados em pacientes não respondedores, relativamente aos que atingiram SVR. Shackel e McCaughan (Shackel and McCaughan 2007) sugerem a possibilidade de os ISGs se encontrarem já maximamente induzidos nos pacientes não respondedores, sendo que poderá ser provável que, para o tratamento seja eficiente, tenha de ocorrer um aumento significativo dos ISGs após o início do mesmo, o que requererá uma resposta imune que não se encontre já maximizada (figura 5).

Existem ainda poucos estudos efectuados ao nível das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). A análise da expressão génica nas PMBC seria uma mais valia para os doentes, na medida em que não seria necessária uma exploração invasiva. No entanto, Younossi (Younossi, Baranova et al. 2009) efectuou a associação entre os perfis de genéticos de expressão de 154 transcritos humanos de RNA em PMBC de pacientes que eram tratados com PEG-IFN e RBV, e relacionou estes perfis de expressão com os padrões de resposta dos pacientes ao tratamento. Observou-se que se podia efectuar uma predição da SVR com base na expressão de STAT-6. Por outro lado, mostrou-se que, mesmo 24 horas após o início do tratamento, a expressão de ISGs poderia ajudar a prever a probabilidade de atingir SVR.

A Appropriately Amplified Interferon Response Leading to an SVR



B Inappropriately Amplified Interferon Response Leading to a NR

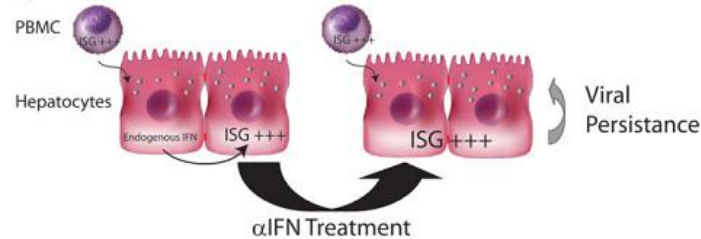


Figura 5. Respostas mediadas por genes estimulados por IFN (ISG) na infecção pelo VHC.

(A) Indivíduos que atingem uma SVR parecem apresentar níveis de expressão de ISGs relativamente baixos, antes da terapia, o que se encontra associado com a resolução viral. (B) Indivíduos não respondedores parecem apresentar níveis de expressão de ISGs superiores antes da terapia, mas falham na posterior montagem de uma indução significativa de ISGs no decorrer do tratamento, o que se encontra associado a uma persistência viral.

3.2. Gene IL 28 e resposta ao VHC

Estudos efectuados com vista a encontrar uma relação entre SNP no genoma humano e a patogenicidade do VHC revelaram uma associação entre SNPs relacionados com o gene IL28B e a resposta à terapia com PEG-IFN/RBV em pacientes com VHC. (Ge, Fellay et al. 2009) (Suppiah, Moldovan et al. 2009) (Tanaka, Nishida et al. 2009) Desde então, tem-se investigado a relação entre os SNPs associados ao gene IL28B.

O gene IL28B codifica a interleucina-28B [IL-28B], ou interferão λ do tipo III [INF- λ 3]), e localiza-se no cromossoma 19. Os IFNs do tipo III (λ) incluem os IFN- λ 1, 2, e 3 (IL-29, IL28A e IL28B), e possuem actividades anti-virais semelhantes aos IFN do tipo I (α/β). (Tanaka, Nishida et al. 2009)

É importante considerar a relevância dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860, no que diz respeito à sua relação com a resposta ao tratamento com IFN- α , quer com a resolução espontânea do VHC. (Obeid 2011) O polimorfismo rs8099917 localiza-se na 8.9 kb a

montante do gene IL28B. Podem observar-se, relativamente a este SNP, os genótipos T/T, T/G e G/G, sendo que, de acordo com estudo anteriores, os pacientes portadores do genótipo T/T apresentam uma maior probabilidade resolver a infecção viral. (Ito, Higami et al. 2011) O SNP rs12979860 situa-se 3kb a montante do gene IL28B, e apresenta-se de acordo com os genótipos C/C, C/T e T/T, sendo o genótipo C/C o que se encontra mais frequentemente associado a uma resposta positiva com a resposta ao tratamento. (Younossi, Bireddinc et al. 2012)

4. Novas terapêuticas e vacinas

Devido aos vários efeitos laterais inerentes à terapia com Peg-IFN- α /RBV, à baixa taxa de sucesso em pacientes infectados com o genótipo 1, e ao eclodir de evidências que permitiram um conhecimento mais claro do ciclo de vida do VHC e das suas proteínas, têm-se observado esforços no sentido do desenvolvimento de agentes anti-virais directos (DAA). (Lindenbach, Evans et al. 2005) Em 2011, foram aprovados os primeiros agentes anti-virais directos, para pacientes com o genótipo (DAA). (Markus Cornberg and Michael P. Manns 2012) Dois inibidores da protease (PIs) NS3/4A, o bocepravir e o telaprevir, levaram a percentagens de SVR de 75%, em pacientes naive (que estavam a receber tratamento pela primeira vez) com genótipo 1. (Jacobson, McHutchison et al. 2011), (Poordad, McCone et al. 2011) No entanto, ambos os PIs requerem uma administração combinada com Peg-IFN- α e RBV, uma vez que a monoterapia resulta numa rápida emergência de resistência aos fármacos. (Markus Cornberg and Michael P. Manns 2012) Vários DAA encontram-se, actualmente, em desenvolvimento clínico. Uns dos mais promissores parecem ser os análogos de nucleosídeos inibidores do local activo da NS5B, uma vez que esta região apresenta um elevado grau de conservação. [revisto em (Sarrazin 2012)]

A enorme variabilidade genética do VHC, bem como a sua capacidade de evasão do sistema imune, constituem um forte travão ao desenvolvimento de uma vacina. Embora estudos como (Osburn, Fisher et al. 2010) indiquem que, em certos casos, uma infecção prévia poderá conferir alguma protecção contra uma re-infecção pelo VHC, os níveis de imunidade adquirida não são necessários para a resolver. No entanto, alguns autores (Halliday, Klenerman et al. 2011) (Grebely, Prins et al. 2012) sugerem futuros esforços no sentido de desenvolver uma vacina que induza um aumento na capacidade de resolução espontânea da

virémia. O principal objectivo desta vacina seria a prevenção do desenvolvimento de uma infecção crónica.

VI. Objectivos

As proteínas não estruturais NS5A e NS3 assumem um papel preponderante, quer no processo de infecção viral, quer na evasão da resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a região 5'UTR do genoma do VHC encontra-se envolvida ao nível da replicação do VHC, e assume uma elevada importância ao nível da tradução, ao nível do IRES. Também a região HVR1, da glicoproteína de envelope E2 do VHC, sofre várias mutações ao longo do tempo, como tentativa de escape à resposta imune. Adicionalmente, os perfis de expressão génica dos pacientes, bem como a presença de polimorfismos associados ao gene IL28B, parecem estar relacionados com o tipo de resposta ao tratamento baseado em Peg-IFN- α e RBV. Desta forma, o trabalho segue os objectivos abaixo enumerados.

1. Estudo da variabilidade do genoma do VHC

1.1. Estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3

No âmbito deste objectivo, pretende-se:

- a) avaliar a taxa de mutações nas regiões NS5A e NS3;
- b) classificar as mutações presentes (mutações sinónimas, e não sinónimas);
- c) determinar o impacto das mutações na estrutura e actividade das proteínas.

1.2. Estudo da variabilidade das regiões 5'UTR e HVR1

No sentido de dar continuidade a estudos anteriores (Ângela 2010), tenciona-se:

- a) estudar a variabilidade ao nível das regiões 5'UTR e HVR1;
- b) classificar as mutações presentes na região HVR1 e o seu impacto ao nível da estrutura secundária da proteína E2;
- c) relacionar as mutações presentes com a resposta à terapia.

2. Avaliação da expressão genética de marcadores da actividade inflamatória antes e em diferentes tempos de tratamento.

De forma a tentar descobrir a presença de marcadores imunológicos relacionados com os tipos de resposta ao tratamento, tenciona-se proceder à caracterização da expressão

genética de diversos mediadores imunológicos em células do sangue periférico de pacientes, antes, e após diferentes períodos de tempo de tratamento.

3. Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento

Pretende-se caracterizar os polimorfismos rs8099917 e rs12979860 nos pacientes, relacionando-os com a resposta dos mesmos ao tratamento (Peg- $\text{INF-}\alpha$ e RBV).

Capítulo 2.

Materiais e Métodos

I. População em estudo

A população em estudo é constituída por pacientes de hepatite C crónica, que foram submetidos à terapia com base em Peg-IFN- α e RBV, tendo-se colhido amostras de sangue antes, e em diferentes tempos de tratamento. O número de pacientes em análise (n) foi variável de acordo com o estudo efectuado.

O trabalho foi submetido e aprovado pelas comissões de ética, e os dados dos doentes foram anonimizados.

II. Estudo da variabilidade do genoma do VHC

1. Estudo da variabilidade das regiões 5'UTR e HVR1 do genoma do VHC

No sentido de dar continuidade a estudos anteriores (Ângela 2010), efectuou-se o estudo da variabilidade das regiões 5'UTR e HVR1 do genoma do VHC.

1.1. Estudo da variabilidade da região 5'UTR

1.1.1. Pacientes em estudo

Os dados relativos aos pacientes envolvidos neste estudo encontram-se indicados na tabela I.

1.1.2. Extracção RNA viral a partir de amostras de soro.

A extracção de RNA do VHC partiu de amostras de soro, previamente extraídas a partir de amostras de sangue de pacientes infectados. Para tal, recorreu-se a um processo de purificação de ácidos nucleicos com base em sílica.

Tabela I. Pacientes envolvidos no estudo da variabilidade da região 5'UTR (idade, sexo, genótipo e tipo de resposta).

Paciente	sexo	idade	Genotipo	Tipo de Resposta
49480	M	40	1a	Não Respondedor
100217	M	34		Não Respondedor
208142	M	36		Não Respondedor
217169	M	—		Não Respondedor
98385	M	30	1b	Não respondedor
99385	M	29		Não respondedor
106348	M	45		Não respondedor
107117	M	38		Não respondedor
100218	F	40	1a	Respondedor
105886	M	49		Respondedor
106370	M	43		Respondedor
207701	M	44		Respondedor
215828	M	41		Respondedor
212889	M	41		Respondedor
206543	F	—		Respondedor
206567	F	41	1b	Respondedor
207358	F	64		Respondedor
99384	M	36	3a	Respondedor

1.1.2.1. Princípio

De acordo com o princípio purificação de ácidos nucleicos com base em sílica, o RNA viral liga-se à superfície da sílica das partículas magnéticas na presença de um sal caotrópico. O sal caotrópico causa a desnaturação das biomoléculas, através da interrupção da hidratação que envolve as mesmas. Isto permite que os iões carregados positivamente formem uma ponte salina entre a sílica carregada negativamente e o esqueleto do ácido nucleico carregado negativamente, sob elevadas concentrações de sal. O ácido nucleico pode posteriormente ser lavado com uma solução contendo uma elevada concentração de sal e etanol e, ultimamente, eluída numa solução com baixa concentração de sal. (Cady 2003)

1.1.2.2. Método

A extracção de RNA viral efectuou-se com recurso ao *BioRobot M48* e ao kit *MagAttract (Qiagen) Viral RNA M48* (2010) de acordo com os passos ilustrados na figura 6. Esta tecnologia combina a velocidade e eficiência da purificação de ácidos nucleicos baseada em sílica, com a

manipulação conveniente de partículas magnéticas. Como tal, as amostras de soro são submetidas a lise; seguidamente, o RNA viral liga-se às partículas magnéticas, na presença de um sal caotrópico, ocorrendo a separação magnética; o RNA é então lavado através do uso de dois tampões, fornecidos pelo kit. Por último, o RNA é depois eluído num tampão de eluição sem RNase, a 65 °C. O *BioRobot M48* permite processar até 48 amostras, em múltiplos de 6, numa única corrida. (2010)

Partiu-se de um volume de soro de 300 µL, tendo-se programado o volume de eluição dos produtos de extracção de RNA para 65 mL.

Para além dos recipientes associados a processos de transferência e armazenamento no BioRobot, na preparação das amostras usaram-se tubos de 1,5 mL, micropipetas 200 e 1000 (*eppendorf*), assim como pontas com filtro de 200 e 1000 µL (*eppendorf*).

Antes do passo seguinte (síntese de cDNA), os produtos de extracção foram armazenados em tubos de 1,5 mL, a uma temperatura de – 80 °C.

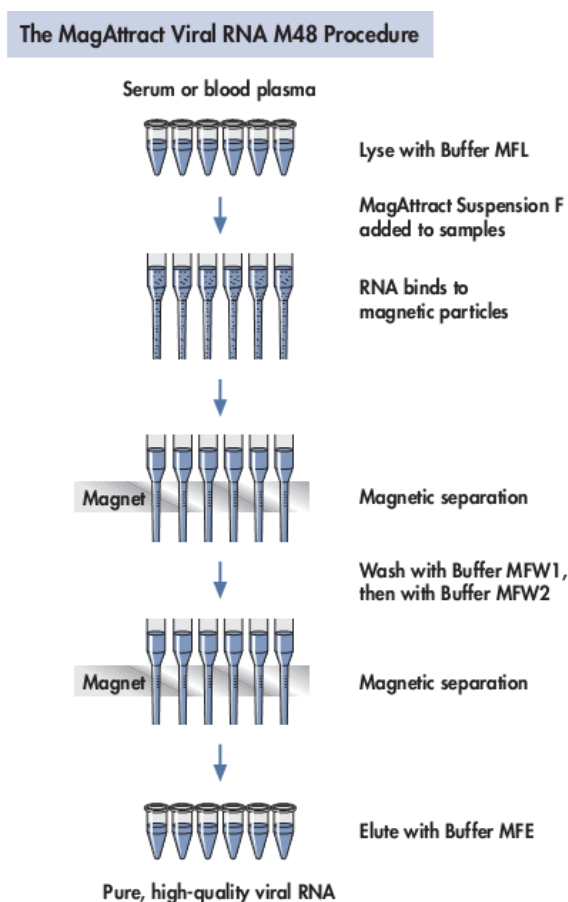


Figura 6. Passos de extracção de RNA, no *BioRobotM48*, com o *MagAttract (Qiagen) Viral RNA M48*. (2010)

1.1.3. Síntese de cDNA

O primeiro passo, no que refere à obtenção de produtos de amplificação de DNA correspondentes a uma região do RNA viral, consiste na síntese da cadeia de DNA complementar à cadeia de RNA viral.

1.1.3.1. Princípio

A síntese de cDNA ocorre numa reacção, na qual o RNA é transcrito para cDNA, através da acção de uma enzima transcriptase reversa (uma DNA polimerase dependente de RNA) na presença primer (s) e de desoxirribonucleosídeos trifosfatados (dNTPs).

Um aspecto importante a ter em conta é a escolha adequada da transcriptase reversa. As enzimas classicamente utilizadas, são a AMV RT (transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária) e a MMLV RT (transcriptase reversa do vírus da leucemia murina). A AMV RT catalisa a polimerização de DNA, usando como molde DNA, RNA, ou híbridos RNA:DNA. Apresenta, no entanto, uma actividade de RNase H intrínseca *in vitro*. A actividade de RNase H pode resultar na degradação do molde de RNA contido no híbrido RNA:DNA, nomeadamente daquele que se forma quando o primer de DNA hibridiza com o molde de RNA, imediatamente antes da transcriptase reversa, aumentando a instabilidade do primer, e diminuindo enormemente a produção de cDNA (Farrel 2010) A MMLV RT é uma DNA polimerase dependente de RNA, e possui uma actividade de RNase H mais fraca, relativamente à AMV. A AMV RT pode tornar-se preferível, uma vez que possui uma grande capacidade de processamento, e a capacidade de estar activa a temperaturas iguais ou superiores a 50°C. É, geralmente, escolhida para a transcrição reversa de pequenos moldes. Por outro lado, a MMLV RT é escolhida quando se pretendem transcrever longos moldes, nomeadamente, porque possui, geralmente, baixos níveis de actividade de RNase H. No entanto, esta enzima apresenta uma menor termoestabilidade, relativamente à AMV. (Farrel 2010)

1.1.3.2. Método

No que refere ao trabalho efectuado, procedeu-se à síntese da cadeia de DNA complementar apenas à porção do genoma relativamente ao qual se pretende obter produtos de amplificação. Assim sendo, usou-se um primer *reverse* específico, o 1CH (tabela IV), e uma AMV RT (Promega, Madison, USA) como transcriptase reversa.

Na preparação da reacção, preparou-se uma mistura com os componentes da reacção, que se encontram descritos na tabela I, bem como as respectivas quantidades. Por cada reacção, adicionaram-se 14,5 µL de mistura e 10,5 µL de RNA, perfazendo um volume total de 25 µL.

Tabela II. Componentes da reacção de transcrição reversa com a AMV-RT.

Reagentes	Volume por reacção (µl)	Concentração final
5x RT Buffer ^a	5	1x
2.5 mM dNTP's	2,5	0,25 mM
Primer 1CH (5 µM)	5	1 µM
20 U/µL RNAsin ^a	0,5	10 U /25 µL
10 U/µL AMV-RT ^a	0,5	5 U /25 µL
H2O (nuclease free) ^a	1	

^a Promega, Madison, USA

A reacção foi submetida a uma temperatura de 42°C, à qual ocorre a acção da enzima, e posteriormente a 95 °C (temperatura de inactivação da enzima) no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Engine[®] da Biorad*. (tabela III)

Tabela III. Programa de temperaturas seguido na reacção de transcrição reversa com a AMV-RT.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)	Nº de repetições
Transcrição reversa	42	50:00	1
Inactivação da enzima	95	10:00	1
	4	∞	1

Neste processo, usou-se a RNAsin. Esta enzima é inibidora da actividade de ribonuclease, de forma a que não ocorra a degradação do molde de RNA antes da síntese da cadeia de DNA.

Na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200, (*ependorf*), assim como pontas com filtro de 10, 20 e 200 µL (*ependorf*). A reacção síntese de cDNA ocorreu em tubos de 200 µL, dispostos em tiras de 8.

1.1.4. Nested PCR

A obtenção dos produtos de amplificação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, a partir das cadeias de cDNA, efectuou-se através de uma Nested PCR.

1.1.4.1. Princípio

Uma reacção de polimerização em cadeia (PCR) permite a amplificação de produtos de um fragmento específico de DNA. Para tal, é necessário ter em conta a cadeia molde de DNA, os primers (normalmente, um par de oligonucleótidos que emparelham com as cadeias molde, delimitando nos dois sentidos a região que se pretende amplificar), os dNTP (desoxirribonucleosídeos trifosfatados) livres que são usados para prolongar as cadeias de DNA), e a enzima DNA polimerase termoestável (enzima procede à adição de nucleótidos durante o processo de extensão, usando como molde a cadeia a que cada primer se encontra hibridizado). A reacção ocorre segundo uma série de ciclos, envolvendo, cada um, a exposição da amostra a diferentes temperaturas. Para tal, utiliza-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo. Por norma, cada ciclo de PCR compreende, inicialmente, a desnaturação do DNA, seguida do emparelhamento de primers (*annealing*) e, por último, a síntese de DNA (extensão). (Vieira 2001)

A Nested PCR é uma variação da PCR, na qual dois pares primers, em vez de um, são usados para amplificar um fragmento específico de DNA. Fazem-se, desta forma, duas PCR consecutivas, cada uma, com o respectivo par de primers. O segundo par de primers é utilizado para amplificar uma região de DNA dentro da que havia sido amplificada durante a primeira PCR. É esta região, amplificada durante o segundo PCR, que corresponde ao fragmento desejado. A utilização do Nested PCR tem o intuito de tornar a amplificação mais específica, e mais fidedigna, já que com o PCR tradicional existe um risco mais elevado de contaminação dos produtos, devido a um emparelhamento errado dos primers com a cadeia molde de DNA. (Moller 2006).

No caso em questão, para a síntese de cDNA, utilizou-se um primer reverse, com base no qual se iniciou especificamente a síntese de cadeias de DNA negativas, isto é, complementares à cadeia positiva de RNA. Assim, durante a primeira PCR, usa-se apenas o primer *forward* 2CH (tabela X), que permite, tendo em consideração a orientação da cadeia positiva, a introdução de especificidade de síntese ao nível do sentido 5'→3'.

1.1.4.2. Primeira PCR

Na primeira PCR, preparou-se uma mistura com os componentes da reacção de PCR, sendo que, por reacção, se adicionou 75 µL de mistura aos 25 µL resultantes da síntese de cDNA, perfazendo um volume total de 100 µL. Os tubos de reacção foram posteriormente inseridos num termociclador de tampa aquecida (*Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer® da Biorad*), de forma a submeter as reacções a um programa de temperaturas indicado na tabela V. Os reagentes utilizados, bem como as respectivas quantidades encontram-se descritos na tabela II, e o programa de PCR, na tabela III.

Tabela IV. Reagentes, e as respectivas quantidades, utilizados na primeira PCR.

Reagentes	Volume por reacção (µl)	Concentração final
5x tampão de reacção da <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> ^a	20	1x
2,5 mM mistura dNTP's	8	0,2 mM
25mM MgCl ₂ ^a	6	1.5 mM
Primer 2CH (5µM)	5	0,25 µM
5 U/µL <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> ^a	0,5	2,5 U/100µL
H ₂ O RNASE free ^a	35,5	—

^a Promega, Madison, USA

Tabela V. Programa seguido na realização da primeira PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.

Etapa	Temperatura	Duração (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94°C	4:00	1
<i>Annealing</i>	50°C	2:00	1
Extensão	72°C	2:00	1
Desnaturação	94°C	0:30	25
<i>Annealing</i>	55°C	0:30	
Extensão	72°C	0:30	
Extensão final	72°C	10:00	1
	4 °C	∞	

Tabela VI. Primers utilizados nas duas PCRs relativas à amplificação de uma porção da região 5'UTR.

	Nome e tipo de primer	Sequência do primer	Localização correspondente no genoma do VHC (Nucleótidos)
Primers usados na primeira PCR	2CH – <i>Forward</i>	5'-AACTACTGTCTTCACGCAGAA-3'	53 – 73
	1CH – <i>Reverse</i>	5'-GGTGACGGTCTACGAGACCTC-3'	341 – 321
Primers usados na segunda PCR	Ky80 – <i>Forward</i>	5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT-3'	68 – 91
	Ky78 – <i>Reverse</i>	5'-CTCGCAAGCACCTATCAGGCGT-3'	311 – 288

1.1.4.3. Segunda PCR

Na segunda PCR, utilizou-se um par de primers, ky80 (*forward*) e ky78 (*reverse*), que flanqueiam um fragmento de DNA situado no interior da região delimitada pelo par 2CH e 1CH (tabela VI). Tal como na primeira PCR, preparou-se uma mistura com os reagentes. Neste caso, adicionou-se um volume de 5 µL de produto da primeira PCR a 95 µL da mistura reaccional, obtendo-se um volume final de 100 µL. Os reagentes utilizados e as quantidades respectivas encontram-se descritos na tabela VII, enquanto o programa de PCR se encontra indicado na tabela VIII.

Tabela VII. Reagentes, e as respectivas quantidades, utilizados na segunda PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.

Reagentes	Volume por reacção (µl)	Concentração final
5x tampão de reacção da <i>GoTaq</i> [®] <i>DNA Polymerase</i> ^a	20	1x
2,5 mM mistura dNTP's	8	0,2mM
25mM MgCl ₂ ^a	6	1.5 mM
Primer ky80 (6,67 µM)	5	0,33 µM
Primer ky78 (6,67 µM)	5	µM
5 U/µL T <i>GoTaq</i> [®] <i>DNA Polymerase</i> ^a	0,5	2,5 U/100 µL
H ₂ O RNASE free ^a	50,5	—

^a Promega, Madison, USA

Tabela VIII. Programa seguido na realização da segunda PCR, para a amplificação de uma porção da região 5'UTR.

Etapa	Temperatura	Tempo (min)	Ciclo
Desnaturação inicial	94°C	2:00	1
Desnaturação	94°C	0:30	35
<i>Annealing</i>	60°C	0:30	
Extensão	72°C	0:45	
Extensão final	72°C	10:00	1
	4 °C	∞	

Por cada PCR, preparou-se uma reacção controlo, na qual se adicionou à mistura um volume de água correspondente ao que se adicionaria em amostra (cDNA ou produto de amplificação).

Em ambas as PCRs, na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200, e 1000 (*eppendorf*), assim como pontas com filtro de 10, 20, 200 e 1000 μL (*eppendorf*). As reacções de amplificação ocorreram em tubos de 200 μL , dispostos em tiras de 8, no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer®* da *Biorad*.

1.1.5. Electroforese

De forma a visualizar os produtos de amplificação resultantes da Nested PCR, realizou-se uma electroforese dos produtos em gel de agarose.

1.1.5.1. Princípio

A electroforese em gel baseia-se na separação de moléculas carregadas, por acção de um campo eléctrico, através da migração ao longo de uma matriz. Este método permite separar as moléculas em função da sua carga, conformação ou tamanho. A carga total das moléculas de DNA é negativa, logo, quando submetidas a uma electroforese em gel, migram em direcção ao pólo positivo. Normalmente, estas moléculas possuem uma razão carga / massa semelhante, logo, são separadas em função do seu tamanho.

Para a separação de DNA, é comum prepararem-se géis de agarose ou de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida resultam da polimerização da acrilamida, e permitem uma efectuar uma electroforese com elevada resolução, uma vez que, em função da concentração de acrilamida, podem possibilitar a separação de moléculas que difiram em apenas um nucleótido. Estes géis são usados na separação de moléculas de DNA relativamente pequenas (de 1 a 300 bp). Por outro lado, os géis de agarose são muito utilizados, pois embora não permitam uma resolução tão elevada, possibilitam a separação de fragmentos de DNA maiores, dependendo da dimensão dos poros, sendo que o tamanho destes varia em função da concentração de agarose. Aquando da preparação do gel de agarose, adiciona-se brometo de etídeo (EtBr₂). Este composto intercala-se nas moléculas de DNA, entre dois pares de bases adjacentes, facto que permite que as moléculas emitam luz sob a forma de fluorescência, quando irradiadas com radiação UV. A separação de fragmentos de DNA é frequentemente levada a cabo num gel de agarose, uma vez que este é mais fácil de preparar e permite a separação de uma maior diversidade de moléculas, no que refere ao tamanho das mesmas. (Brown 2010)

Para a separação dos produtos da amplificação da porção da região 5'UTR, usou-se um gel de agarose a 2 %, que permite uma boa separação de fragmentos que possuam entre 0,2 a 1 kb. (Biological Protocols, 2011)

1.1.5.2. Preparação do gel de agarose a 2 %

Adicionou-se 5 mL de TAE (50 x) a 245 mL de água esterilizada, perfazendo um volume final de 250 mL (solução de TAE 1x). Juntou-se a solução a 5 gramas de agarose (*Seakem*® *ME Agarose, Lonza, Rocklnd, USA*), num *erlenmeyer*. A mistura foi a aquecer ao microondas, durante 5 minutos, à potência máxima, de forma a obter-se uma solução translúcida. Posteriormente, arrefeceu-se um pouco, passando o recipiente por água corrente. De seguida, adicionou-se 27 µL EtBr₂, e verteu-se o gel para um “berço”, com cuidado, de forma a evitar a formação de bolhas. Aplicaram-se então os pentes no tabuleiro, de forma a formar os poços, e deixou-se solidificar. Por último, colocou-se o tabuleiro, com o gel, na tina de electroforese (*Flowgen*) contendo tampão TAE (1x), retiraram-se os pentes cuidadosamente, com cuidado para não rebentar os poços.

1.1.5.3. Realização da electroforese e visualização das amostras

Para cada amostra (ou controlo), adicionou-se 2 μL de *Loading Buffer* a 15 μL de produto de amplificação. De seguida, cada mistura foi pipetada para um poço do gel. Adicionou-se também, a um dos poços, 8 μL de padrão molecular (*Ez Load TM*, 100pb, *Biorad*). De seguida, submeteu-se o gel a uma corrente eléctrica, a 200 volts (*Gene Power Supply*), durante cerca de 15 minutos.

No final, procedeu-se à visualização dos produtos de corrida no transiluminador de UV (*Vilber, Lourmat*), tendo-se fotografado o gel com recurso ao sistema de fotografia *Gel Logic 200, Imaging System (Kodak®)*.

Nas pipetagens, usaram-se micropipetas 10 e 20, (*eppendorf*) e pontas de 10 e 20 μL (*eppendorf*).

1.1.6. Purificação com ExoSap

Antes de se proceder à reacção de sequenciação dos produtos de amplificação da HVR1 e da região 5'UTR, foi necessário efectuar uma purificação dos produtos, no sentido de remover o excesso de primers e dNTP's presentes. Para tal, recorreu-se ao método *ExoSAP*.

1.1.6.1. Princípio

A purificação *ExoSAP* permite, de uma forma simples purificar os produtos de PCR, antes da sequenciação. Este método envolve a acção da enzima exonuclease I, que degrada os primers, e da fosfatase alcalina *shrimp* (SAP), que degrada os dNTPs. (Butler 2005)

1.1.6.2. Procedimento

Para preparar a reacção, adicionou-se 3 μL do reagente *ExoSAP-IT (Allele SEQR)*, a 20 μL de produto de amplificação. Posteriormente, os tubos de reacção são incubados a 37 °C, durante 30 minutos, e a 80°C (temperatura de inactivação), durante 15 minutos.

Nas pipetagens, usaram-se micropipetas 10 e 20, (*eppendorf*) e pontas de 10 e 20 μL (*eppendorf*). As reacções ocorreram no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer® (Biorad)*.

1.1.7. Reacção de Sequenciação

Após a purificação dos produtos de amplificação, procedeu-se à reacção de sequenciação. A metodologia actualmente utilizada para a sequenciação do DNA, tem como base o método de Sanger. Como tal, e para uma melhor compreensão do método actual, este processo é explicado seguidamente.

1.1.7.1. Método de Sanger

O princípio por detrás deste método, baseia-se no uso de dideoxynucleótidos trifosfatados (ddNTPs) como terminadores da síntese de uma nova cadeia de DNA. De acordo com o método clássico, o processo requer, como principais componentes, uma cadeia única de DNA como molde, um primer de desoxirribonucleótidos, uma DNA polimerase, dNTPs, e ddNTPs, que terminam a elongação da nova cadeia de DNA. São elaboradas quatro reacções, em separado, a partir da amostra. Cada uma das reacções contém os quatro tipos de dideoxirribonucleosídeo trifosfatado padrão (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), mas apenas um dos quatro tipos de ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ou ddTTP). Os ddNTP (também denominados terminadores) não possuem o grupo OH na posição 3' da desoxirribose, o que impede a formação da ligação fosfodiéster entre dois nucleótidos adjacentes, facto que resulta na terminação da elongação da cadeia de DNA e, conseqüentemente, na formação de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos. Os ddNTPs podem ser marcados radioactivamente, ou com fluorescência. Posto isto, os novos fragmentos de DNA, resultantes das quatro reacções, podem ser submetidos a uma electroforese em gel desnaturante, de forma a que sejam separados por tamanho (com a resolução de apenas um nucleótido), e a que os produtos de cada reacção corram, no mesmo gel, em quatro linhas individuais (A, T, G, C). As bandas de DNA, resultantes da separação, são posteriormente visualizadas por autorradiografia ou por radiação UV. A visualização de uma banda marcada no gel, corresponde a um fragmento de DNA, resultante da terminação da elongação da cadeia, após a incorporação de um ddNTP. As posições relativas das diferentes bandas, entre as quatro linhas, são usadas para ler (de baixo para cima) a sequencia de DNA. (Crisan 2010)

1.1.7.2. Método utilizado

O método utilizado realiza-se com base no descrito, mas com algumas variações técnicas. Nomeadamente, o processo de marcação dos terminadores de sequenciação pode

agora ser realizado, de forma a que todas as quatro reacções anteriormente mencionadas sejam levadas a cabo numa só. Isto é, cada um dos ddNTPs é marcado com um fluorocromo, que emite luz a um comprimento de onda diferente (figura 7). Por outro lado, em vários equipamentos de sequenciação, é já utilizada a electroforese capilar, em vez da electroforese tradicional. Neste processo, o gel tradicional é substituído por capilares com um diâmetro interno bastante reduzido, contendo gel. Nomeadamente, os capilares são sujeitos a um sistema automatizado, que permite detectar a fluorescência resultante da luz emitida por fragmentos de DNA marcados (por exemplo, pela incorporação de terminadores marcados com fluorocromos). O sistema de capilares permite a aplicação de campos eléctricos mais elevados, de forma a que os fragmentos sejam separados mais rapidamente. (Schmitt-Koppling 2008) A electroforese capilar tem como principais vantagens uma elevada eficiência de separação, um consumo inferior de amostras e reagentes, tempos de análise reduzidos e um elevado grau de automação. (Silva 2003)

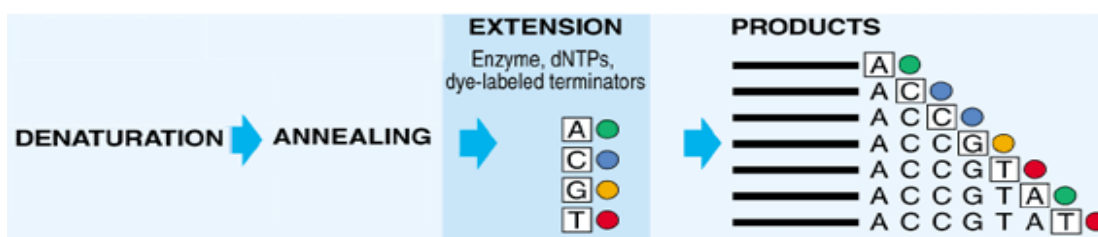


Figura 7. Esquema ilustrativo, referente à sequenciação com recurso a terminadores marcados.

(36) O DNA molde, os quatro tipos de ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP, ou ddTTP) marcados com fluorocromos diferentes, e a DNA polimerase, são adicionados ao tubo de reacção e submetidos a ciclos sucessivos de desnaturação, *annealing* e extensão. Geram-se fragmentos de DNA fluorescentes, como resultado da incorporação de ddNTPs marcados, nas suas extremidades 3’.

1.1.7.3. Procedimento

A partir de produtos de sequenciação, procedeu-se à reacção de sequenciação. Para tal, adicionou-se, por reacção, 6 µL de água esterilizada, 1 µL de primer (*forward*, ou *reverse*), 2 µL de terminadores *Big Dye v. 1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)*, e 1 µL de produto de amplificação purificado, perfazendo um volume de 10 µL. Efectuou-se uma sequenciação bidireccional das amostras e, como tal, para cada uma das amostras, preparou-se uma a reacção contendo o primer *forward*, e uma outra contendo o primer *reverse*. De seguida, os tubos de reacção foram submetidos a diferentes temperaturas, num termociclador, segundo o programa descrito na tabela IX.

Tabela IX. Programa seguido na reacção de sequenciação.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)	Nº de repetições
Desnaturação	96	20	X 25
Extensão	60	2	
	4	∞	

Após a reacção de sequenciação, removeu-se o excesso de ddNTP's livres, através de uma purificação com recurso a Sephadex G-50 (*Sephadex™ G50, GE Healthcare, Sweden*). Para tal, adicionou-se 5 gramas de Sephadex em pó, a 60 mL de água esterilizada. Posteriormente, distribuiu-se a solução por uma placa de filtração, sendo submetida a duas centrifugações (*Multi Centrifuge 3L, Heraeus®*), a 1200 g durante 2 minutos, de forma a remover o excesso de água e a formar colunas de resina. De seguida, adicionou-se 20 µL de água esterilizada aos tubos contendo os produtos de sequenciação. Estes foram, então, pipetados para os poços contendo a resina (com cuidado para não a danificar com a ponta da pipeta). A placa de filtração foi colocada por cima da placa de sequenciação, de forma a que os produtos, ao serem purificados, caiam sobre os poços correspondentes na placa de sequenciação.

A placa foi então inserida num sequenciador automático, *Genetic Analyzer 3130 ABI Prism (Applied biosystems)*. Os produtos foram submetidos a uma electroforese capilar, correndo numa matriz formada pelo polímero POP-7, e usando o tampão de corrida 3730 Buffer 10x (*Applied Biosystems, USA*), num sistema de 4 capilares. No decurso do processo, a acção de laser permitiu a excitação dos fluorocromos e a emissão de luz a diferentes comprimentos de onda, detectada por acção de um detector acoplado a um software, o *ABI Prism 3130 Data Collection™ v1.1*.

Posteriormente, o software *ABI Prism DNA Sequencing Analysis v.5.1*, actualizado com o software *KB basecaller*, permite uma primeira análise dos dados recolhidos. É possível observar o estado geral da sequência, nomeadamente, se tinha ocorrido sequenciação, ou se havia muito ruído, de forma observar se os dados estavam em condições de serem analisados por outros programas informáticos. A análise das alterações observadas ao nível da sequência de nucleótidos foi efectuada com recurso ao programa *Seqscape v. 2.5*.

Nas pipetagens efectuadas, usaram-se uma micropipetas 20 e uma multicanal (20 – 300 µL) (*epENDORF*), assim como e pontas de e 20 e 200 µL (*epENDORF*).

1.2. Estudo da variabilidade da região HVR1

1.2.1. Pacientes em estudo

Os dados relativos aos pacientes em estudo encontram-se descritos na tabela X.

Tabela X. Pacientes envolvidos no estudo da variabilidade da região HVR1 (idade, sexo e genótipo).

Paciente	Tipo de resposta à terapia	Sexo	Idade	Genótipo
99385	Não respondedor	M	30	1b
206567	Respondedor	F	41	1b
207358	Respondedor	F	64	1b

Os procedimentos no estudo da HVR1 foram muito semelhantes aos descritos relativamente ao da região 5'UTR, no que refere à extracção de RNA, electroforese, purificação dos produtos de amplificação, e sequenciação. Neste sentido, serão apenas expostos os processos de síntese de cDNA, *nested PCR*.

É de referir, contudo, no que diz respeito aos resultados da sequenciação, que a análise foi efectuada não só ao nível do *Seqscape v. 2.5*, (identificação e classificação de mutações), mas também ao nível do programa *PSipred (v. 3.0)*, de forma a observar o impacto das mutações ao nível da estrutura da proteína E2

1.2.2. Síntese de cDNA

Para obter e amplificar o cDNA relativo ao VHC, realizar-se-á o RT-PCR em dois passos, e recorrer-se-á ao sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen™, life technologies)*.

1.2.2.1. Princípio

O sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR* encontra-se optimizado para a síntese da primeira cadeia de cDNA a partir de RNA total. A transcriptase reversa usada neste sistema, é uma versão da MMLV RT, desenhada de forma a reduzir a actividade da RNase H e a aumentar a termoestabilidade. Esta enzima está preparada para sintetizar cDNA a uma gama de temperaturas de 42 – 55 °C, proporcionando uma maior especificidade e um rendimento superior, na produção de cDNA, relativamente a outras transcriptases reversas. A

síntese de cDNA é levada a cabo no primeiro passo, a partir do RNA total, mediante o uso de *random primers (random hexamers)*, ou de um primer específico. No segundo passo, é levado a cabo um PCR, usando-se primers específicos para o gene de interesse. Usa-se também a *RNase OUTTM*, um inibidor que impede a degradação do molde de RNA por contaminação com ribonucleases. A sensibilidade do passo de PCR pode ser aumentada, através da remoção do molde de RNA da molécula híbrida de cDNA:RNA. Contudo, a presença da RNase H durante a síntese da primeira degradará o molde de RNA, resultando numa diminuição da síntese da primeira cadeia de cDNA. Desta forma, sistema *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis for RT-PCR* introduz a actividade da RNase H apenas quando a mesma é vantajosa, ou seja, após a síntese da primeira cadeia de cDNA. (Invitrogen, 2003)

No trabalho a desenvolvido, usaram-se os *random hexamers*, no que concerne ao passo de síntese de cDNA. Os *random primers* são pequenos segmentos de DNA de cadeia simples (pequenos oligonucleótidos), e compreendem todas as combinações possíveis dos quatro tipos de nucleótidos, dentro do número de nucleótidos que constitui cada oligonucleótido. Os *random hexamers* referem-se a *random primers*, constituídos por seis nucleótidos. Estes primers podem ligar-se a qualquer secção da cadeia molde de RNA. O principal problema associado a esta técnica, relaciona-se com o pequeno tamanho destes oligonucleótidos, o que implica que se verifique um menor número de ligações de hidrogénio entre os mesmos e a cadeia molde. (Biodavidson) Apesar de não ser um método específico (2011), na detecção do RNA do VHC, o uso de *random hexamers* revelou ser mais sensível relativamente ao uso de primers específicos. (Radhakrishnana 1999) Com este método, todos os RNAs numa população são moldes para a síntese do cDNA, sendo que, a especificidade é conferida pelos primers utilizados no passo de PCR. (Invitrogen, 2003)

1.2.2.2. Procedimento

No processo de síntese de cDNA com o sistema *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis for RT-PCR* seguiu-se uma série de passos.

- i. Em primeiro lugar, adicionou-se 8 µL de RNA, 1 µL de random hexamers, e 1 µL de água (*DEPC-treated water*, fornecida no kit), tendo a mistura sido submetida a 65° C, durante 5 min, e logo após colocada em gelo, por 1 minuto. Este passo tem como objectivo eliminar a presença de estruturas secundárias, de forma a facilitar uma posterior hibridização dos primers com o RNA.
- ii. Posteriormente, juntou-se 10 µL de uma mistura reaccional contendo a transcriptase reversa *SuperScriptTM III*, preparada de acordo com a tabela XI, obtendo-se um volume

final de 20 μL . A reacção ocorreu segundo uma sequência de temperaturas descrita na tabela XII, no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer®* da *Biorad*.

- iii. Por último, adicionou-se 1 μL de RNase H, tendo-se procedido a uma incubação a 37° C, durante 37 min. (Invitrogen, 2003)

Tabela XI. Reagentes fornecidos pelo kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR* para a preparação da mistura reaccional.

Reagentes	Volume por reacção (μL)	Concentração final
10x RT Buffer	2	1x
MgCl ₂ (25mM)	4	5mM
0,1 DTT	2	—
RNaseOUT™ (40 U/ μL)	1	2 U/ μL
SuperScript™ III RT (200 U/ μL)	1	10 U/ μL

Tabela XII. Programa seguido na reacção de síntese de cDNA com o kit *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR*.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)
<i>Annealing</i>	25	10
Transcrição reversa	50	50
Inactivação da transcriptase reversa	85	5

O armazenamento do cDNA sintetizado efectuou-se a uma temperatura de -20° C.

Na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200 (*eppendorf*), assim como pontas com filtro de 10, 20 e 200 μL (*eppendorf*). A reacção síntese de cDNA ocorreu em tubos de 200 μL , dispostos em tiras de 8.

1.2.3. *Nested* PCR

1.2.3.1. Primeira PCR

Na primeira PCR, preparou-se uma mistura com os reagentes indicados na tabela XIII. Adicionou-se, por reacção, um volume de 45 μL de mistura e 5 μL de cDNA, por tubo de

reação, obtendo-se um volume final de 50 μ L. O programa relativo a ambas as PCRs encontra-se descrito na tabela XIV.

Tabela XIII. Reagentes, e respectivas quantidades, usados na primeira PCR da região HVR1.

Reagentes	Volume por reação (μ l)	Concentração final
5x tampão da <i>GoTaq</i> [®] <i>DNA Polymerase</i> ^a	10	1x
2,5 mM mistura dNTP's	2,5	0,125 mM
25mM MgCl ₂ ^a	3	1,5 mM
Primer forward (10 μ M)	5	1 μ M
Primer reverse (10 μ M)	5	1 μ M
5 U/ μ L <i>GoTaq</i> [®] <i>DNA Polymerase</i> ^a	0,35	1,75 U/50 μ L
H ₂ O RNASE free ^a	19,15	—

^a Promega, Madison, USA

Tabela XIV. Programa seguido na amplificação da região HVR1.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Duração (min)	N $^{\circ}$ de Ciclos
Desnaturação inicial	95	4:00	1
Desnaturação	95	1:00	5
<i>Annealing</i>	55	1:00	
Extensão	72	2:00	
Desnaturação	95	0:30	30
<i>Annealing</i>	55	1:00	
Extensão	72	2:00	
Extensão final	72	10:00	
	4	∞	

1.2.3.2. Segunda PCR

No que refere à segunda PCR, procedeu-se de forma semelhante à primeira, tendo-se usado, à excepção dos primers, os mesmos reagentes, em quantidades semelhantes. Na tabela XV, encontram-se descritos os primers usados nas duas PCRs.

Tabela XV. Primers utilizados na amplificação da região HVR1.

	Nome e tipo de primer	Sequência do primer	Localização correspondente no genoma do VHC (Nucleótidos) ^a
Primers usados na primeira PCR	CF11 – <i>Forward</i>	5'-AACTACTGTCTTCACGCAGAA-3'	821-841
	RR1 – <i>Reverse</i>	5'-GGTGCACGGTCTACGAGACCTC-3'	2103-2082
Primers usados na segunda PCR	RBF2 – <i>Forward</i>	5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGT-3'	1207-1227
	6BR1 – <i>Reverse</i>	5'-CTCGCAAGCACCTATCAGGCGT-3'	1702-1682

¹ Numeração de acordo com a sequência de referência HCV-1010 (Nº de acesso no GenBank: EF407459.1)

Por cada PCR, preparou-se uma reacção controlo, na qual se adicionou à mistura um volume de água correspondente ao que se adicionaria em amostra (cDNA ou produto de amplificação).

Em ambas as PCRs, na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200, e 1000 (*eppendorf*), assim como pontas de filtro 10, 20, 200 e 1000 µL (*eppendorf*). As reacções de amplificação ocorreram em tubos de 200 µL, dispostos em tiras de 8, no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer®* da *Biorad*.

2. Estudo da variabilidade das regiões NS3 e NS5A do genoma do VHC.

Um objectivo fulcral do trabalho era a o estudo da variabilidade ao nível das regiões NS3 e NS5A do genoma do VHC, ao nível dos génotipos 1b e 3a. Contudo, não foi possível obter amplificação das regiões, apesar das tentativas efectuadas. Por conseguinte, apresentam-se seguidamente as estratégias delineadas, no que diz respeito ao design de primers e às condições de PCR.

2.1. Estratégias de amplificação e design de primers

Relativamente ao design de primers, elaboraram-se duas estratégias, ambas com base no método *nested* PCR, aqui designadas por estratégia 1 e estratégia 2.

2.1.1. Estratégia 1

Na estratégia 1, desenharam-se primers, no sentido de obter, para cada região, uma amplificação completa, através de duas PCRs consecutivas (*nested* PCR). Assim, desenhou-se, para cada genótipo, e para cada região, um par de primers externo (para a primeira PCR) e um par de primers interno (para a segunda PCR), que englobasse a região pretendida (figura 8).

Para tal, recorreu-se ao programa informático online *ClustalW2 - Multiple Sequence Alignment* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), e procedeu-se ao alinhamento de sequências disponíveis na base de dados *Viral Bioinformatics Resource Center* (www.hcvdb.org/), para cada genótipo, de forma a encontrar locais passíveis de emparelhamento de primers, tendo em conta a enorme variabilidade do genoma, e a composição em nucleótidos. Os primers encontram-se indicados na tabela XVI.

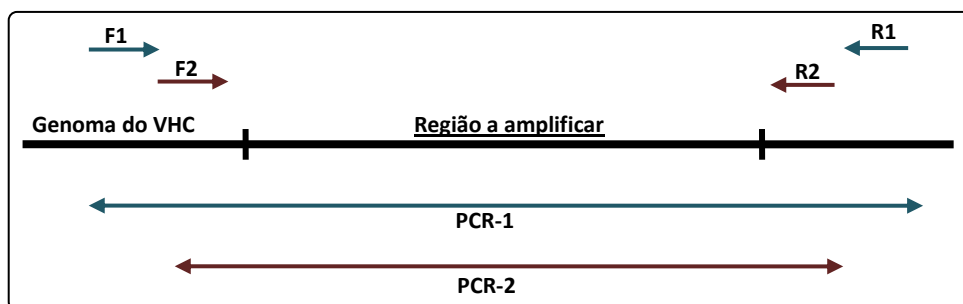


Figura 8. Esquema representativo da estratégia 1 de amplificação das regiões NS3 e NS5A.

Realizou-se, para cada região, uma *nested* PCR, no sentido de obter um produto final de amplificação que abrangesse completamente.

PCR-1 – primeira PCR, primers F1 (*forward*) e R1 (*reverse*); PCR-2 – segunda PCR, primers F2 (*forward*) e R2 (*reverse*).

Tabela XVI. Primers usados na estratégia 1 de amplificação das regiões NS3 e NS5A dos genótipos 1b e 3a.

Região e genótipo	PCR	Nome e tipo de primer	Sequência do primer	Localização correspondente no genoma do VHC (Nucleótidos) ^a	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
NS3 – 1b	1	3NS1bF1	5' TGCCTGGTACATCAAGGGCA 3'	2651 – 2660	2816
		3NS1bR1	5' GAGGCGCACTCTCCATCTCA 3'	5467– 5447	
	2	3NS1bF2	5' GGGGTCATTACGTCCAAATGG 3'	3118-3138	2268
		3NS1bR2	5'ATCCTGCCCAATGACCAC 3'	5386-5367	
NS3 – 3a	1	3NS3aF1	5' GGGGAAAATACTTCCAGATG 3'	3147 – 3165	2792
		3NS3aR1	5' CCTGAGACACCAGCTCCGTAT 3'	5939 – 5919	
	2	3NS3aF2	5' GCTTGCGGAGATATTCTTTGCG 3'	3331 – 3352	2397
		3NS3aR2	5' TAAGAGACGCCACAGCAGGGTT 3'	5728 – 5707	
NS5A – 1b	1	5NS1bF1	5' TCACTGATGGCATTACAGCCTC 3'	5634 – 5656	2289
		5NS1bR1	5' TGGATAGGTTCCGGACGTCCTTCG 3'	7923 – 7900	
	2	5NS1bF2	5' GTGTGCGCAGCAATACTGCG 3'	6018 – 6037	1801
		5NS1bR2	5' ACTGTGGACGCCTTCGCCTT 3'	7819 – 7800	
NS5A – 3a	1	5NS3aF1	5' AACCTGTTGCCCGCCATACTATC 3'	5998 – 6020	1960
		5NS3aR1	5' GAGCGAACGTCCTTCGCACTATA 3'	7958 – 7936	
	2	5NS3aF2	5' CGGTACAGTGGATGAACAGGCT 3'	6092 – 6113	1732
		5NS3aR2	5' CTTGTAATGGTCGTCGAGCACC 3'	7824 – 7803	

^a Sequência de referência 1b – HCV-J, número de acesso – D90208.1; sequência de referência 3a – NZL1, número de acesso – NC_009824.1.

2.1.2. Estratégia 2

Com esta estratégia pretendia-se amplificar cada região por partes; isto é, efectuar um processo de *nested* PCR, de forma a conseguir cobri-la completamente, através da amplificação de três fragmentos sobrepostos. Assim, os primers (tabela XIX) foram desenhados de acordo com o esquema da figura 9. Com esta estratégia pretendia-se que, ao amplificar fragmentos de menor dimensão, se obtivessem produtos de amplificação mais facilmente.

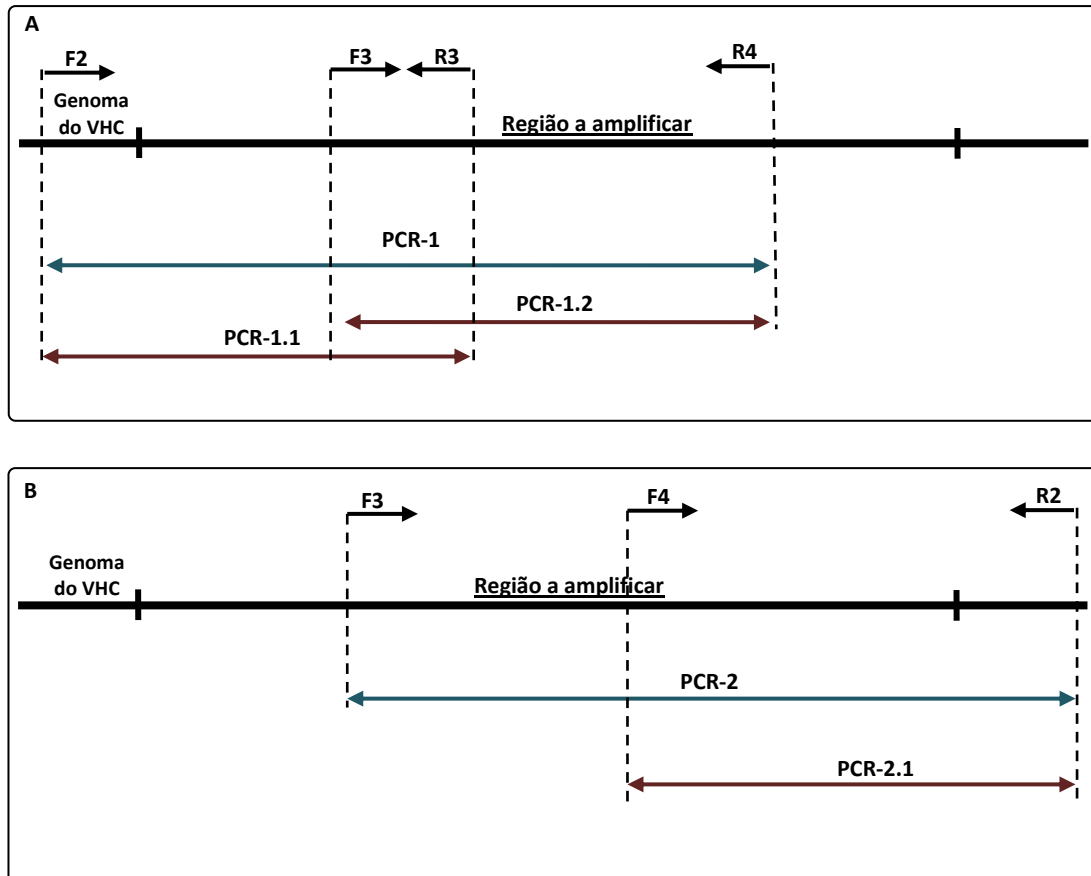


Figura 9. Esquema representativo da estratégia 2 de amplificação das regiões NS3 e NS5A.

Realizou-se um processo de *nested* PCR, de forma a conseguir cobri-la completamente, através da amplificação de 3 fragmentos sobrepostos.

Zona A. PCR-1 – primeira PCR, primers F2 (forward) e R4 (reverse); PCR-1.1 – segunda PCR, primers F2 e R3 (reverse); PCR-1.2 – segunda PCR, primers F3 (forward) e R4.

Zona B. PCR-2 – primeira PCR, primers F3 e R2; PCR-2.1 – segunda PCR, primers F4 (forward) e R2.

Tabela XVII. Regiões amplificadas e os primers envolvidos, de acordo com a estratégia 1, para a NS3.

Região e genótipo	Localização no genoma do VHC ^a	Zona a amplificar	PCR	Primers	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
1b	3408 – 5300	A	PCR-1	3NS1bF2	1533
				3NS1bR4	
			PCR-1.1	3NS1bF2	680
				3NS1bR3	
		PCR-1.2	3NS1bF3	723	
			3NS1bR4		
		B	PCR-2	3NS1bF3	1458
				3NS1bR2	
PCR-2.1	3NS1bF4		797		
	3NS1bR2				
3 ^a	3436 – 5328	A	PCR-1	3NS3aF2	1526
				3NS3aR4	
			PCR-1.1	3NS3aF2	832
				3NS3aR3	
		PCR-1.2	3NS3aF3	744	
			3NS3aR4		
		B	PCR-2	3NS3aF3	1615
				3NS3aR2	
PCR-2.1	3NS3aF4		998		
	3NS3aR2				
	5NS1bR2				

^a Sequência de referência 1b – HCV-J, número de acesso – D90208.1; sequência de referência 3a – NZL1, número de acesso – NC_009824.1.

Tabela XVIII. Regiões amplificadas e os primers envolvidos, de acordo com a estratégia 1, para a NS5A.

Região e genótipo	Localização no genoma do VHC ^a	Zona a amplificar	PCR	Primers	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
NS5A – 3a	6274 – 7629	A	PCR-1	5NS3aF2	1203
				5NS3aR4	
			PCR-1.1	5NS3aF2	792
		5NS3aR3			
		PCR-1.2	5NS3aF3	613	
			5NS3aR4		
B	PCR-2	5NS3aF3	1142		
		5NS3aR2			
	PCR-2.1	5NS3aF4	719		
		5NS3aR2			
NS5A – 1b	6246 – 7586	A	PCR-1	5NS1bF2	1000
				5NS1bR4	
			PCR-1.1	5NS1bF2	648
		5NS1bR3			
		PCR-1.2	5NS1bF3	532	
			5NS1bR4		
B	PCR-2	5NS1bF3	1333		
		5NS1bR2			
	PCR-2.1	5NS1bF4	873		
		5NS1bR2			

^a Sequência de referência 1b – HCV-J, número de acesso – D90208.1; sequência de referência 3a – NZL1, número de acesso – NC_009824.1

O design de alguns primers e a confirmação de outros efectuou-se, desta vez, no programa *CodonCode Aligner*. Assim, efectuou-se o alinhamento de 335 sequências de isolados com genótipo 1b, e das 8 sequências de isolados com genótipo 3a, disponíveis na base de dados *Viral Bioinformatics Resource Center* (<http://www.hcvdb.org/viruses.asp>).

Tabela XIX. Primers usados na estratégia 2 de amplificação das regiões NS3 e NS5A dos genótipos 1b e 3a.

Região e genótipo	Primer	Sequência do primer	Localização correspondente no genoma do VHC (Nucleótidos) ^a
NS3 – 1b	3NS1bF2	5' GGGGTCATTACGTCCAATGG 3'	3118-3138
	3NS1bR2	5'ATCCTGCCACCAATGACCAC 3'	5386-5367
	3NS1bF3	5' CTATGGAACTACCATGCGGT 3'	3928 – 3948
	3NS1bR3	5' CGAGTTGTCCGTAAAGACCGG 3'	3951-3971
	3NS1bR4	5' ATTAGAGCGTCTGTTGCCACG 3'	4631 – 4651
	3NS1bF4	5' CCTTGATGTGTCCGTCATACC 3'	4589 – 4609
NS3 – 3a	3NS3aF2	5' GCTTGCGGAGATATTCTTTGCG 3'	3331 – 3352
	3NS3aR2	5' TAAGAGACGCCACAGCAGGGTT 3'	5728 – 5707
	3NS3aF3	5' CGTGYTRAATCCATCGGTGGC	4113 – 4132
	3NS3aR3	5' GACATGAAAGAGCCGAAGCCTA 3'	4142 – 4163
	3NS3aF4	5' TTGAACAGTACGTTGACTTCAGC 3'	4730 – 4752
	3NS3aR4	5' TCGGTACGTACCGAGTCTACC 3'	4837 – 4857
NS5A – 1b	5NS1bF2	5' GTGTGCGCAGCAATACTGCG 3'	6018 – 6037
	5NS1bR2	5' ACTGTGGACGCCTTCGCCTT 3'	7819 – 7800
	5NS1bF3	5' AGCAACACGTGGCATGGAAC 3'	6486 – 6505
	5NS1bR3	5' GGCACCTTACGTTGTCAGTGGT 3'	6645 – 6666
	5NS1bF4	5' TGTCTGCGCCTTCTTGAAGG 3'	6946 – 6966
NS5A – 3a	5NS3aF2	5' CGGTACAGTGGATGAACAGGCT 3'	6092 – 6113
	5NS3aR2	5' CTTGTAATGGTCGTCGAGCACC 3'	7824 – 7803
	5NS3aF3	5' GAGCTCAAGTGTCCGTGCCAAG 3'	6682 - 6703
	5NS3aR3	5' CTCAACATCGAGGTCAGCACAG 3	6863 - 6884
	5NS3aF4	5' GTTGTGATTCTTGATTCTTCGA 3'	7105 – 7127

^a Sequência de referência 1b – HCV-J, número de acesso – D90208.1; sequência de referência 3a – NZL1, número de acesso – NC_009824.1.

2.2. Protocolos experimentais

No que diz respeito à extracção, procedeu-se de forma idêntica ao que já foi explicado para as regiões HVR1 e 5'UTR.

No que concerne à síntese de cDNA, utilizou-se o sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR*, para ambas as estratégias de combinação de primers. Contudo, para a estratégia 2, experimentou-se também a síntese de cDNA usando um primer reverse específico, com recurso à enzima AMV-RT (ver 1.1.3). Por conseguinte, para as zonas de amplificação A e B (figura 9 e tabela XVII) usaram-se, respectivamente, os primers reverse R4 e R2.

Para as reacções de amplificação posteriores à síntese de cDNA, experimentaram-se três tipos de DNA polimerase, nomeadamente, a *GoTaq® DNA Polymerase (Promega Madison)*, a *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, life technologies)*, e a uma mistura de DNA polimerases diferentes (*Expand Long Range PCR System, Roche*).

A *GoTaq® DNA Polymerase* é uma formulação da *Taq DNA polimerase*, que pode proporcionar uma amplificação tão ou mais robusta, relativamente à *Taq DNA polimerase standard*. (Promega). A *Platinum® Taq DNA Polymerase* é uma *Taq DNA polimerase recombinante*, que se encontra complexada com um anticorpo que inibe a sua actividade de polimerase à temperatura ambiente. Assim, esta enzima apenas é activada a 94 ° C (no início da PCR). A *Platinum® Taq DNA Polymerase* possui uma elevada especificidade, permitindo uma menor formação de produtos inespecíficos. (technologies) Relativamente ao *Expand Long Range PCR System*, usa-se uma mistura de enzimas, que contém uma *Taq DNA polimerase termoestável* e a *Tgo DNA polimerase*, sendo esta última uma DNA termoestável com actividade de proofreading. Este sistema proporciona, desta forma, mais fidelidade e um maior rendimento no processo de amplificação de DNA. (Roche) Os reagentes utilizados nos protocolos experimentais, bem como as variações de concentração experimentadas, encontram-se descritas na tabela XX.

Tabela XX. Reagentes de PCR e respectivas concentrações experimentadas com *GoTaq® DNA Polymerase*, *Platinum® Taq DNA Polymerase*, e *Expand Long Range PCR System*.

<i>GoTaq® DNA Polymerase</i>		<i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i>		<i>Expand Long Range PCR System</i>	
Reagentes	Concentração final	Reagentes	Concentração final	Reagentes	Concentração final
5x Taq Polymerase reaction Buffer ^a	1 x	10x PCR Buffer ^b	1 x	10x PCR <i>Expand Long Template Buffer buffer</i> , com MgCl ₂ a 17,5 mM ^c	1 x
dNTP's (2 mM)	0,2 mM	dNTP's (2 mM)	0,2 mM	dNTP's (2 mM)	0,2 mM
25mM MgCl ₂ ^a	1,5 – 3mM	50 mM MgCl ₂ ^b	2 – 3 mM	Primer <i>forward</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM
Primer <i>forward</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM	Primer <i>forward</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM	Primer <i>reverse</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM
Primer <i>reverse</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM	Primer <i>reverse</i> (3,33 – 10 µM)	0,3 – 0,6 µM	<i>Expand Long range enzyme mix</i> ^c	3 – 3,75 U/50µL
5,0 U/µL Taq DNA Polymerase ^a	2 - 3 U/50µL	5,0 U/µL Platinum® Taq DNA Polymerase ^b	2 - 3 U/50µL	H ₂ O RNASE free ^a	
H ₂ O RNASE free ^a		H ₂ O RNASE free ^a			

^a Promega Madison; ^b Invitrogen™, life Technologies, Roche .

2.3. Programas de PCR

Os programas de temperatura que se aplicaram nas PCRs tiveram como base a variação da temperatura de *annealing* (TA) dos primers, bem como o tempo de extensão. Experimentou-se o método *touchdown*, segundo o qual os primeiros ciclos da PCR apresentam uma TA elevada (próxima da temperatura de *melting* sem, no entanto, a atingir), sendo que ao longo do processo vão ocorrendo conjuntos de ciclos com TAs sucessivamente menores. Este método tem como objectivo diminuir a inespecificidade da reacção. Quanto mais baixa for a TA, maior é a probabilidade de os primers emparelharem com regiões inespecíficas. Logo, se os primers inicialmente hibridizarem nos devidos locais, mais facilmente se obtém uma amplificação da região pretendida nos restantes passos do processo.

Nas tabelas XXI e XXII, apresentam-se os programas usados, com e sem *touchdown*, que foram experimentados na amplificação com *GoTaq® DNA Polymerase*, a *Platinum® Taq DNA Polymerase*. Com o *Expand Long Range PCR System*, usaram-se programas um pouco

diferentes (tabelas XXIII e XXIV), tendo em atenção as indicações descritas no folheto informativo do produto (Roche).

Nos programas de *touchdown*, fizeram-se três conjuntos de ciclos, com valores de TA cada vez menores. O primeiro valor de TA situava-se cerca de 1 °C abaixo da média da temperatura de *melting* (TM) do conjunto de primers, baixando, normalmente, 2 a 3 °C por cada conjunto de ciclos. Os valores experimentados não foram sempre exactamente os mesmos, uma vez que se efectuaram diferentes tentativas. Nos programas sem *touchdown*, os valores de TA variavam apenas consoante a média da temperatura de *melting* (TM) do conjunto de primers (TA = TM – 4).

Tabela XXI. Programa de PCR sem *touchdown*, usado nas reacções de amplificação com *GoTaq*® DNA Polymerase e *Platinum*® Taq DNA Polymerase.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)	Nº de ciclos
1 – Desnaturação inicial	94	4	1
2 – Desnaturação	95	2	5
3 – <i>Annealing</i>	61	2	
4 – Extensão	72	2:30	
5 – Desnaturação	95	0:30	30
6 – <i>Annealing</i>	59,5	1:30	
7 – Extensão	72	2	
8 – Extensão	72	10	
9	4	∞	1

* Temperatura de *annealing*

Tabela XXII. Programa de PCR *touchdown*, usado nas reacções de amplificação com *GoTaq*® DNA Polymerase e *Platinum*® Taq DNA Polymerase.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (minutos)	Nº de ciclos
1 – Desnaturação inicial	96	2	1
2 – Desnaturação	94	0:30	5
3 – <i>Annealing</i>	¹	0:30	
4 – Extensão	72	2:00	
5 – Desnaturação	94	0:30	20
6 – <i>Annealing</i>	²	0:30	
7 – Extensão	72	2	
8 – Desnaturação	94	0:30	
9 – <i>Annealing</i>	³	0:30	10
10 – Extensão	72	2:30	
11 – Extensão	72	7	1
12	4	∞	1

¹ - Variável, entre 60 e 65 °C ; ² - Variável, entre 56 e 62 °C; ³ - Variável, entre 52 e 60 °C.

Tabela XXIII. Programa de PCR sem *touchdown*, usado nas reacções de amplificação com *Expand Long Range PCR System*.

Etapa	Temperatura (° C)	Duração (minutos)	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2:00	1
Desnaturação	94	0:10	10
Annealing	*	0:30	
Extensão	68	3:00	
Desnaturação	94	0:15	20
Annealing	*	0:30	
Extensão	68	3:20 por ciclo	
Extensão final	68	7:00	1
	4	∞	1

* Temperatura de *annealing*

Tabela XXIV. Programa de PCR *touchdown*, usado nas reacções de amplificação com *Expand Long Range PCR System*.

Etapa	Temperatura (° C)	Duração	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2:00	1
Desnaturação	94	0:10	10
Annealing	¹	0:30	
Extensão	68	3:00	
Desnaturação	94	0:15	15
Annealing	²	0:30	
Extensão	68	*	
Desnaturação	94	0:30	10
Annealing	³	0:30	
Extensão	68	*	
Extensão final	68	7:00	1
	4	∞	1

¹ - Variável, entre 60 e 65 °C ; ² - Variável, entre 56 e 62 °C; ³ - Variável, entre 52 e 60 °C.

* Variável, entre 2 e 3 minutos

III. Avaliação da expressão génica de mediadores da actividade imunológica, antes, e em diferentes tempos de tratamento.

1. Pacientes em estudo

Para o estudo da expressão génica de mediadores imunológicos em PMBC, procedeu-se à quantificação relativa da expressão de 21 genes, nomeadamente, FAS-L, STAT-6, GZMB, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, CXCL10, CXCL9, TGF- β 1, SOCS-1, TNF- α , IL-18, CCL3, IL-8, IFIT1, IRF2, IRF8, IFI27, OAS3. Partiu-se de uma população de catorze pacientes (tabela XXV), para os quais havia sido feita a colheita de amostras antes do tratamento (tempo 0), e no 1º e no 3º mês de tratamento. Contudo, nem todas as colheitas se encontravam disponíveis, pelo que foram submetidas à análise doze colheitas do tempo 0, nove do 1º mês e dez do 3º mês. Das colheitas relativas ao tempo 0, seis pertenciam a pacientes respondedores, e duas a não respondedores. No que refere ao 1º mês, cinco colheitas eram provenientes de pacientes respondedores e duas de não respondedores. Relativamente ao 3º mês, quatro pertenciam a indivíduos respondedores e duas a não respondedores. Foram também avaliadas amostras de onze pessoas saudáveis, que foram utilizadas como controlo (tabela XLIII, anexos).

Tabela XXV. Pacientes envolvidos no estudo da expressão genica de mediadores imunológicos (sexo, idade, resposta, e amostras disponíveis).

Pacientes	Sexo	Idade	Resposta	Tempos de tratamento para os quais existem amostras disponíveis
49480	M	40	Não Respondedor	1º mês e 3º mês
106348	M	45	Não Respondedor	3º mês
206541	M	48	Não Respondedor	Tempo 0 e 1º mês
206543			Respondedor	Tempo 0 e 1º mês
206567	F	41	Respondedor	Tempo 0, 1º e 3º mês
207358	F	64	Respondedor	Tempo 0, 1º e 3º mês
207701	M	44	Respondedor	Tempo 0, 1º e 3º mês
207838	M	41	Respondedor	Tempo 0, 1º e 3º mês
208142	M	36	Não Respondedor	Tempo 0, 1º e 3º mês
208663	M	25	Respondedor	Tempo 0
211380	M	36	Respondedor	Tempo 0 e 3º mês
212889	M	41	Respondedor	Tempo 0 e 1º mês
215828	M	41	Respondedor	Tempo 0 e 3º mês
217169	M		Não Respondedor	Tempo 0 e 3º mês

2. Extracção de RNA de amostras em tubos PAX GENE

Para o isolamento do RNA total a partir das amostras de sangue, recorreu-se ao *PAXgene Blood RNA System*[®] (PreAnalytiX, QIAGEN)

2.1. Princípio

O sistema *PAXgene Blood RNA System*[®] destina-se à colheita, conservação e transporte de amostras de sangue, à estabilização de RNA intracelular em tubos de amostra fechados, assim como ao isolamento e à purificação de RNA intracelular de sangue total para RT-PCR. O uso deste sistema é particularmente importante, na medida em que a degradação do RNA, provocada pela expressão induzida de alguns genes, após a colheita do sangue, torna impossível a realização de estudos fiáveis da expressão genética. Assim, o *PAXgene Blood RNA System* é constituído por tubos de colheita de sangue (*PAXgene Blood RNA Tubes*) e pelo kit de isolamento de ácidos nucleicos (*PAXgene Blood RNA Kit*). Os *PAXgene Blood RNA Tubes* que contêm uma composição de reagentes que resulta na protecção das moléculas de RNA da degradação por RNases, e reduz ao mínimo as modificações da expressão genica ex-vivo. (42)

2.2. Procedimento

A extracção de RNA com o *PAXgene Blood RNA System*[®] efectuou-se de acordo com o os passos seguidamente descritos, e encontra-se esquematizada na figura 10.

- i. Inicialmente, homogeneizou-se o conteúdo dos tubos *PAXGene* (vortex *Heidolph REAX Top*), e transferiram-se cerca de 3 mL do conteúdo de cada tubo *PAXGene* (cada tubo contém 9,5 mL) para tubos *Falcon*[™] (*BD Biosciences*) de 15 mL.
- ii. Centrifugaram-se os tubos *Falcon*[™] durante 10 minutos a 3000 – 5000 x g (*Sigma 4K15 Centrifuge, UK*), de modo a formar um *pellet* de ácidos nucleicos.
- iii. Descartou-se o sobrenadante, e efectuou-se uma lavagem do *pellet* com RNase free water, tendo-se efectuado uma nova centrifugação.
- iv. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 350 µL de tampão de ressuspensão BR1 (fornecido com o kit), tendo-se transferido o conteúdo para tubos de processamento de 2 mL.
- v. As amostras foram, de seguida, submetidas a uma série de passos, no sentido da obtenção do RNA. Esta fase efectuou-se de forma automatizada, com recurso ao

QIAcube®. O processo envolve a digestão de proteínas, por acção da proteinase K, e a ligação selectiva do RNA a uma membrana de gel de silício *PAXgene*. Este passo é efectuado na presença de etanol, de forma a otimizar as condições de ligação, sendo que, durante uma curta centrifugação, o RNA se liga à membrana, à medida que os contaminantes a atravessam e são removidos por vários passos de lavagem eficiente. (PreAnalytiX 2008)

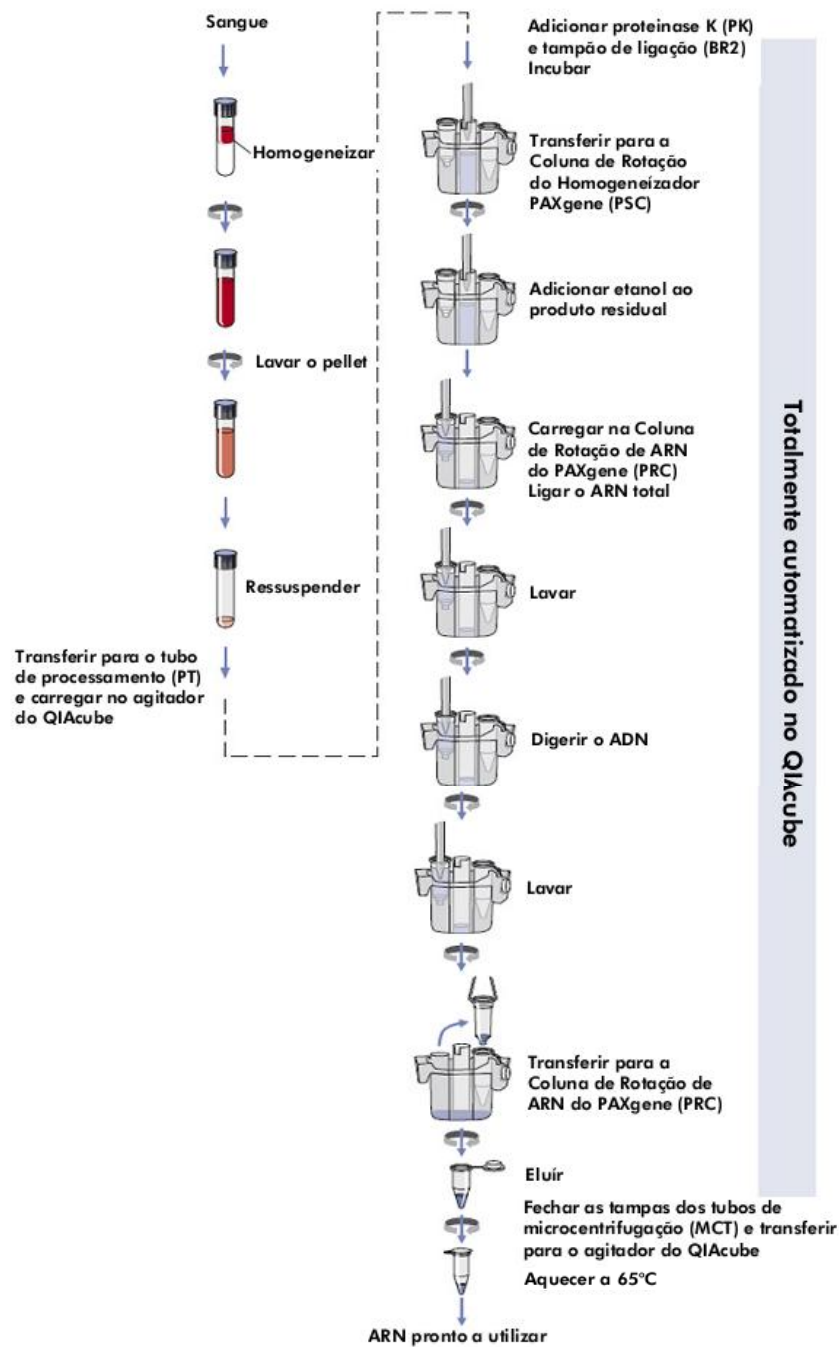


Figura 10. Passos do método de extração de RNA total, a partir de amostras de sangue, com o kit *PAXgene® Blood RNA* (PreAnalytiX, QIAGEN).

Antes de serem armazenadas a -80°C , as amostras de RNA purificado foram submetidas a uma desnaturação, a 65°C durante 5 min.

Na preparação das amostras, usaram-se micropipetas 200 e 1000 (*eppendorf*), assim como pontas com filtro de 200 e 1000 μL (*eppendorf*). Usaram-se também pipetas graduadas de 5 mL (*eppendorf*). Usaram-se rotores de plástico, assim como colunas de rotação e de homogeneização, fornecidas com o kit *PAXgene® Blood RNA (PreAnalytiX, QIAGEN)*.

3. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi levada a cabo com recurso ao kit *SuperScript™ First-Strand SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen™, life Technologies)*

3.1. Princípio

O kit é composto por duas misturas, a *RT Enzyme Mix* e a *2X RT Reaction Mix*, e pela RNase H da *E. coli*. A *RT Enzyme Mix* inclui a transcriptase reversa (*SuperScript® III Reverse Transcriptase*) e a RNase OUT™. A *2X RT Reaction Mix* contém oligo(dT)₂₀ (2,5 μM), random hexamers (2,5 ng / μL), 10 mM MgCl_2 , e dNTPs.

A enzima transcriptase reversa contida neste kit (*SuperScript® III Reverse Transcriptase*) é uma versão da MMLV RT, que possui as mesmas propriedades descritas para a M-MLV RT do sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR*. Como a *SuperScript® III Reverse Transcriptase* não é significativamente inibida por RNA ribossomal e de transferência, pode ser utilizada para sintetizar cDNA a partir do RNA total. (Invitrogen™ 2006)

O kit compreende dois tipos de primers, nomeadamente, oligo(dT)₂₀, e *random hexamers*. Os primeiros consistem em oligonucleótidos de timina, e permitem a síntese de cDNA a partir do mRNA, emparelhando ao nível da cauda de nucleótidos de adenina, presente na extremidade 3' do mesmo. Os *random hexamers* referem-se a *random primers*, constituídos por seis nucleótidos. Estes primers podem ligar-se a qualquer secção da cadeia molde de RNA. (Invitrogen™ 2006)

3.2. Procedimento

Na realização do processo, adicionou-se, por reacção, 10,5 μL de *2X RT Reaction Mix*, 1,5 μL de (*SuperScript® III Reverse Transcriptase*), e 8 μL de RNA, num tubo de reacção de 0,5 mL.

A mistura foi, de seguida, submetida a um programa de temperaturas descrito na tabela XXVI, no termociclador de tampa aquecida da *Peltier Thermal Cycler, DNA Enginer®* da *Biorad*.

Tabela XXVI. Programa de temperatura para a síntese de cDNA com o kit *SuperScript® First-Strand SuperMix for qRT-PCR*.

Etapa	Temperatura (°C)	Duração (min)
<i>Annealing</i>	25	10:00
Transcrição reversa	50	30:00
Inactivação da transcrição reversa	85	5
	4	∞

No final da reacção de síntese, procedeu-se à adição de 1 µL de RNase H por reacção, de forma a degradar o molde de RNA, submetendo-se a amostra a 37 ° C durante 20 minutos.

As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C.

Na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200 (*ependorf*), assim como pontas com filtro de 10, 20 e 200 µL (*ependorf*). A reacção síntese de cDNA ocorreu em tubos de 0,5 mL.

4. Amplificação e quantificação relativa do cDNA - Real time PCR

De forma a proceder a uma quantificação relativa da expressão génica de diferentes mediadores imunológicos, recorreu-se ao PCR em tempo real. Este método associa a metodologia empregada num PCR tradicional a um sistema de detecção e quantificação de fluorescência. O processo permite amplificar, detectar e quantificar o DNA numa única etapa. (43)

Analisou-se a expressão de 21 genes, nomeadamente, FAS-L, STAT-6, GZMB, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, CXCL10, CXCL9, TGF-β1, SOCS-1, TNF-α, IL-18, CCL3, IL-8, IFIT1, IRF2, IRF8, IFI27, OAS3. Como genes de referência, usaram-se o B2M (beta-2-microglobulina) e 18S (subunidade 18S do rRNA).

4.1. Princípio

Podem elaborar-se dois tipos de real-time PCR, nomeadamente, o que se baseia numa sonda marcada (*TaqMan*), e o que se baseia num intercalador marcado (*SybrGreen*). No projecto em questão, optou-se pelo uso do método *SybrGreen* (**Erro! A origem da referência**

não foi encontrada.). O real-time PCR baseado no método *SYBR Green*, requer o uso de pequenas moléculas (fluorocromo *SYBR Green*), que se ligam aos produtos da reacção de PCR, através da intercalação nos produtos de DNA de cadeia dupla formados. Quando o fluorocromo é adicionado à amostra, o mesmo liga-se imediatamente ao DNA de cadeia dupla presente. Durante a realização do PCR, uma DNA polimerase amplifica a sequência alvo, formando-se novos produtos. O fluorocromo liga-se a cada novo produto de DNA em cadeia dupla. Desta forma, à medida que o PCR prossegue, e uma vez que o fluorocromo se liga a todas as moléculas de DNA de cadeia dupla, o resultado é um aumento da intensidade de fluorescência (Biosystems). O método *TaqMan* é mais preciso e confiável; no entanto, apresenta custos superiores.

Na presença do produto amplificado, os fluorocromos, após serem submetidos a uma fonte de luz, emitem um sinal (fluorescência). O sinal será proporcional à quantidade de produto sintetizado que, por sua vez, será proporcional à quantidade inicial de sequências alvo presentes na reacção de amplificação. Os sinais de fluorescência emitidos, à medida que o produto é amplificado, são detectados por um sistema óptico e analisados através de um software específico, sendo expressos graficamente (sinais de fluorescência versus número de ciclos). Este processo permite monitorar, em tempo real, a cinética e a eficiência da reacção de amplificação. (Biosystems)

O método de quantificação a escolher, depende da sequência alvo, da gama de quantidades de mRNA esperada num dado tecido, do grau da precisão necessária, e do facto de ser necessário efectuar uma quantificação relativa ou absoluta.

No processo em questão efectuou-se uma quantificação relativa. Este processo não requer a elaboração de curvas-padrão, baseando-se nos níveis de expressão de um gene específico versus um ou mais genes de referência; isto é, determinam-se alterações dos níveis de mRNA, ao longo de múltiplas amostras, expressando-as relativamente aos níveis do RNA relativo a um gene, tomado como controlo interno. Este gene de referência é, normalmente, um *housekeeping gene*. Os *housekeeping genes* encontram-se presentes em todos os tipos de células nucleadas, uma vez que são necessários para a sobrevivência básica da célula. A síntese de mRNA destas células é considerada estável e segura em vários tecidos, mesmo sob tratamentos experimentais. (Pfaffl 2001)

4.2. Procedimento

Para a realização de PCR em tempo real, usou-se o cDNA sintetizado como molde para várias PCRs, de acordo com os genes a testar. Preparou-se uma mistura (de acordo com a

tabela X) com a SYBR® Green PCR Master Mix (QuantiTect®, QIAGEN), os primers, e água livre de RNase. Posteriormente, distribuíram-se 7 µL pelos poços de uma placa, aos quais se adicionaram 3 µL da amostra de cDNA, perfazendo um volume total de 10 µL por poço.

Tabela XXVII. Reagentes e respectivas quantidades utilizados na reacção de amplificação relativa ao método de PCR em tempo real.

Reagentes	Volume por reacção (µl)	Concentração final
2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix	5	1x
10x <i>geNorm</i> Primer Mix I (QIAGEN)	1	1x
<i>RNase free water</i>	1	—

Da 2x Quantitect SYBR Green PCR Master Mix fazem parte os seguintes componentes:- *HotStarTaq® DNA Polymerase; QuantiTect SYBR Green PCR Buffer;* mistura de dNTPs; SYBR Green I; e *RNase-Free Water*.

A enzima *HotStartTaq DNA Polimerase* encontra-se inactiva à temperatura ambiente, sendo activada a uma temperatura de 95 °C. Este facto previne a formação de produtos inespecíficos, assim como o emparelhamento de primers, durante a reacção. (QIAGEN 2011)

As reacções de amplificação, bem como a aquisição e processamento de dados, que permitem uma posterior análise da mesma, ocorrem no termociclador *Light Cycler 480* da Roche, em associação com o software, de acordo com o programa descrito na tabela XXVIII.

Tabela XXVIII. Programa seguido nas reacções de amplificação, no PCR em tempo real.

Etapa	Temperatura (° C)	Duração (min)	Nº de Ciclos
Activação	95	10	1
Desnaturação	95	0:10	50
<i>annealing</i>	55	0:20	
extensão	72	0:30	

Na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200, e 1000 (*eppendorf*), assim como pontas de filtro 10, 20, 200 e 1000 µL (*eppendorf*).

Para calcular a expressão de um determinado gene em relação a outro de referência, encontram-se estabelecidos vários modelos matemáticos. No trabalho em questão, efectuou-se uma quantificação relativa, com base no método de Pfaffl, a partir dos valores de Ct (*cycle threshold*), ou seja, o ciclo correspondente ao momento em que começa a ocorrer amplificação. A análise matemática dos dados, bem como a elaboração de gráficos, foram efectuadas com a ajuda dos programas *geNorm*, *Microsoft Excel 2007*, e *IBM SPSS Statistics 19*.

IV. Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento

1. Doentes em estudo

Avaliou-se a presença de dois polimorfismos (SNPs), rs8099917 e rs12979860, em 19 pacientes infectados com o VHC, 12 respondedores e 7 não respondedores (tabela XXIX).

Tabela XXIX. Pacientes envolvidos no estudo dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860, associados ao gene IL28B (Sexo, idade, genótipo e resposta à terapêutica).

Nº interno	Sexo	Idade	Genótipo	Resposta à terapêutica
98385	M	30	1b	Não Respondedor
99385	M	30	1b	Não Respondedor
99386	M	42	3a	Respondedor
103049	M	51	4a	Não Respondedor
104301	F	44		Respondedor
105886	M	49	1a	Respondedor
106348	M	45	1b	Não Respondedor
106370	M	43	1a	Respondedor
107117	M	38	1b	Não Respondedor
206543			1a	Respondedor
206567	F	41	1b	Respondedor
207358	F	64	1b	Respondedor
207701	M	44	1a	Respondedor
207838	M	41		Respondedor
208142	M	36	1a	Não Respondedor
211380	M	36	4	Respondedor
212889	M	41	1a	Respondedor
215828	M	41	1a	Respondedor
217169	M		1a	Não Respondedor

2. Procedimento

Procedeu-se à amplificação das regiões do genoma, onde se encontram inseridos os polimorfismos. Como tal, a partir de amostras de DNA previamente extraídas, realizaram-se duas reacções de PCR por paciente, uma para cada polimorfismo. Os reagentes utilizados, bem como as respectivas quantidades, encontram-se descritos na tabela XXX, e são iguais para as duas reacções, à excepção dos primers (Tabela XXXI). Por cada reacção, adicionou-se 23 μL da mistura e 2 μL de DNA, perfazendo um volume de 25 μL . As condições de PCR encontram-se indicadas na tabela XXXII.

Tabela XXX. Reagentes, e respectivas quantidades, utilizados na PCR relativa aos polimorfismos associados à região IL28B.

Reagentes	Volume por reacção (μL)	Concentração final
5x tampão de reacção da Taq Polimerase ^a	5	1x
2,5 mM mistura dNTP's	2,5	0,25 mM
25mM MgCl ₂ ^a	1,5	1,5 mM
Primer <i>forward</i> (10 μM) ^b	1,25	0,5 μM ^b
Primer <i>reverse</i> (10 μM)	1,25	0,5 μM
2.5U/ μL Taq DNA Polimerase ^a	0,2	0,02
H ₂ O RNASE free ^a	11,3	—

^a Promega Madison

^b no caso do polimorfismo rs12979860, primer forward (3,3(3) μM), a uma concentração final de \approx 0,17 μM .

Tabela XXXI. Primers usados nas reacções de amplificação das regiões relativas à localização dos polimorfismos associados ao gene IL28B.

	Primer	Sequência do primer
Pesquisa do polimorfismo rs8099917	<i>Forward</i>	5'-TGAACCCACACACTCTGCAGT -3'
	<i>Reverse</i>	5'-ATCCTAAATTGACGGGCCATC -3'
Pesquisa do polimorfismo rs12979860	<i>Forward</i>	5'-CCGCTAAGCAGGACAGATTGG -3'
	<i>Reverse</i>	5'-AGGCGCCTCTCCTATGTC -3'

Tabela XXXII. Programa seguido nas amplificação das regiões relativas à localização dos polimorfismos associados ao gene IL28B.

Etapa	Temperatura (° C)	Duração (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação inicial	96	5	1
Desnaturação	96	0:30	9
<i>Annealing</i>	68	1	
Desnaturação	96	0:30	9
<i>Annealing</i>	65	1	
Desnaturação	96	0:30	19
<i>Annealing</i>	60	1	
Extensão	72	1	
Extensão final	72	7	
	4	∞	

Após as PCRs, realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 2 %. Posteriormente, procedeu-se à purificação dos produtos de PCR com ExoSAP, e aos restantes passos implícitos no processo de sequenciação, de acordo com o que foi anteriormente descrito. A análise dos polimorfismos foi efectuada com recurso ao programa *Seqscape* v. 2.5

Na preparação das misturas usaram-se tubos de 1,5 mL ou 0,5 mL. Para as pipetagens, usaram-se micropipetas 10, 20 e 200 (*ependorf*), assim como pontas de filtro 10, 20, 200 e 1000 µL (*ependorf*). As reacções de amplificação ocorreram em tubos de 200 µL, dispostos em tiras de 8, no termociclador de tampa aquecida *Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems™)*

Resultados e Discussão

I. Estudo da variabilidade do genoma do VHC

1. Estudo da variabilidade da região 5'UTR

A região 5'UTR do genoma do VHC encontra-se envolvida ao nível da replicação (domínios I e II) viral, e assume uma elevada importância ao nível da tradução independente de cap, nomeadamente ao nível do IRES, que abrange os domínios II a IV. (Brown, Zhang et al. 1992) (Friebe, Lohmann et al. 2001) É também o local mais conservado do genoma do vírus, observando-se um grau de conservação superior a 90 % entre as sequências dos diferentes genótipos do VHC. (Bukh, Purcell et al. 1992)

No presente estudo, foi amplificada e sequenciada uma porção de 244 nucleótidos da 5'UTR (nt 67 a 311), que abrange parte do domínio II e termina no início do subdomínio III_f, e se situa no IRES. O estudo foi efectuado em dezoito pacientes, dez respondedores e oito não respondedores (Tabela XLIII, anexos), dos genótipos 1a, 1b e 3a (embora haja apenas um paciente 3a).

A região do genoma em análise é, normalmente, bastante conservada. Como tal, também nos resultados obtidos, o nº de mutações por paciente não foi muito elevado (≈ 6). Das mutações observadas, a maioria encontrava-se associada à presença de duas bases no mesmo local da sequência. Embora não se tenha efectuado a quantificação de quasispecies, este facto pode estar associado à presença de populações virais um pouco distintas entre si. Em certos casos, o surgimento de quasispecies ao longo do tratamento pareceu estar associado a uma resposta negativa. (Gupta, Subramani et al. 2006) De facto, os pacientes não respondedores apresentam um valor médio de mutações associadas à presença de duas bases no mesmo local da sequência um pouco superior, relativamente aos respondedores (tabela XXXIII; figura 11). No entanto, esta análise foi efectuada a partir de amostras recolhidas apenas antes do tratamento (no sentido de obter a maior quantidade de material viral possível), pelo que não se pode retirar uma conclusão assertiva.

Tabela XXXIII. Média e desvio padrão do número de mutações, para doentes respondedores e não respondedores.

Tipo_de_Resposta		Nº_total_de_Mutações	Nº_de_mutações_Domínio_III	Nº_de_mutações_Duas_bases_diferentes_no_mesmo_ponto_da_sequência
Respondedor	Mean	5,6000	3,9000	3,7000
	N	10	10	10
	Std. Deviation	1,57762	1,72884	1,49443
Não Respondedor	Mean	6,1250	4,2500	4,3750
	N	8	8	8
	Std. Deviation	1,80772	1,83225	1,59799
Total	Mean	5,8333	4,0556	4,0000
	N	18	18	18
	Std. Deviation	1,65387	1,73111	1,53393

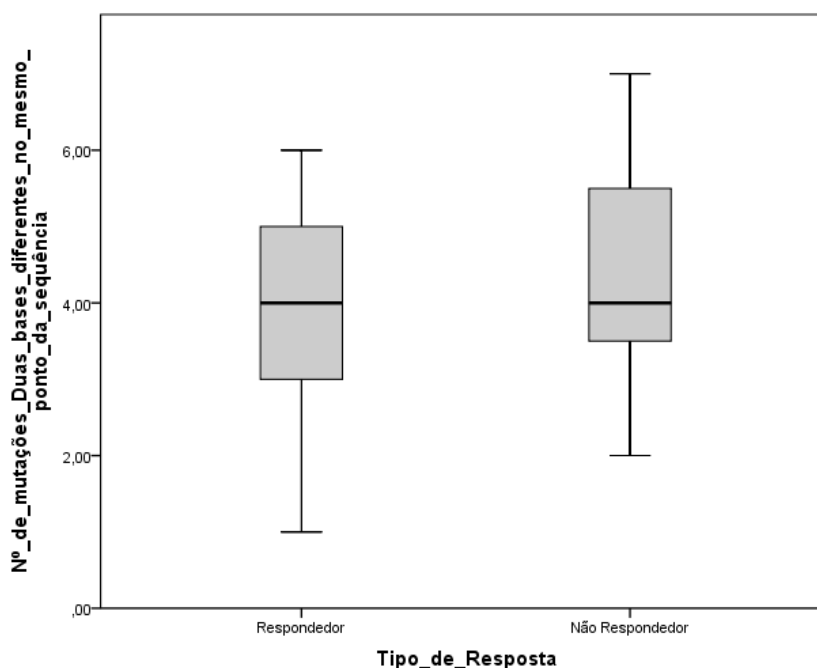


Figura 11. Número de mutações associadas à presença de duas bases no mesmo local da sequência, em pacientes respondedores e não respondedores.

Observou-se igualmente que as mutações observadas ocorriam principalmente ao nível do domínio III da 5'UTR. O domínio III revela-se a região mais activa da 5'UTR, no que concerne

à ligação RNA-proteína, formando várias estruturas em *stem-loop*, mediante interacções de alta afinidade com proteínas celulares (Buratti, Tisminetzky et al. 1998) (Otto and Puglisi 2004) (El Awady, Azzazy et al. 2009). O surgimento de mutações neste domínio parece estar algo associada com o insucesso da resposta ao tratamento. (Gupta, Subramani et al. 2006) No entanto, nos resultados apresentados, em média, os pacientes não respondedores apresentam um nº de mutações no domínio III não muito superior ao mostrado por pacientes respondedores. Por outro lado, e mais uma vez, estes resultados correspondem a amostras recolhidas antes do tratamento. Para além disso, Awady (El Awady, Azzazy et al. 2009) mostra que é principalmente a localização das mutações no domínio III, ao invés da sua frequência, que pode influenciar a resposta dos pacientes. Nomeadamente, as mutações ao nível do *loop* IIIa/b parecem destabilizar a estrutura do RNA, enquanto que as verificadas ao nível do *loop* IIIId terão um efeito estabilizador. No entanto, apenas as sequências de um paciente não respondedor apresentou 3 mutações ao nível do *loop* IIIa/b. Observa-se, contudo, que a mutação ao nível da posição 183 ocorre em 4 pacientes não respondedores, embora surja também em dois respondedores. Não se observaram mutações nestes locais, exceptuando um paciente não respondedor. Contudo, serão necessários mais estudos, efectuando a análise das sequências ao longo de diferentes tempos de tratamento, e se possível, avaliando a composição em quasispecies das amostras.

2. Estudo da variabilidade da região HVR-1

A variabilidade genética é um factor bem característico do VHC, e a heterogeneidade das quasispecies parece estar envolvida na persistência viral, no tropismo celular, na patogénese da doença hepática, e na resposta à terapia com base em IFN- α . [revisito em (Sandres, Dubois et al. 2000) Nomeadamente, o carácter heterogéneo deste vírus encontra-se particularmente evidenciado ao nível da região HVR1. (Weiner, Geysen et al. 1992) (Sandres, Dubois et al. 2000)] Vários estudos sugerem que esta região da glicoproteína E2 se encontra particularmente associada ao desenvolvimento de anticorpos contra as glicoproteínas de envelope do VHC (Isagulants, Widell et al. 2002) (Bartosch, Bukh et al. 2003), sofrendo mutações ao longo do tempo, como resultado da pressão da resposta imune. (Le Guen, Squadrito et al. 1997) (Sandres, Dubois et al. 2000)

No trabalho apresentado, efectuou-se a sequenciação da região HVR-1 de pacientes com genótipo 1b, no sentido de dar continuidade ao trabalho anteriormente iniciado por Ângela

(Ângela 2010). No entanto, das 5 amostras 1b disponíveis, apenas se conseguiu obter amplificação da região HVR1 para 3, pertencendo uma a um paciente não respondedor, e as outras duas a pacientes respondedores.

Estudos anteriores evidenciam uma predisposição para o surgimento de mutações não sinónimas na região HVR1, o que foi já reportado por Ângela (Ângela 2010). Também Farci *et al* observou, na HVR1, uma maior tendência para o desenvolvimento de mutações não sinónimas, o que sugere uma selecção positiva. (Farci, Strazzeria et al. 2002) Também no presente estudo se observou um maior número de mutações não sinónimas; particularmente, o número de mutações não sinónimas foi superior no paciente não respondedor (tabela XXXIV e figura 13). As alterações na sequência de 27 aminoácidos da HVR1, relativamente à sequência de referência HCV-1010 (Nº de acesso no GenBank: EF407459.1), encontram-se indicadas na tabela XXXV.

Tabela XXXIV. Nº de mutações sinónimas e não sinónimas por paciente, o tipo de resposta.

Paciente	Tipo de resposta à terapia	Nº de mutações sinónimas	Nº de mutações não sinónimas
99385	Não respondedor	1	35
206567	Respondedor	5	34
207358	Respondedor	8	33
	Total	14	102

Tabela XXXV. Alterações ao nível das sequências aminoacídicas correspondentes à região HVR1, e comparação com a sequência de referência.

Sequência de aminoácidos da região HVR1 (sequência de referência) ¹	384 – KTYVTGEAPARAALSMVSLFSSGPTQK – 410
Doente	Região da sequência de aminoácidos presentes nos pacientes, correspondente à HVR-1 (384-410 aa) ¹
99385	HPH DG* DRS PHH PWV CEP *QT WAG SEN
206567	G*S TI* AIQ *HT IWG FT* **T P** S*N
207358	A*S TI* GRQ *HI TSG L** *** P*A Q*R

¹ sequência de referência HCV-1010 (Nº de acesso no GenBank: EF407459.1)

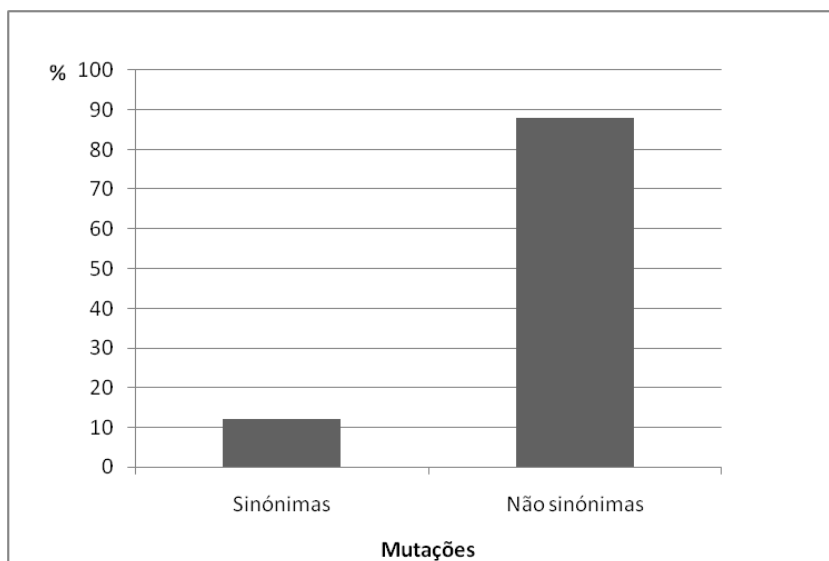


Figura 12. Percentagem de mutações sinónimas vs não sinónimas.

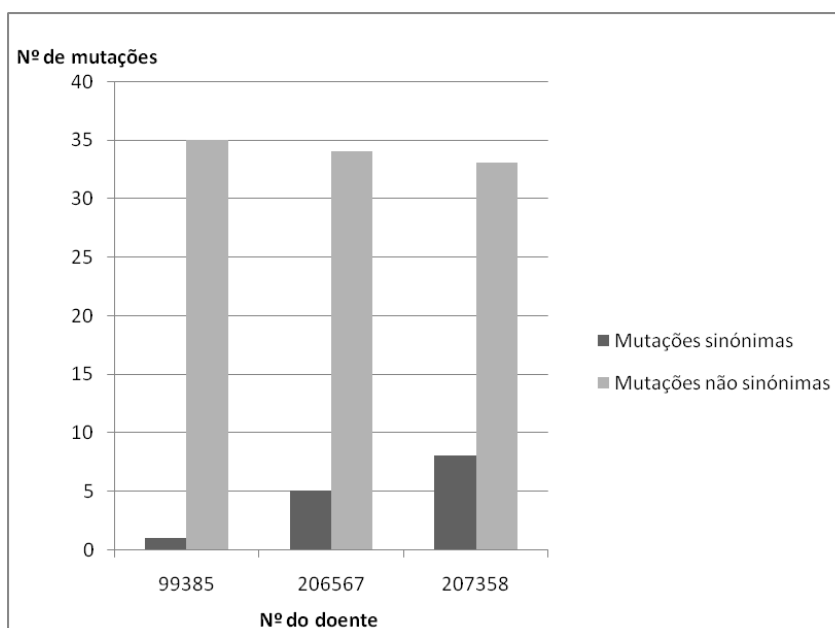


Figura 13. Percentagem de mutações sinónimas vs não sinónimas.

Num estudo efectuado por *Sandres et al*, observou-se que, para além de as mutações não sinónimas serem mais frequentes relativamente às sinónimas, esta tendência mostrou-se acentuada em pacientes do sexo feminino. Contudo, dos três pacientes em estudados, o paciente não respondedor é o único do sexo masculino, o que poderia dar a entender que o maior número de mutações não sinónimas pudesse estar negativamente relacionado com a

resposta ao tratamento. No entanto, dado o baixo número de pacientes, não é possível tirar conclusões. Por outro lado, *Sandres et al* mostra uma proporção de mutações não sinónimas superior em pacientes respondedores, o que iria contra a hipótese anterior.

Observou-se, em modelos de previsão de estrutura secundária (programa PSipred (v. 3.0)), que o paciente não respondedor foi o único em cujas mutações nas sequências virais resultaram na alteração estrutural da região HVR, na proteína E2. Nomeadamente, houve uma região de estrutura em hélice que passou a coil (figura 14). Provavelmente, na porção da sequência assinalada na figura, o desaparecimento das alaninas, e o surgimento de dois resíduos de histidina consecutivos levarão a uma destabilização da hélice a pH fisiológico.

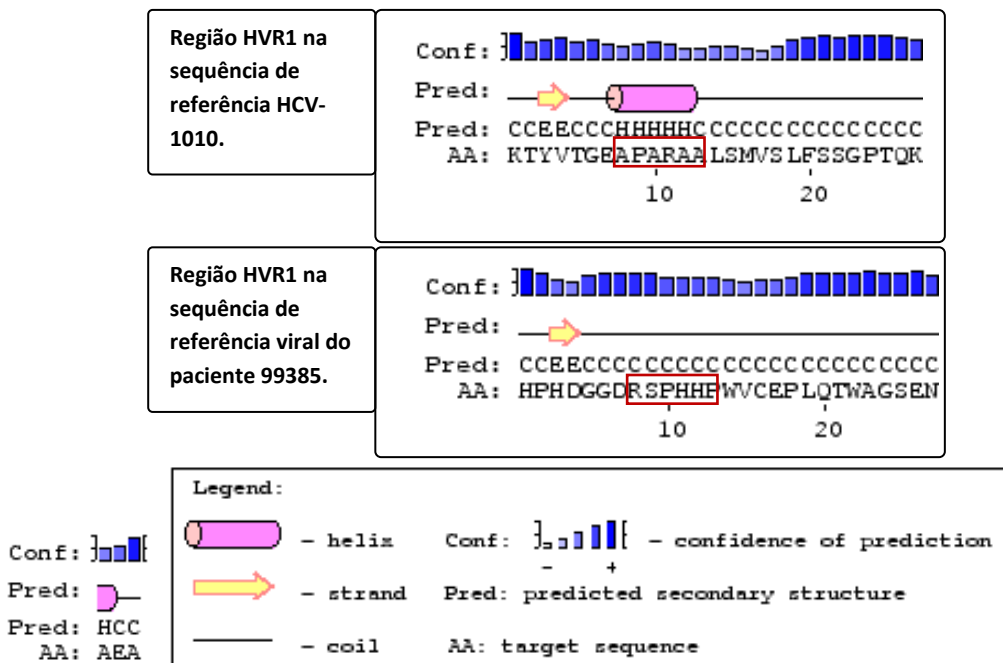


Figura 14. Alterações na sequência de aminoácidos na região HVR1 (assinaladas com um rectângulo vermelho) provocam alteração na estrutura secundária, ao nível da proteína E2.

3. Estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3

As proteínas não estruturais NS5A e NS3 parecem estar associadas à persistência crónica da infecção pelo VHC no organismo humano. Nomeadamente, é referido em vários estudos que as proteínas em questão encontram-se envolvidas nos processos de replicação do RNA

genómico do VHC, intervêm nos mecanismos de apoptose, e interferem ao nível da evasão da resposta imunitária inapta. (Fischer, Baumert et al. 2007) (Macdonald and Harris 2004) Particularmente, a interferência destas moléculas nos mecanismos de resistência à acção de interferão, associada à enorme variabilidade genética do vírus, parece assumir um papel crítico na resposta ao tratamento actualmente em prática (interferão α peguilado e ribavirina). [revisto em (Rehermann 2009)] Parece ocorrer uma prevalência de mutações não-sinónimas ao nível da NS5A, em pacientes não respondedores, relativamente a respondedores. (Bittar, Jardim et al. 2010) Por outro lado, a enorme capacidade mutacional ao nível da NS3 tem dificultado a acção de DAAs, tal como foi já anteriormente referido. Desta forma, seria interessante avaliar o perfil de mutações destas regiões em pacientes com hepatite C crónica e comparar com os estudos já existentes.

Não foi possível, no entanto, obter amplificação para estas duas regiões, apesar dos esforços efectuados. Relativamente à primeira estratégia de amplificação, o principal problema estaria, provavelmente relacionado com o elevado tamanho dos produtos de amplificação, uma hipótese igualmente possível para as primeiras rondas de PCR na estratégia 2. Embora se tenha experimentado uma mistura de DNA polimerases do *Expand Long Range PCR System*, (Roche), sistema que está preparado para a amplificação de fragmentos de dimensões bastante razoáveis (as DNA polimerases do *Expand Long Range PCR System* permitem a amplificação de fragmentos até cerca de 20 kb, estas capacidades são reveladas, no entanto, para DNA de genoma humano (Roche). Por outro lado, observou-se a presença de produtos inespecíficos ao nível da amplificação com este sistema, (tentou-se sequenciar um produto que aparecia na electroforese, apesar deste parecer um pouco difuso, mesmo após a purificação com ExoSAP; no entanto, obteve-se uma mistura de sequências com qualidade bastante fraca (resultado não apresentado) A *Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™, life technologies)* permite a obtenção de produtos mais específicos. No entanto, e mais uma vez, estas propriedades são previamente testadas para DNA genómico humano (technologies). Com esta enzima, apesar de não se ter observado inespecificidade, também não se observaram resultados. A obtenção de amplificação a partir do genoma do VHC pode apresentar alguns obstáculos.

Há pacientes com infecção crónica pelo VHC, que possuem cargas virais relativamente baixas (aqueles que têm elevadas hipótese de responder à terapia poderão possuir cargas inferiores a 400,000 IU/mL). Nomeadamente, com o kit usado, *MagAttract® Viral RNA M48* (QIAGEN), o rendimento depende da carga viral e não é, normalmente, superior a 1 µg (2010), sendo que o sistema *SuperScript™ III First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen) requer, supostamente, por reacção, mais de 1 µg de RNA. Logo, a concentração de RNA obtida após

extracção a partir de amostras de soro poderá ser um factor limitante. Contudo, a combinação destes dois métodos permitiu já obter, com sucesso, resultados para a amplificação de outras regiões do genoma do VHC, nomeadamente, da região HVR1, que foi efectuada neste estudo, e que já o havia sido da mesma forma num estudo anterior (Ângela). Por outro lado, a quantificação de RNA nos produtos de extracção não se torna uma opção viável, pois tal tornar-se-ia ambíguo. O RNA extraído no soro poderá conter, para além do RNA associado ao VHC, vestígios de RNA celular (*small* RNA, mRNA, etc.) (Akiyama 2012) ou RNA associado à infecção por outros vírus. Nas experiências efectuadas para a amplificação das regiões NS5A e NS3, efectuava-se, paralelamente, a amplificação de uma porção de 244 nucleótidos da região 5' UTR, segundo o método descrito na secção 1.1 do capítulo 2, de forma a confirmar a presença de RNA do VHC em condições que permitissem uma posterior amplificação. Este fragmento corresponde aos domínios mais conservados da região 5'UTR, sendo a amplificação desta zona um processo bem otimizado e usado em vários testes de diagnóstico e genotipagem (por exemplo, COBAS AMPLICOR™ HCV Test; Armored RNA®; VERSANT® HCV Genotype 2.0 Products (LiPA)).

A variabilidade genética do VHC é enorme, devido à acção da sua RNA polimerase dependente de RNA sem actividade de proofreading, que lhe proporciona uma grande capacidade mutacional, com uma taxa de inserção de erros, de cerca de 10^{-4} mutações por genoma por ciclo de replicação (Mathy, Ma et al. 2008). Desta forma, e quando se pretende amplificar regiões que não correspondam a zonas conservadas do genoma, há sempre a possibilidade de os primers não emparelharem nos devidos locais. É claro que se efectua um estudo com as sequências disponíveis nas bases de dados; no entanto, essas sequências correspondem a uma pequena fracção dos cerca de 130 a 170 milhões de casos de infecção (WHO), a nível mundial, sendo que as sequências a que se tem acesso para efeitos experimentais podem apresentar perfis mutacionais um pouco diferentes daquilo que seria de esperar.

Contudo, na literatura, há casos de sucesso na amplificação do genoma VHC associada às regiões NS5A e NS3 (Malta Fde, Medeiros-Filho et al. 2010) (Bartels, Zhou et al. 2008) (Ogata, Florese et al. 2003) (Zhou, Chan et al. 2011), sendo que, em grande parte, os estudos têm como objectivo clonar e subclonar posteriormente os produtos (Zhu, Lu et al. 1998) (Castelain, Khorsi et al. 2002) (Thibeault, Bousquet et al. 2004) (Veillon, Payan et al. 2007). Como tal, na segunda estratégia de amplificação, pensou-se em recorrer a primers já usados na literatura. No entanto, acabou-se por não se utilizar os primers encontrados, por algumas das razões seguidamente apresentadas.

- i. As estratégias de amplificação apresentadas eram diferentes, nomeadamente, por vezes amplificavam-se apenas determinadas zonas de cada região (Malta Fde, Medeiros-Filho et al. 2010) (Zhou, Chan et al. 2011).
- ii. Alguns autores não utilizaram o método de Nested PCR, pelo que os seus estudos apresentavam apenas um par de primers para cada região. (Zhang, Liang et al. 1999) (Thibeault, Bousquet et al. 2004)
 - iii. Havia a hipótese de combinar diferentes estudos, mas tornava-se difícil conseguir sobreposição, de forma a cobrir completamente as regiões. Nalguns estudos em que parecia ser possível efectuar uma combinação de primers, tendo em conta os locais amplificados, encontraram-se, por vezes, erros ao nível da sequência de algum dos primers (Malta Fde, Medeiros-Filho et al. 2010), ou diferenças duvidosas na diferença de temperatura de *melting* de alguns pares de primers (B1).

Desta forma, optou-se por se desenhar os primers, à medida da estratégia que se tinha em vista. A estratégia de amplificação apenas se testou para a região NS3, pois por motivos de tempo, acabou por não ser já possível proceder ao estudo das restantes regiões.

Futuramente, poder-se-ia testar uma DNA polimerase de alta fidelidade. Embora a *Platinum® Taq DNA Polymerase* utilizada confira já alguma especificidade adicional, na literatura é comum observar o uso de uma DNA polimerase de alta fidelidade associada a uma reacção de RT-PCR (Fridell, Qiu et al. 2010)

Por outro lado, pode optar-se pela escolha de determinados locais em cada uma das regiões, ao invés da análise da sequência completa. Nomeadamente, ao nível da ISDR na NS5A (como já referido, um local muito importante ao nível da evasão da resposta IFN, que apresenta uma grande diversidade mutacional), e de um dos domínios da NS3 (helicase ou protease).

Uma hipótese interessante seria efectuar a clonagem do genoma completo do VHC, processo para o qual existe já optimização (Rispetter, Lu et al. 1997) Desta forma, poder-se-iam obter vários clones contendo o genoma do VHC, o que permitiria, por um lado, poupar em amostras de soro, e por outro, obter um número de cópias de DNA mais elevado, e a partir do qual se efectuassem os testes com os primers específicos.

II. Avaliação da expressão génica de mediadores imunológicos

Os custos da terapia com Peg-IFN- α e ribavirina ainda são muito elevados, e têm-se efectuado esforços, no sentido de encontrar marcadores moleculares que possam ajudar a discriminar os pacientes que irão, ou não responder à terapia. No entanto, a os estudos efectuados relacionam-se principalmente com o perfil de expressão génica ao nível do fígado (Bieche, Asselah et al. 2005) (Asselah, Bieche et al. 2008), pelo que seria uma mais valia para os doentes investir na análise da expressão génica em células mononucleares do sangue periférico (PMBC), na medida em que tal não implica uma exploração invasiva. (Asselah, Bieche et al. 2009)

1. Genes estudados

No trabalho apresentado, procedeu-se ao estudo da expressão génica de mediadores imunológicos em PMBC. Como tal, procedeu-se à quantificação relativa da expressão de 21 genes, nomeadamente, FAS-L, STAT-6, GZMB, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, CXCL10, CXCL9, TGF- β 1, SOCS-1, TNF- α , IL-18, CCL3, IL-8, IFIT1, IRF2, IRF8, IFI27, OAS3 (tabela XXXVI). Os valores de expressão foram normalizados relativamente aos obtidos para os genes de referência 18S e B2M.

Os valores de média e desvio padrão obtidos para a expressão normalizada de cada gene encontram-se indicados na tabela XLIV (anexos) Devido ao baixo número de pacientes em análise, e principalmente quando divididos em grupos e subgrupos, de acordo com o tipo de resposta e / ou o tempo de tratamento, não foi possível efectuar testes de significância estatística. Desta forma, procede-se a uma discussão qualitativa dos resultados obtidos.

Tabela XXXVI. Genes envolvidos no estudo de expressão génica ao nível de PBMCs.

Gene	Função
STAT-6 [<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>]	Codifica a proteína STAT-6, envolvida na transdução e activação de sinal, e na sinalização de IL-4.
SOCS-1 [<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>]	Codifica a proteína SOCS-1, que pertence à família SOCS. A SOCS-1 encontra-se envolvida na regulação negativa de citocinas, através da via JAK/STAT3. Parece assumir um papel importante na regulação de IL-6.
FAS-L [<i>Fas ligand</i>]	Codifica a proteína transmembranar ligante de FAS. Encontra-se envolvida na indução de apoptose.
TNF- α [<i>Tumor necrosis factor</i>]	Codifica uma citocina proinflamatória, principalmente secretada por macrófagos. Encontra-se envolvida na regulação de múltiplos processos biológicos, tais como a proliferação celular, a apoptose, o metabolismo lipídico e a coagulação. Pode induzir a apoptose de certas linhas tumorais.
TGF- β 1 [<i>Transforming growth factor beta-1</i>]	Codifica uma proteína multifuncional, produzida por várias células. Encontra-se envolvida na diferenciação celular, e pode regular negativa ou positivamente a produção de outros factores de crescimento.
CXCL9 [<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>]	É um ISG. Codifica uma quimiocina que se liga ao receptor CXCR3. Embora a sua função não tenha ainda sido bem definida, sabe-se que é um agente quimiotáctico e que se encontra envolvida no tráfego de linfócitos T.
CXCL10 [<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>]	É um ISG. Codifica uma quimiocina que se liga ao receptor CXCR3. Pode levar à estimulação de monócitos, migração de células NK, e modular a expressão de moléculas de adesão.
CCL3 [<i>Chemokine (C-C motif) ligand 3</i>]	Codifica uma citocina que actua ao nível de respostas inflamatórias, através da ligação aos receptores CCR1, CCR4 e CCR5.
IFIT1 [<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>]	É um gene induzido por IFN, e a sua expressão é importante na resposta a vírus.
IFI27	É um ISG. Codifica uma proteína que se encontra envolvida em processos de morte celular, mediando a apoptose induzida por IFN.
OAS-3 [<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3</i>]	É um ISG. Codifica uma enzima que cataliza a produção de oligómeros de adenosina, que se ligam à RNase L. Desempenha um papel fundamental na inibição da síntese proteica e na resistência a infecções virais.
IRF-2 [<i>Interferon regulatory factor 2</i>]	Codifica uma proteína que inibe a expressão de IFN do tipo I, e dos genes MHC classe I induzidos por IFN. Encontra-se envolvido na regulação do ciclo celular.
IRF-8 [<i>Interferon regulatory factor 8</i>]	Codifica uma proteína produzida em células dendríticas e macrófagos, mas também o pode ser por linfócitos T e B. Em resposta à estimulação desencadeada por vários factores, entre eles a presença de PAMPs, o IRF8 induz a expressão de IL-12, citocina essencial na resposta Th1.
GZMB [<i>Granzima B</i>]	Codifica uma enzima produzida por CTL e células NK, necessária para a lise celular, na resposta mediada por células.
IL-2 [<i>Interleucina 2</i>]	Codifica uma interleucina produzida por células T, necessária para a proliferação de células T e outras actividades cruciais para a regulação de respostas imunes. Pode estimular, entre outras, células B, monócitos, e células NK.
IL-4 [<i>Interleucina 4</i>]	Codifica uma interleucina que participa no processo de activação de células B, induz a expressão de MHC-II em células B, e estimula a expressão e secreção de IgE e IgG1.
IL-6 [<i>Interleucina 6</i>]	Codifica uma interleucina com uma série de funções biológicas. A IL-6 encontra-se envolvida na fase aguda de resposta. Desempenha um importante papel ao nível da diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Actua como miocina.
IL-8 (ou CXCL8) [<i>Interleucina 8</i>]	Codifica uma proteína pertencente à família das quimiocinas CXC. A IL-8 é produzida por vários tipos de células, e funciona como agente quimiotáctico para neutrófilos, basófilos e células T. É um importante mediador da resposta inflamatória.
IL-10 [<i>Interleucina 10</i>]	Codifica uma citocina que é produzida principalmente por monócitos, e numa menor extensão por linfócitos. Esta citocina regula negativamente a expressão de citocinas Th1. Estimula a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos.
IL-12 A [<i>Interleucina 12A</i>]	Codifica uma citocina que actua como factor de crescimento para células T e NK, aumenta a actividade lítica, e estimula a produção de IFN- γ .
IL-18 [<i>Interleucina 18</i>]	Codifica uma citocina proinflamatória que participa na indução da resposta imune mediada por células.

1.1. STAT6

Em pacientes quer respondedores, quer não respondedores, a expressão de STAT-6 apresentou-se mais baixa no tempo 0, tendo subido no 1º mês de tratamento e voltado a descer no 3º. (figura 15) Estes resultados não vão, no entanto, de encontro ao que foi observado por Younossi (Younossi, Baranova et al. 2009), que mostrou uma expressão de STAT-6 mais elevada antes do tratamento, em pacientes que atingiram a SVR. Chen (Chen, Sun et al. 2011) mostrou que STAT-6 é activado após a infecção viral, mediante o reconhecimento de ácidos nucleicos virais, desencadeando um processo que leva à activação da resposta imune inata contra vírus. Desta forma, poderia fazer sentido que a expressão de STAT-6 fosse diminuindo ao longo do tratamento, à medida que o vírus fosse combatido com sucesso. No entanto, o local de infecção e replicação primário do VHC é o fígado, apesar de se suspeitar da ocorrência do fenómeno ao nível de células sanguíneas. (Brian W. J. Mahy 2010)

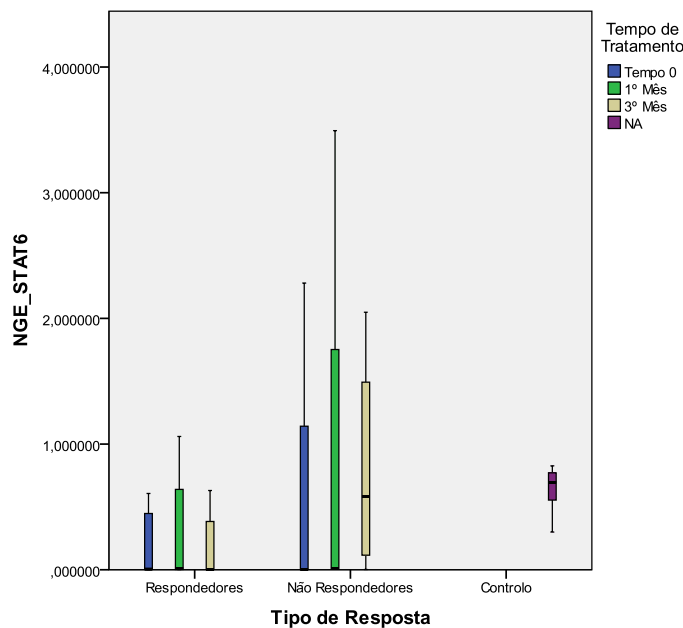


Figura 15. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de STAT-6 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

Por outro lado, a activação de STAT-6 é também desencadeada pela ligação de IL-4 ao respectivo receptor membranar, o que resulta numa polarização celular Th2 (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006) (Chen, Sun et al. 2011). No entanto, uma predominância da resposta Th2 parece não ser favorável à resolução do vírus, sendo característica de pacientes que desenvolvem uma infecção crónica (Rehermann and Nascimbeni 2005). Desta forma, pode

fazer sentido que os pacientes não respondedores apresentem uma expressão geral de STAT-6 superior à de respondedores. Observou-se, no 3º mês de tratamento, uma diminuição dos níveis de expressão de STAT6 para valores inferiores aos do tempo 0, em pacientes respondedores, o que pode estar relacionado com a diminuição da resposta Th1.

1.2. IL-4

Nos pacientes respondedores, a expressão de IL-4 apresentou-se bastante aumentada antes do tratamento, tendo diminuído drasticamente até ao 3º mês de tratamento. Em pacientes não respondedores, por outro lado, não se observou uma expressão tão elevada antes do tratamento, tendo-se os níveis de expressão mantido no 1º mês de tratamento, e descido no 3º, embora para valores superiores aos verificados em pacientes respondedores. (figura 16)

A IL-4 é uma citocina Th2, e assume um papel negativo na regulação da resposta Th1, promovendo a diferenciação Th2 de células T (Aoudjehane, Podevin et al. 2007) A sua diminuição mais acentuada em pacientes respondedores, pode, deste modo, encontrar-se relacionada com um enfraquecimento mais evidente da resposta Th2 nestes doentes. No entanto, no tempo 0, os níveis de expressão de IL-4 são superiores aos de pacientes respondedores.

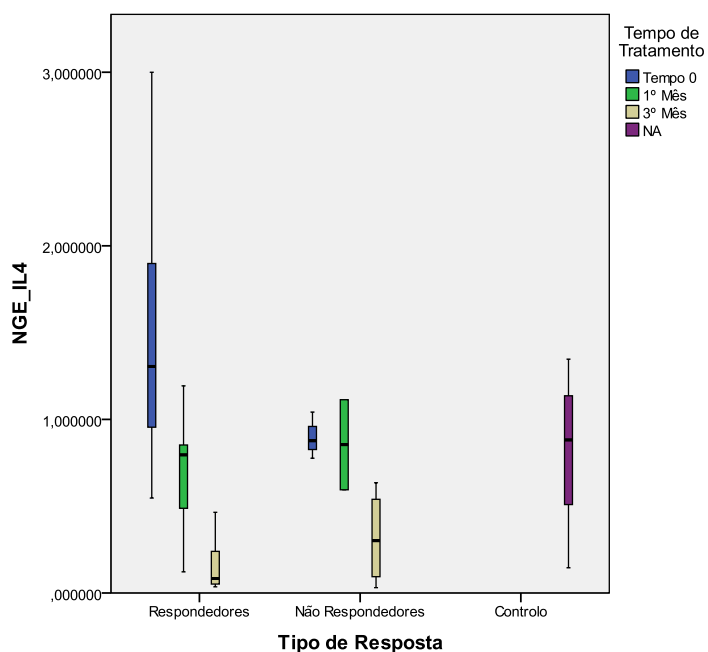


Figura 16. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-4 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.3. IL-10

Antes do tratamento, os níveis de expressão da IL-10 em pacientes respondedores eram inferiores aos que se observam para pacientes não respondedores. No 1º mês de tratamento, ambos os grupos de pacientes manifestaram um aumento na expressão desta citocina, que baixou posteriormente um pouco no 3º mês. Contudo, o aumento no 1º mês foi mais acentuado nos pacientes não respondedores. Os níveis de expressão de IL-10 parecem apresentar-se, de um modo geral, mais elevados em pacientes não respondedores, principalmente após o início do tratamento. A expressão de IL-10 no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores, é próxima daquela que se observa em indivíduos saudáveis, e um pouco superior à observada antes do tratamento. (figura 17)

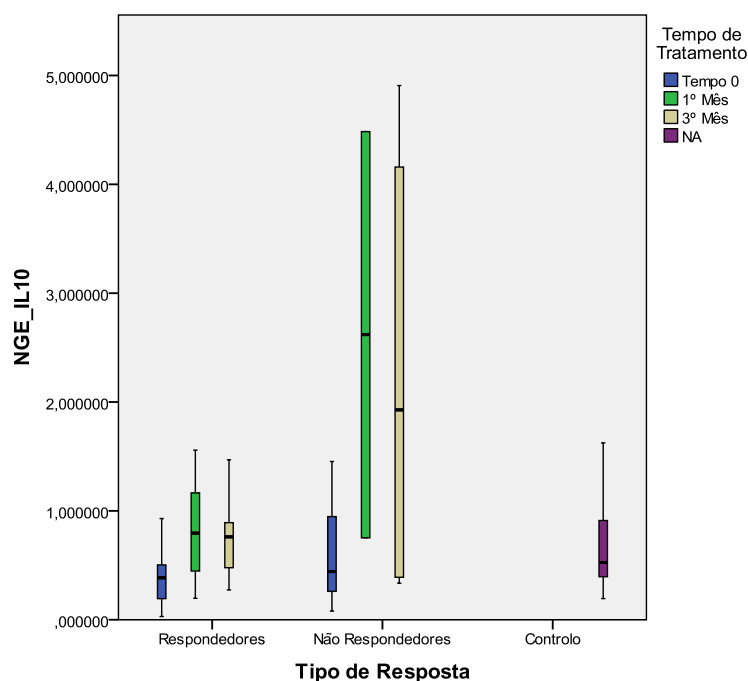


Figura 17. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de IL-10 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

A IL-10 é, tal como IL-4, uma citocina Th2, e actua na sub-regulação dos mecanismos efectores da resposta Th1. (Ho AS et al. 1994) Observou-se, anteriormente, que os níveis séricos de IL-10 se encontram elevados em pacientes com a infecção crónica pelo VHC, e positivamente correlacionados com a progressão da doença. (Kakumu, Okumura et al. 1997) Assim, a expressão mais elevada do gene IL-10 em pacientes não respondedores, corresponde com a predominância da resposta Th2, principalmente após o início do tratamento, o que coincide com o insucesso da resposta à terapia. No entanto, a IL-10 parece estar associada a

um atenuamento dos danos causados ao nível hepático, provocados pelo processo inflamatório decorrente da infecção pelo VHC. (Nelson, Tu et al. 2003) Isto pode explicar porque os níveis de expressão desta citocina tendem a estabilizar num valor um pouco elevado em relação ao tempo 0, mas não superior ao que se observa em indivíduos normais.

1.4. IL-6

Em pacientes respondedores, a expressão do gene de IL-6 experimenta uma diminuição, desde o tempo 0 até ao 3º mês de tratamento, sendo que neste os valores de expressão se aproximam dos apresentados por indivíduos saudáveis. No caso dos pacientes não respondedores, o perfil de expressão é bem diferente, apresentando uma subida no 1º mês, e voltando novamente a descer no 3º mês de tratamento. Os níveis de expressão de IL-6 encontram-se, no geral, superiores em pacientes não respondedores. É de salientar a diferença entre os níveis de expressão de IL-6 no tempo 0, entre pacientes respondedores e não respondedores. (figura 18)

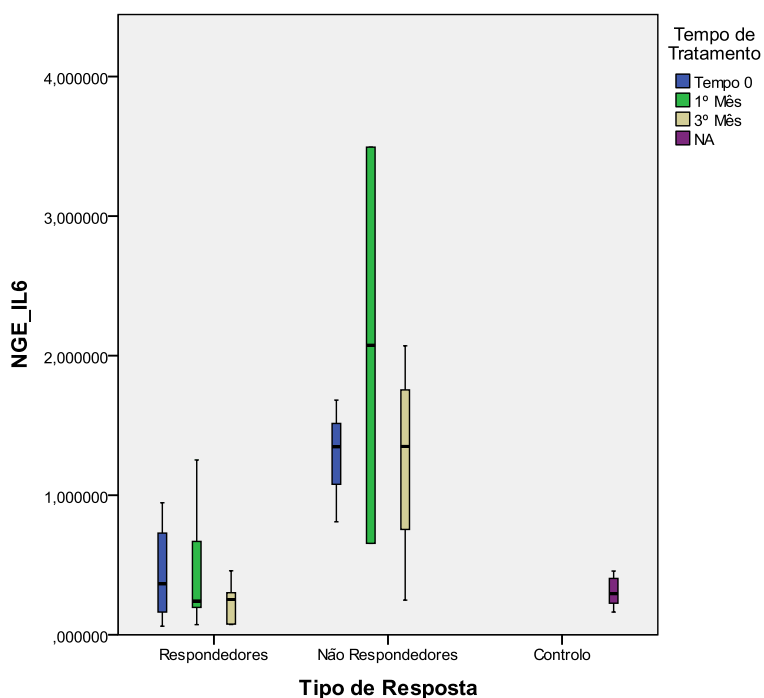


Figura 18. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de IL-6 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

A IL-6 é uma citocina que se encontra envolvida na fase aguda da resposta imune, actua na maturação de linfócitos B, e promove a diferenciação Th2, inibindo simultaneamente a

polarização Th1. (Diehl and Rincon 2002) É, neste sentido, de esperar que os níveis de expressão IL-6, superiores em pacientes não respondedores, favoreçam a prevalência da resposta Th2 nestes pacientes. Foi já observado anteriormente que os níveis de IL-6 no soro se encontravam aumentados em pacientes não respondedores (Oyanagi, Takahashi et al. 1999), embora este estudo tenha sugerido uma expressão de IL-6 com origem em células residentes de fígado.

1.5. IL-2

Os níveis de expressão de IL-2 encontram-se mais elevados, antes do tratamento, em pacientes respondedores, relativamente a não respondedores, embora inferiores aos que se observam para indivíduos saudáveis. Os pacientes respondedores aumentam um pouco no 3º mês de tratamento, enquanto os pacientes não respondedores apresentam um aumento acentuado no 1º e no 3º mês de tratamento. (figura 19)

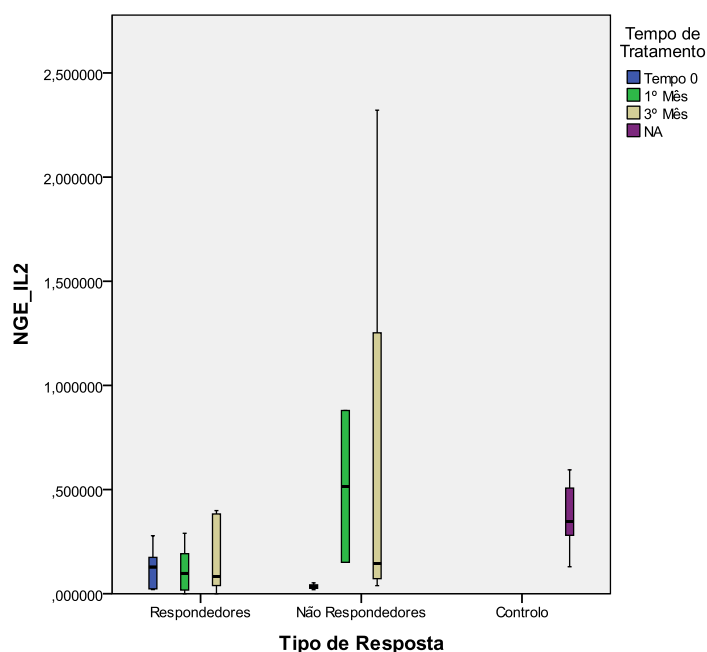


Figura 19. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de IL-2 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

A IL-2 é uma citocina produzida por células Th1, e é importante no processo de maturação de células T CD8+ em células T citotóxicas. (Kuby 2003) A produção de IL-2 tende a encontrar-se aumentada em pacientes com um perfil de recuperação positivo. (Gramenzi, Andreone et al. 2005) De facto, a imunidade mediada por células (Th1) é considerado um

importante factor na protecção contra a infecção pelo VHC (Diepolder, Zachoval et al. 1995) (Wan, Kung et al. 2009). No entanto, embora os níveis iniciais de expressão de IL-2 sejam superiores em pacientes respondedores, durante o tratamento observam-se valores de expressão mais elevados em pacientes não respondedores. Isto pode mostrar que após o início do tratamento há uma alteração no perfil de expressão de citocinas Th1 nos pacientes não respondedores, ocorrendo, no entanto, uma resistência à sua acção. Por outro lado, foram anteriormente observados níveis séricos de IL-2 superiores em pacientes não respondedores, antes e após o início do tratamento. (Wan, Kung et al. 2009) No entanto, neste caso não se sabia se a secreção partia de células do sangue periférico, ou de células residentes no fígado. As respostas do tipo Th1 causam longas reacções inflamatórias, que podem resultar em cirrose e hepatocarcinoma. (Gremion and Cerny 2005) Desta forma, níveis demasiado elevados de citocinas Th1 podem, eventualmente, contribuir para um agravamento da doença hepática. De facto, no presente estudo, o aumento dos níveis de expressão de IL-2, embora se observe nos dois grupos de doentes, é mais acentuada ao nível de não respondedores.

1.6. IL-12

Os níveis de expressão de IL-12 apresentam uma diminuição desde o tempo 0 até ao 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores. Já os pacientes não respondedores apresentam um aumento acentuado no 1º mês de tratamento, e uma diminuição no 3º mês. É de salientar a expressão de IL-12 se encontra aumentada em pacientes respondedores antes do tratamento, relativamente a pacientes não respondedores. (figura 20)

A IL-12 induz a diferenciação de células Th em Th1, sendo um potente modulador das células NK e da função das células T. A produção da IL-12 por macrófagos activados e células dendríticas é crítica para a indução da imunidade Th1 (Zhang, Ma et al. 2011), e direccionada para a eliminação de agentes patogénicos intracelulares e vírus. (Cacciarelli, Martinez et al. 1996) A infecção crónica pelo VHC leva a uma supressão da produção de IL-12. A supressão das respostas mediadas por células T, através da disrupção da produção de IL-12 pode representar um mecanismo comum pelo qual ocorre evasão do sistema imune. (Zhang, Ma et al. 2011) Logo, seria de esperar que os níveis de IL-12 se encontrassem aumentados em pacientes respondedores, nos quais deverá ocorrer uma predominância da resposta Th1. De facto, isso é observado antes do tratamento. Contudo, após o início do tratamento, observa-se uma diminuição a expressão de IL-12 em pacientes respondedores, contrariamente ao que se observa em não respondedores. Por outro lado, Wan (Wan, Kung et al. 2009) não observou diferenças significativas nos níveis séricos de IL-12.

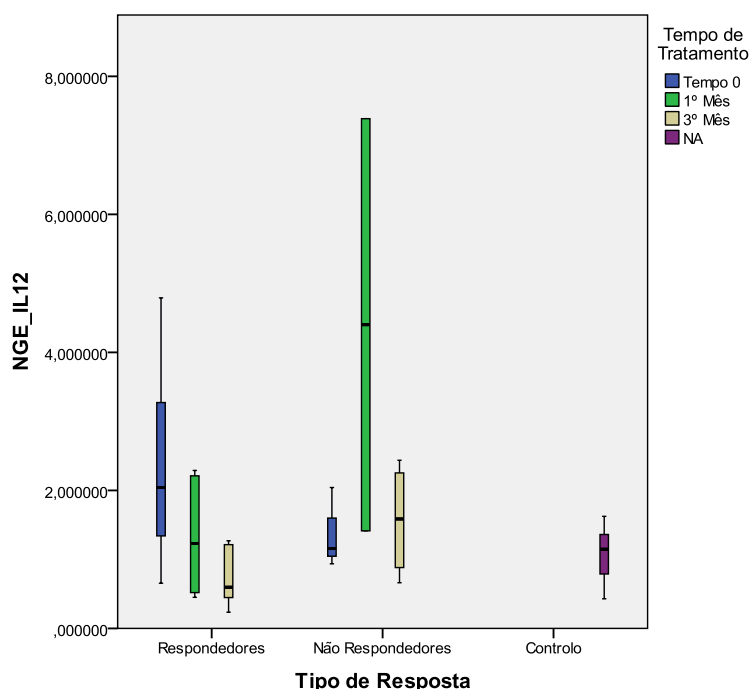


Figura 20. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IL-12 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.7. IL-18

De um modo geral, os pacientes apresentam valores de expressão de IL-18 aumentados relativamente a indivíduos saudáveis, sendo que a expressão se encontra aumentada em pacientes não respondedores, comparando com os respondedores. Nos doentes respondedores observa-se uma subida dos níveis de expressão de IL-18 no 1º mês de tratamento, e uma descida no 3º mês, verificando-se o oposto em doentes não respondedores. (figura 21)

A IL-18 desempenha um papel crítico na resposta Th1, necessária na defesa contra vírus. (Dinarello 1999) (Sharma, Chakraborti et al. 2009). No entanto, níveis elevados de IL-18 parecem contribuir para a patogenicidade e progressão de doença hepática associada ao VHC. (Dao, Mehal et al. 1998) (Sharma, Chakraborti et al. 2009). Isto, provavelmente, porque a IL-18 é uma citocina pró-inflamatória com grande potencial de exercer efeitos deletérios, pelo que é necessária uma regulação apertada. (Sharma, Chakraborti et al. 2009). Assim, os pacientes respondedores apresentaram níveis de expressão de IL-18 superiores aos de indivíduos saudáveis, e inclusive uma subida no 1º mês de tratamento, no sentido de combater a infecção

viral; no entanto, os pacientes não respondedores, ao apresentarem uma expressão mais acentuada, podem experimentar uma maior propensão a lesões hepáticas e à progressão da doença.

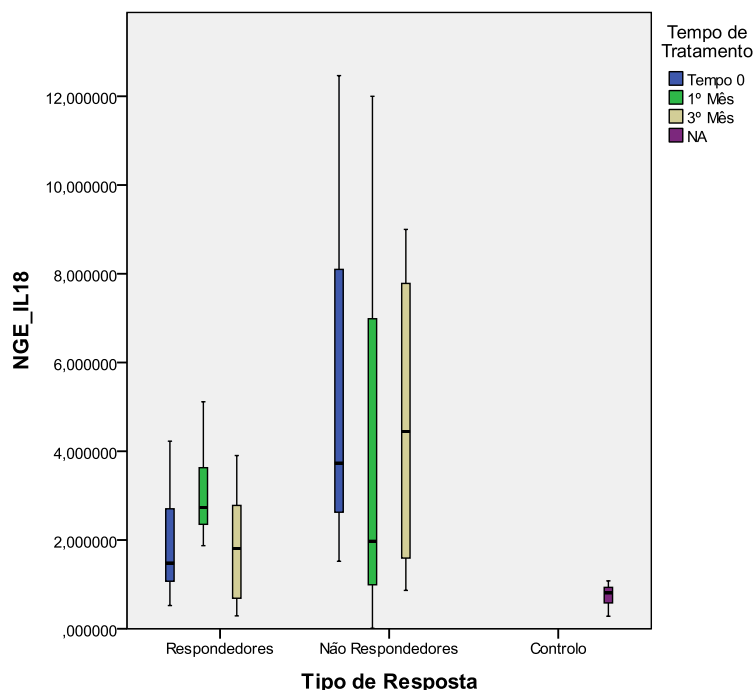


Figura 21. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de IL-18 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.8. IL-8

Os níveis de expressão de IL-8 encontram-se relativamente baixos em pacientes respondedores, experimentando uma ligeira subida até ao 3º mês de tratamento. Os pacientes não respondedores, pelo contrário, apresentam uma acentuada subida do tempo 0 para o 1º mês de tratamento, e deste para o 3º, comparativamente aos respondedores. (figura 22)

Em hepatócitos, a NS5A induz IL-8, que inibe as funções anti-virais desencadeadas por IFN. [revisto em (Rehman, Ashfaq et al. 2011)] Por outro lado, os níveis séricos de IL-8 mostraram-se elevados em doentes que falham a resposta à terapia (Polyak, Khabar et al. 2001), embora também se tenham observado níveis de IL-8 elevados antes do tratamento em pacientes que atingiram a SVR (Wan, Kung et al. 2009). No entanto, a IL-8 pode possuir efeitos antivirais e provirais opostos, dependendo do nível de replicação do VHC, e se a infecção for

aguda ou crónica, nomeadamente e, nomeadamente, apresentar efeitos antivirais contra vírus com baixa capacidade replicativa (Koo, McPoland et al. 2006).

Contudo, não se conhece ainda muito sobre a sua expressão em células do sangue periférico. De acordo com aquilo que se observa no presente trabalho, não parece ocorrer uma grande diferença na expressão do gene codificante de IL8 antes do tratamento. O mesmo já não se verifica após o início do tratamento, em que os níveis de expressão de IL-8 se apresentam mais elevados em pacientes não respondedores. Provavelmente, nestes últimos, a IL-8 apresentará um efeito inibitório ao nível da acção de IFN.

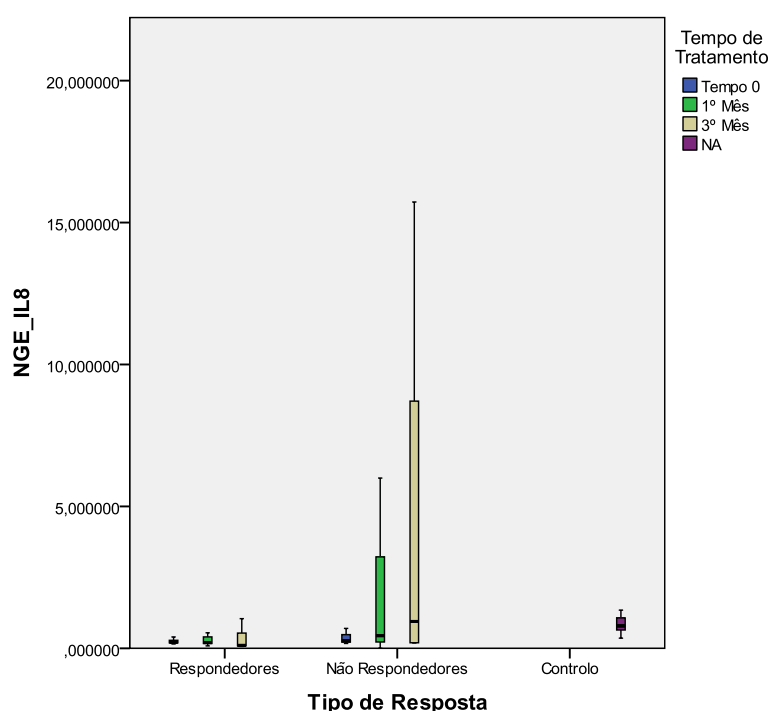


Figura 22. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de IL-8 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.9. SOCS-1

A expressão de SOCS-1 apresenta-se, no tempo 0, mais baixa em pacientes não respondedores. No 1º mês de tratamento, os níveis de expressão aumentam em ambos os pacientes, embora menos em pacientes não respondedores, sendo que no 3º mês há uma diminuição, que é mais acentuada em pacientes respondedores. (figura 23)

SOCS-1 é uma proteína que, quando induzida por activação celular, apresenta uma função inibitória, ao associar-se aos receptores de citocinas, ou a receptores associados a JAK,

impedindo a activação de STAT-1. (Alexander 2002) Zhang (Zhang, Ma et al. 2011) apresentou um modelo, segundo o qual a proteína core, ao interagir com o receptor gC1qR, em monócitos/macrófagos activados, induzirá a sobre-regulação de SOCS-1, que por sua vez, contribuirá para a inibição das vias de sinalização Jak/STAT envolvidas na indução da expressão de IL-12. Em suma, por acção da proteína cores, SOCS-1 tem um efeito inibitório na expressão de IL-12 (que assume como já se referiu, um papel importante na resposta Th1). No entanto, observou-se, num estudo recente, que o silenciamento da expressão de SOCS-1 em células do sangue periférico, antes do tratamento, parece ser um indicador negativo de resposta ao tratamento (Younossi, Birerdinc et al. 2012) Os resultados apresentados parecem estar em concordância com este estudo, no sentido em que os níveis de expressão de SOCS-1 se apresentam diminuídos em pacientes não respondedores, relativamente a respondedores, no tempo 0.

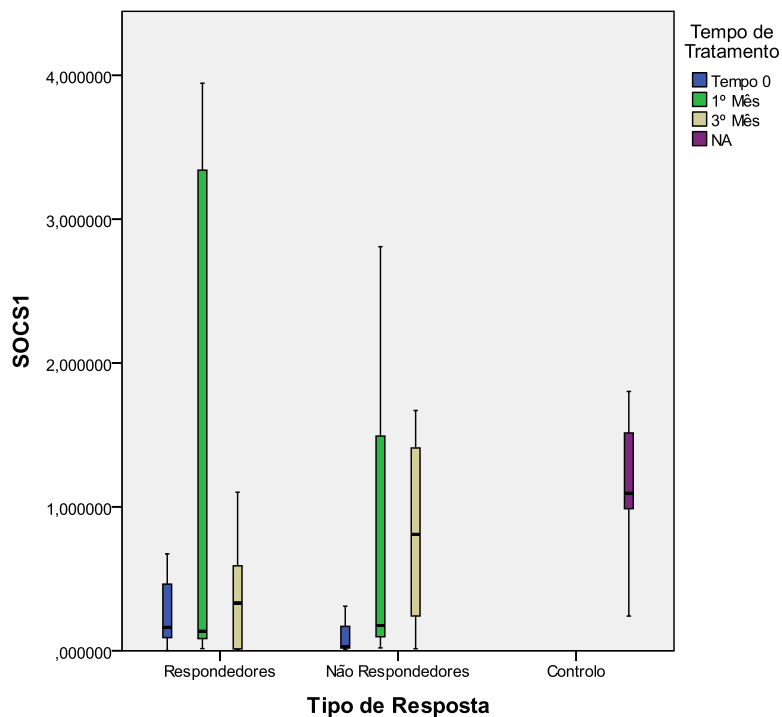


Figura 23. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de SOCS-1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.10. CXCL9

Em pacientes respondedores, a expressão de CXCL9 diminuiu um pouco no 1º mês de tratamento, voltando a diminuir no 3º mês. Os pacientes não respondedores apresentaram

valores de expressão superiores aos manifestados por respondedores, no tempo 0, que diminuíram no 1º mês de tratamento. Os níveis de expressão no 3º mês apresentaram-se mais elevados em pacientes não respondedores. (figura 24)

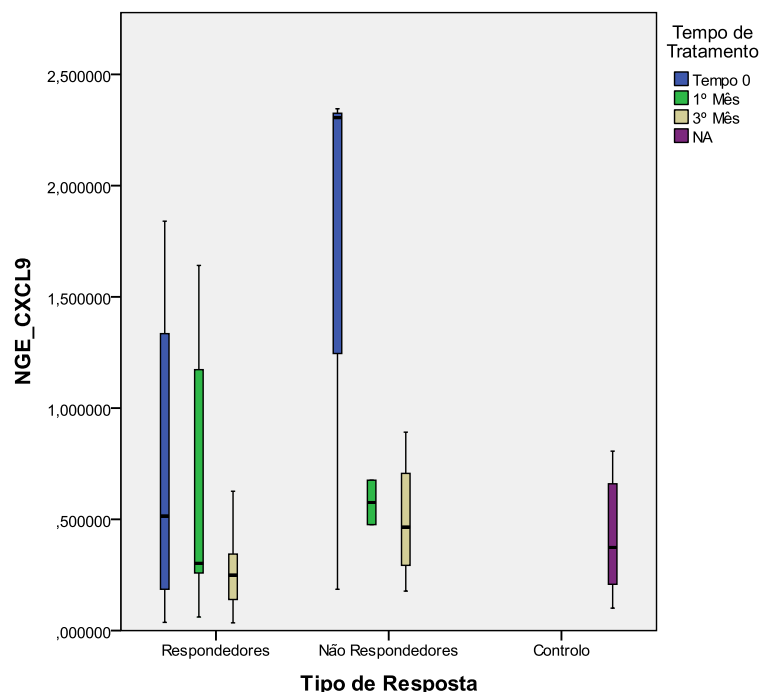


Figura 24. Representação gráfica dos níveis de expressão gênica normalizada de CXCL9 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

As quimiocinas são um grupo de pequenas citocinas, que se encontram envolvidas no tráfego de leucócitos, assim como na sua activação, na diferenciação de linfócitos, na regulação do balanço Th1 /Th2, e em processos de angiogénese e fibrogénese [revisto em (Moura, Carmo et al. 2011)] CXCL9, CXCL10 são duas quimiocinas importantes no recrutamento de células Th1 para o fígado, e funcionam como ligandos para o receptor de quimiocinas do tipo 3 (CXCR3). Os genes que as codificam são indutíveis por IFN- γ . (Moura, Carmo et al. 2011)

Foi já observado que os níveis de CXCL9 se encontravam aumentados no tecido hepático, em pacientes no estágio terminal da infecção pelo VHC. (Shields, Morland et al. 1999). No plasma de pacientes com VHC, também se encontraram níveis elevados de CXCL9, que diminuíram em pacientes cuja terapia foi bem sucedida (Butera, Marukian et al. 2005). Num estudo de Asselah *et al*, efectuado ao nível da expressão génica do fígado, foi ainda identificada uma assinatura de dois genes, IFI27 e CXCL9, que permitiu prever com precisão a resposta ao tratamento em 79,3 % dos pacientes do conjunto de validação, com

uma precisão preditiva de 100 % e 70 % em pacientes não respondedores e SVR, respectivamente. (Asselah, Bieche et al. 2008)

O presente estudo, efectuado em células mononucleares do sangue periférico apresenta resultados não muito distantes dos revistos. Nomeadamente, observam-se níveis de expressão de CXCL9 superiores em pacientes não respondedores, antes do tratamento. Assiste-se também a uma descida mais acentuada da expressão de CXCL9, até ao 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores.

1.11. CXCL10

A expressão de CXCL10 apresenta níveis de expressão não muito diferentes no tempo 0 e no 1º mês de tratamento, descendo, em média, um pouco no 3º mês. Os pacientes não respondedores mostram, antes do tratamento, níveis de expressão inferiores, relativamente aos respondedores, que sobem no 1º mês, e voltam a descer no 3º mês de tratamento. No 1º mês de tratamento, observam-se valores de expressão de CXCL10 superiores aos observados em pacientes respondedores. (figura 25)

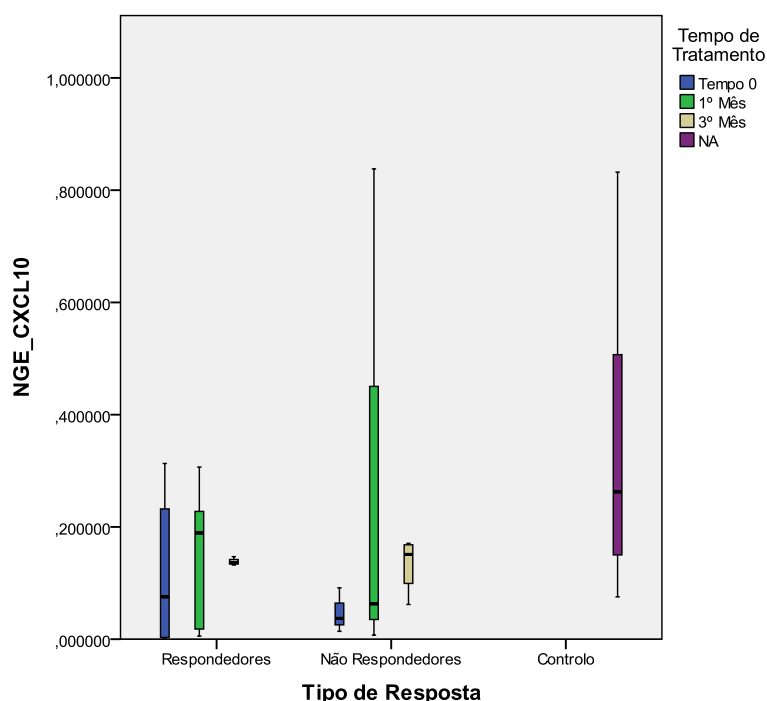


Figura 25. Representação gráfica dos níveis de expressão genética normalizada de CXCL10 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

A CXCL10 desempenha um papel central na inflamação do fígado, e é expressa no fígado de pacientes infectados pelo VHC. (Casrouge, Decalf et al. 2011). Tem-se observado que, em pacientes do VHC, níveis elevados de CXCL10 no plasma, antes do tratamento, são preditores de falha de resposta. (Lagging, Romero et al. 2006) (Casrouge, Decalf et al. 2011).

No entanto, os resultados presentemente observados em células do sangue periférico não se encontram em concordância com este factor. Provavelmente, as células que se encontram envolvidas na produção de CXCL10 se encontram principalmente no fígado. Contudo, o facto de um agente quimiotactico tão potente como a CXCL10 estar presente em níveis elevados e doentes não respondedores gera controvérsia. (Casrouge, Decalf et al. 2011). Nomeadamente, a quimiocina CXCL10, parece encontrar-se relacionada com a ocorrência de lesões hepáticas, derivada de processos de inflamação e fibrose. (Harvey, Post et al. 2003) Foi visto que a CXCL10 é clivada por DPP4, sendo o resultado uma forma truncada de CXCL10, mais curta, que é antagonista do ligando CXCR3. (Gorrell 2005) Para além disso, os níveis de DPP4 mostram-se mais elevados em pacientes VHC, sendo que a forma mais curta de CXCL10 encontra-se presente em maiores quantidades em pacientes não respondedores. (Casrouge, Decalf et al. 2011) Viu-se que apenas a forma completa de CXCL10 resulta na migração de células T (Casrouge, Decalf et al. 2011), pelo que se colocou a hipótese de que a forma clivada de CXCL10 poderia antagonizar as células T que reconhecessem preferencialmente os péptidos VHC (num contexto dependente de HLA) (Charles and Dustin 2011).

1.12. CCL3

A expressão de CCL3 apresenta, em ambos os grupos de pacientes, um aumento no 1º mês de tratamento, seguido de uma descida no 3º mês. Os valores de expressão apresentam-se mais elevados em pacientes não respondedores no 1º e no 3º mês de tratamento, relativamente a respondedores. No tempo 0 não se observam grandes diferenças entre pacientes respondedores e não respondedores. (figura 26)

A CCL3 é uma das quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de células Th1 para o fígado. (Moura, Carmo et al. 2011).

Foram encontrados níveis elevados de CCL3 no fígado de pacientes com VHC. (Shields, Morland et al. 1999) E, de acordo com outros resultados, parece observar-se uma expressão menor de CCL3 (Chemokine (C-C motif) ligand 3) antes do tratamento, em pacientes respondedores. (Younossi, Baranova et al. 2009).

Nos resultados apresentados isso não se observa, embora ocorram níveis de expressão mais baixos, em pacientes respondedores, no 1º e no 3º mês de tratamento.

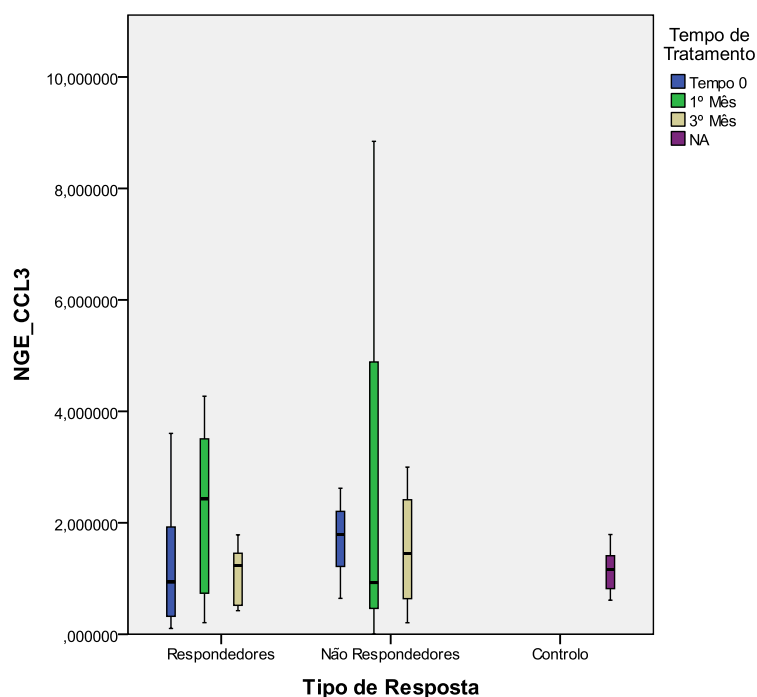


Figura 26. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de CCL3 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.13. TNF- α

Os níveis de expressão de TNF- α apresentam-se, em ambos os grupos de pacientes, um aumento no 1º mês de tratamento, seguido de uma descida no 3º mês, sendo esta mais acentuada em pacientes não respondedores. Em todos os pontos de colheita, os níveis de expressão são, no geral, mais elevados em pacientes não respondedores. (figura 27)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que é inicialmente produzida por macrófagos activados, durante a reacção inflamatória que sucede o reconhecimento dos antigénios virais. (Radkowski, Bednarska et al. 2004)

Em pacientes infectados com VHC, TNF- α funciona como indutor de apoptose (Kountouras, Zavos et al. 2003) (Moura, Carmo et al. 2009), e pode contribuir para lesões ao nível de hepatócitos não infectados, causadas por CTL. (Kaplanski, Farnarier et al. 1997) Nomeadamente, a infecção pelo VHC resulta num aumento dos níveis de TNF- α através da

supressão da activação de NF-kB, devido à acção das proteínas core, NS4B e NS5B. Este mecanismo pode contribuir para a ocorrência de danos no tecido hepático mediado pela resposta imune, durante a infecção pelo VHC. (Park, Kang et al. 2012)

Os níveis de TNF- α no soro apresentam-se significativamente mais elevados em pacientes com hepatite C crónica, comparativamente a indivíduos saudáveis. (Neuman, Benhamou et al. 2001) De facto, no presente estudo, efectuado em PBMC, os níveis de expressão de TNF- α antes do tratamento são um pouco mais elevados em pacientes não respondedores; adicionalmente, a expressão de TNF- α diminui para valores próximos dos apresentados por indivíduos saudáveis, em pacientes respondedores, mantendo-se mais elevados em não respondedores.

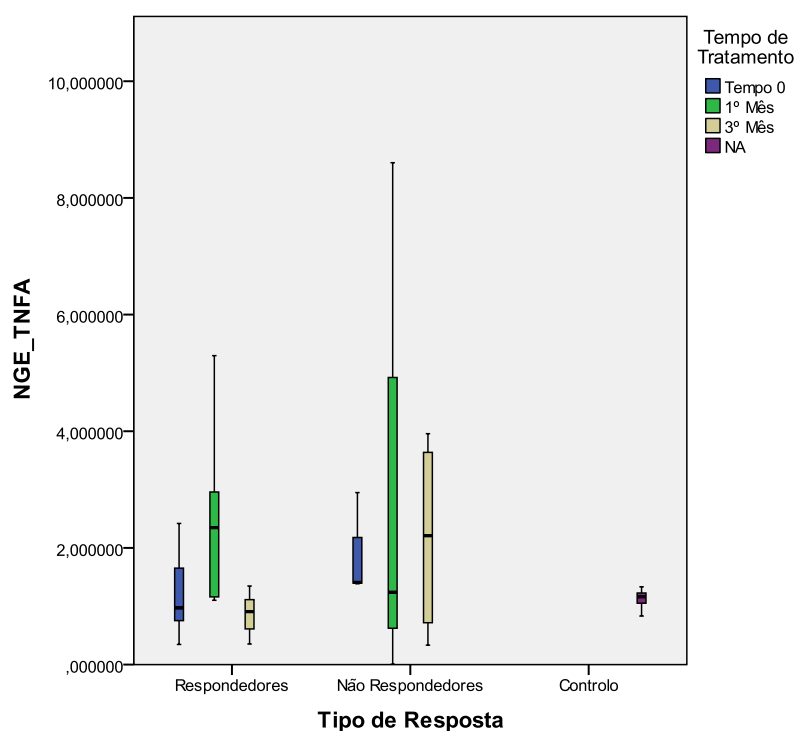


Figura 27. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de TNF- α antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.14. TGF- β 1

Em ambos os grupos de pacientes mostram a expressão TGF- β 1 aumenta no 1º mês de tratamento, em relação ao tempo 0, e volta a descer no 3º mês. No entanto, os pacientes não respondedores apresentam, geralmente, uma expressão mais elevada em relação a pacientes respondedores, sendo que estes parecem não diferir muito dos casos controlo. (figura 28)

O TGF- β 1 é uma citocina reguladora com efeitos multifuncionais os processos biológicos. Nomeadamente, é um potente fibrogénico que se encontra envolvido na fibrogénese do fígado. A infecção pelo VHC parece encontrar-se associada a um aumento significativo de TGF- β 1 no soro, e da sua expressão no fígado, que parece ser induzida pelo VHC e mediada por ROS. (Lin, Tsai et al. 2010) O presente estudo em PBMCs mostra uma expressão aumentada de TGF- β 1 em pacientes não respondedores, o que parece realçar ainda mais o papel de TGF- β 1 na progressão da doença hepática.

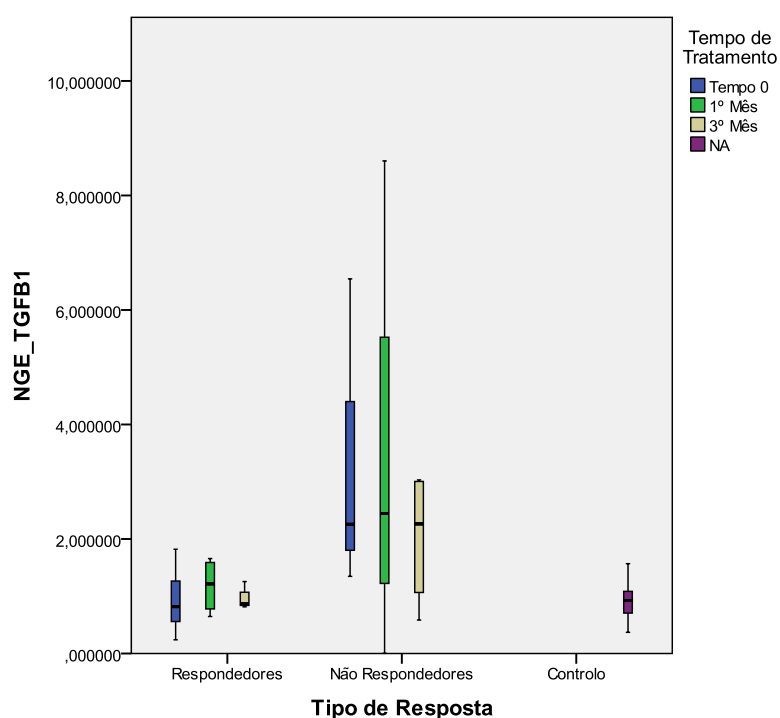


Figura 28. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de TGF- β 1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.15. IRF-2

Em pacientes respondedores, observa-se uma diminuição da expressão de IRF2 no 3º mês de tratamento. Nos pacientes não respondedores há um aumento no 1º mês de tratamento e uma descida no 3º mês. No entanto, os valores de expressão de IRF2 são geralmente mais elevados em pacientes não respondedores, relativamente a respondedores. (figura 29)

O IRF2 tem um papel repressor ao nível da expressão génica mediada por IFN, sendo um regulador negativo da sinalização IFN- α/β , sub-regulando a transcrição de genes estimulados por IRF-1, incluindo os interferões do tipo I. Foi visto que a sua expressão era mais elevada em PBMCs de pacientes com infecção crónica, do que em pessoas saudáveis (Rathindra M Mukherjee 2012) e que níveis baixos de expressão de IRF-2, em PBMCs antes do tratamento parecem estar relacionados positivamente com o alcance da SVR. (Younossi, Biredinc et al. 2012). Os resultados obtidos no presente estudo mostram-se em concordância com os referidos, uma vez que se observa uma expressão de IRF2 mais baixa em pacientes respondedores, antes do tratamento, e que os níveis se mantêm mais elevados em não respondedores ao longo do 1º e do 3º mês de tratamento.

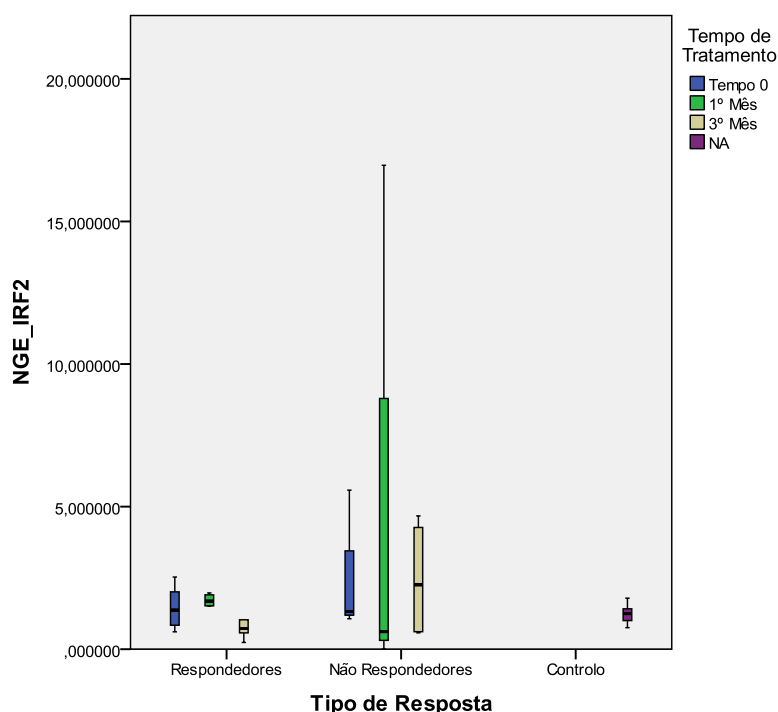


Figura 29. Representação gráfica dos níveis de expressão genética normalizada de IRF2 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.16. IRF-8

Em pacientes não respondedores, observam-se valores mais elevados de expressão de IRF8 no 1º mês de tratamento. Em pacientes respondedores, há uma diminuição da expressão no 3º mês de tratamento, aproximando-se daquilo que se observa para indivíduos controlo. A

expressão de IRF8 parece apresentar-se acentuadamente mais baixa no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores, relativamente a não respondedores. (figura 30)

O IRF8 é expresso em células dendríticas e macrófagos, mas também o pode ser por linfócitos T e B. Em resposta à estimulação desencadeada por vários factores, entre eles a presença de PAMPs, o IRF8 induz a expressão de IL-12, citocina essencial na resposta Th1. (Kawai and Akira 2009) No entanto, no presente estudo, a expressão de IRF8 parece apresentar uma maior diferença apenas ao nível do 3º mês de tratamento, onde os pacientes respondedores mostram níveis mais baixos de expressão, talvez no sentido de começar a normaliza-a, à medida que a resposta ao tratamento vai evoluindo favoravelmente.

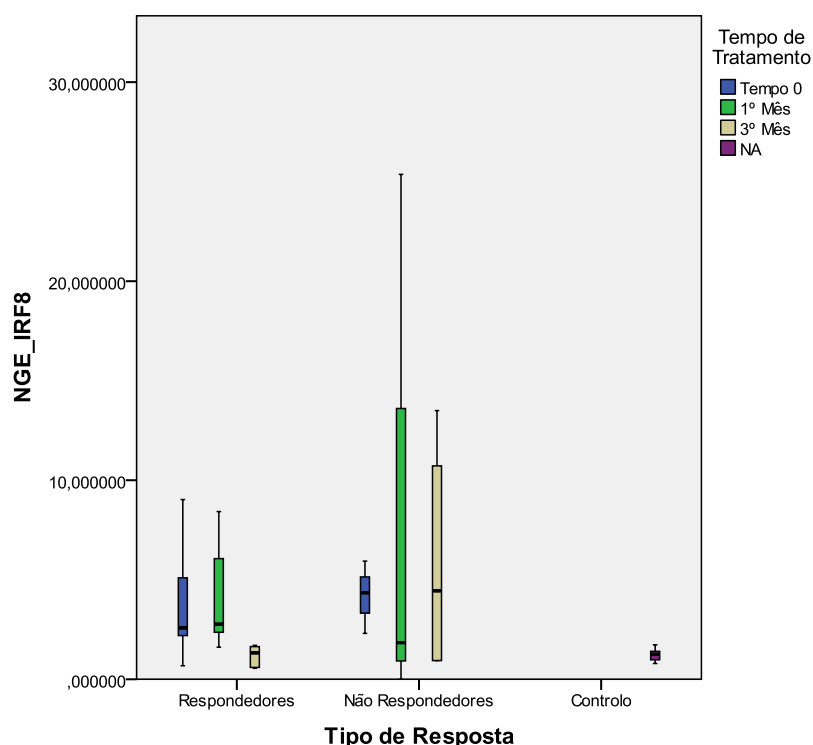


Figura 30. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IRF8 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.17. IFIT1

Os níveis de expressão de IFIT1 apresentam um aumento no 1º mês de tratamento, e uma diminuição no 3º mês. É de salientar que expressão de IFIT1 antes do tratamento é mais baixa em pacientes respondedores. Ambos os grupos de pacientes mostram níveis de expressão mais elevados, relativamente a pacientes saudáveis. (figura 31)

IFIT1 é um gene induzido por IFN, e a sua expressão é importante na resposta a vírus. Estudos anteriores observam que os níveis de expressão basais de ISGs (Interferon Stimulated Genes) serão mais elevados em pacientes não respondedores, sendo apresentada a hipótese de que, em pacientes não respondedores, os níveis de ISGs já se encontrariam maximamente induzidos. (Shackel and McCaughan 2007)

No estudo apresentado, observam-se valores de expressão mais elevados no 1º mês de tratamento em ambos grupos de pacientes. Por outro lado, a expressão de IFIT1 antes do tratamento mostra valores de expressão nitidamente mais baixos em pacientes respondedores, o que vai de encontro com os estudos apresentados.

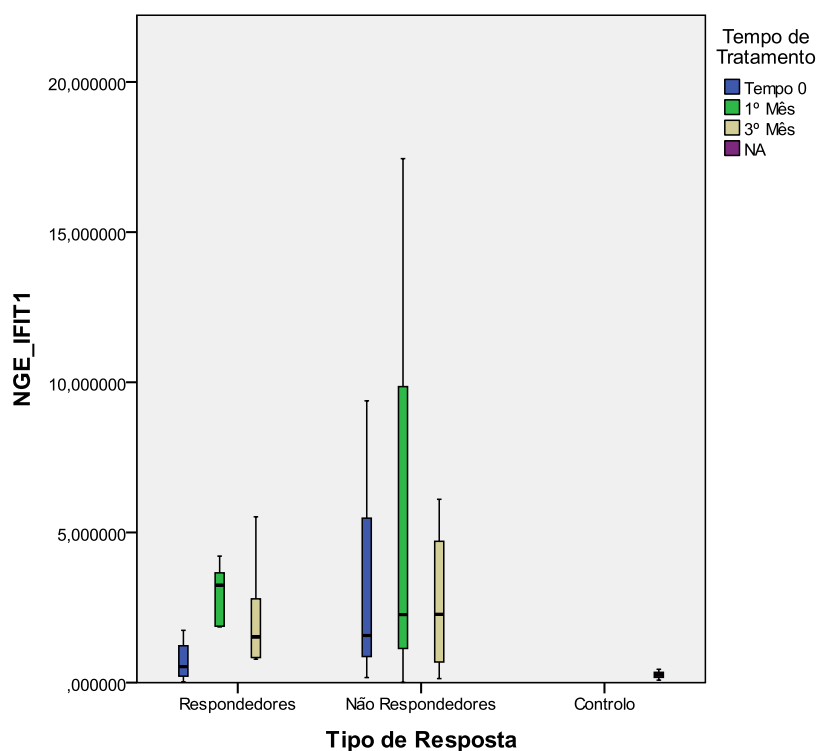


Figura 31. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IFIT1 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.18. IFI27

No 1º e no 3º mês de tratamento, observam-se valores de expressão mais elevados de IFI27 em pacientes não respondedores. No entanto, no tempo 0 as diferenças não são muito

menos evidentes, sendo que em ambos os casos se observam baixos níveis de expressão. (figura 32)

IFI27 é um ISG, e a sua expressão parece encontrar-se sobre-regulada em biopsias de fígado de pacientes não respondedores, fazendo parte da assinatura de dois genes (IFI27 e CXCL9) com predição da resposta ao tratamento, apresentada por Asselah (Asselah, Bieche et al. 2008).

No entanto, no presente estudo em PBMCs, não se observam, no tempo 0, diferenças evidentes, sendo que no 1º e no 3º mês de tratamento, observam-se valores de expressão bastante mais elevados em pacientes não respondedores, quando comparados com respondedores.

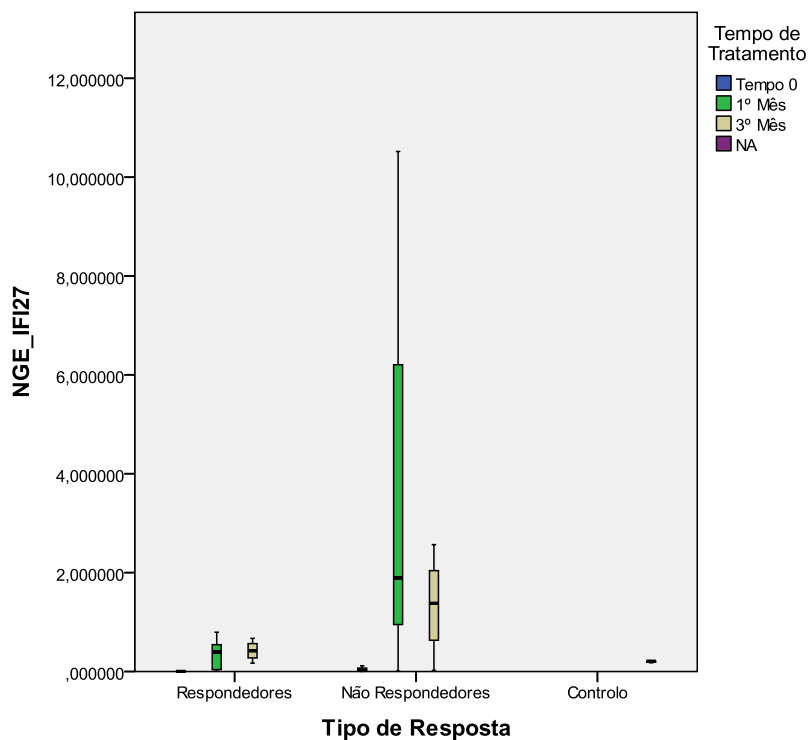


Figura 32. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de IFI27 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.19. OAS-3

Em ambos os grupos de pacientes, os níveis de expressão de OAS-3 apresentam uma subida no 1º mês de tratamento, e valores mais baixos no 3º mês. É de salientar que a

expressão é mais baixa no tempo 0, em pacientes respondedores, quando comparada com não respondedores. (figura 33)

A expressão de OAS-3 é induzida por interferão e resulta na activação de RNase L, sendo importante na inibição da síntese proteica, aquando de uma infecção viral. (GeneCards)

No presente estudo, em PBMCs, a principal diferença na expressão de OAS-3 entre pacientes respondedores e não respondedores, parece observar-se antes do tratamento, onde se apresenta mais baixa em pacientes respondedores. Isto encontra-se em consonância com o facto de a expressão de ISGs se encontrar aumentada em pacientes não respondedores antes do tratamento.

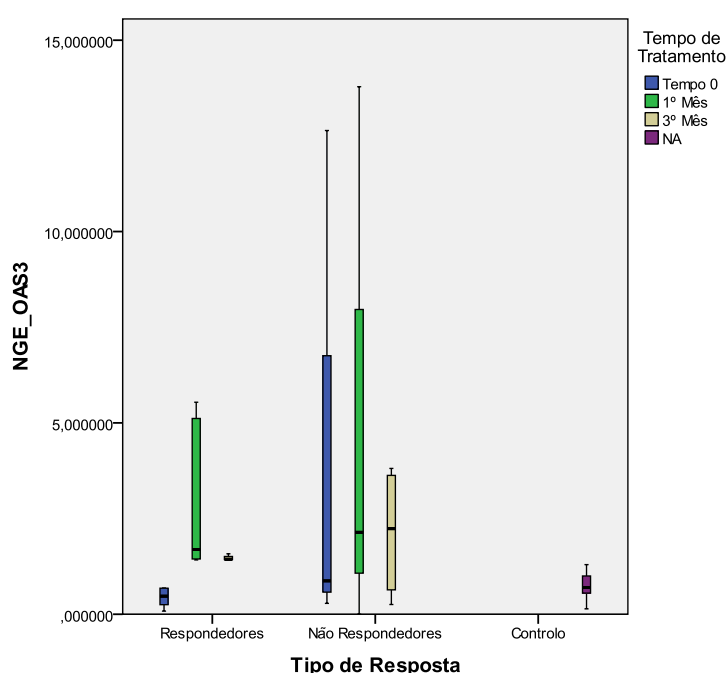


Figura 33. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de OAS-3 antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.20. GZMB

Observa-se que os níveis de expressão de GZMB, em doentes não respondedores, aumentam acentuadamente do tempo 0 para o 3º mês de tratamento, sendo que se observa exactamente o oposto no caso dos doentes não respondedores. É de salientar a diferença de expressão entre estes dois grupos de doentes, antes do tratamento, sendo que a expressão em doentes não respondedores se apresenta bastante aumentada em relação aos não respondedores. (figura 34)

A libertação de granzima B (assim como de perforina), nomeadamente por CTL, constitui um mecanismo importante de indução de morte das células infectadas por vírus, através de um mecanismo dependente da activação de caspases. Este processo é fundamental para uma eficiente eliminação do vírus; no entanto, encontra-se também associada ao surgimento de lesões hepáticas. (Bantel and Schulze-Osthoff 2003)

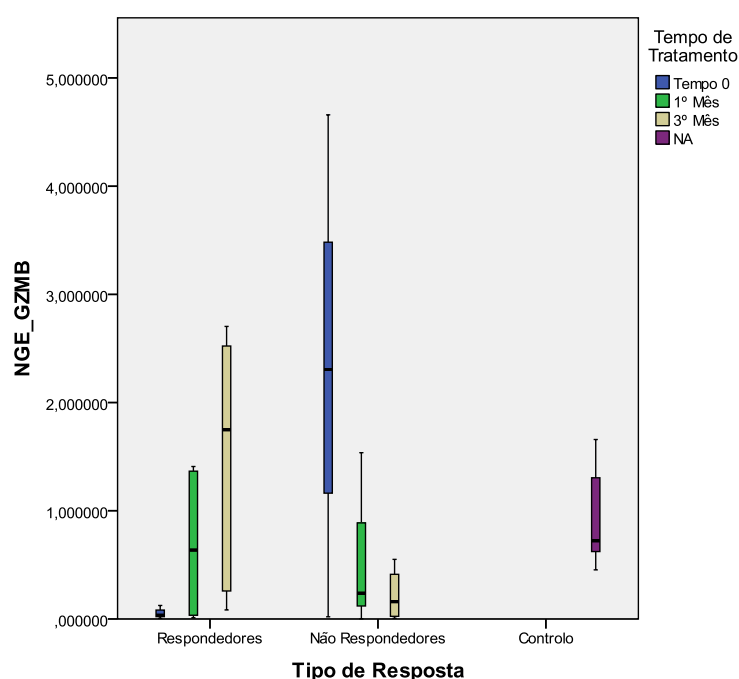


Figura 34. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de GZMB antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores.

1.21. FAS-L

Em pacientes respondedores, os níveis de expressão de FAS-L tendem a aumentar do tempo 0 ao 3º mês de tratamento, verificando-se exactamente o oposto em pacientes não respondedores. Nomeadamente, no tempo 0, os pacientes não respondedores apresentam uma expressão mais elevada, comparativamente à que se observa no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores. (figura 35)

Os linfócitos T activados, através da expressão membranar de FAS-L, possuem a capacidade de induzir a morte de células marcadas com FAS. FAS-L causa a agregação dos domínios da morte de FAS. (Hayashi and Mita 1999)

Foi já observado que as proteínas do VHC podem suprimir a morte celular induzida por FAS, contribuindo, desta forma, para a persistência da infecção. (Machida, Tsukiyama-Kohara et al. 2001) No entanto, foi também mostrado que a expressão de FAS se encontrava aumentada em biopsias de pacientes com VHC, o que leva a crer que a infecção pelo VHC pode induzir a expressão de FAS, e assim causar um agravamento das lesões hepáticas. (Walters, Joyce et al. 2006) Como a morte celular associada a FAS é mediada por Linfócitos T que expressam FAS-L, seria interessante avaliar a expressão de FAS-L.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que os pacientes não respondedores apresentam uma expressão de FAS-L aumentada, antes do tratamento, que tem tendência a diminuir com o tratamento. No caso dos pacientes respondedores, observa-se exactamente o contrário. Eventualmente, pode colocar-se a hipótese de os pacientes que não irão responder à terapia apresentem uma tendência intrínseca para a expressão exagerada de FAS-L, encontrando-se esta já maximamente induzida. No caso dos pacientes respondedores, a terapia induzirá o aumento da expressão de FAS-L, no sentido de mais eficazmente combater a infecção viral. No caso da expressão de FAS-L, é possível que a tendência a responder, ou não à terapia, se relacione principalmente com factores intrínsecos.

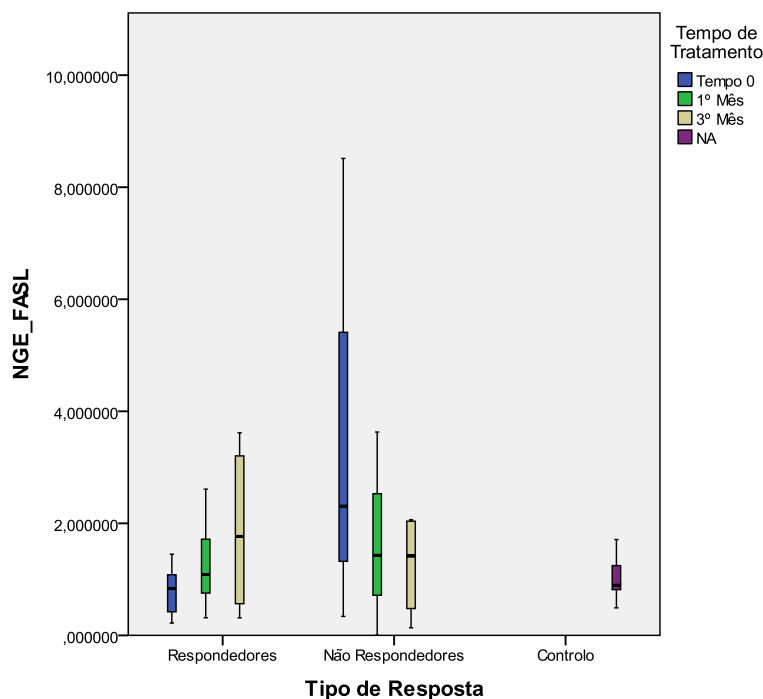


Figura 35. Representação gráfica dos níveis de expressão génica normalizada de FAS-L antes do tratamento (tempo 0), no 1º mês de tratamento, e no 3º mês de tratamento, em pacientes respondedores e não respondedores

2. Diferenças no perfil de expressão dos pacientes

Os resultados apresentados permitem observar diferenças ao nível do perfil de expressão génica, entre doentes respondedores e não respondedores (tabela XXXVII). Nomeadamente, os doentes não respondedores mostraram uma tendência para sobre-expressar vários genes após o início do tratamento, não se tendo assistido a uma distinção entre genes codificantes de citocinas Th1 e Th2. Esta observação foi mais evidente ao nível dos genes STAT6, IL-2, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12, TGF- β , IRF2, e IFI27.

Tabela XXXVII. Diferenças observadas na expressão génica de mediadores imunológicos em doentes não respondedores à terapêutica, em relação a respondedores.

As setas \uparrow indicam níveis de expressão mais elevados em doentes não respondedores, relativamente a respondedores. As setas \downarrow indicam níveis de expressão mais baixos em doentes não respondedores, relativamente a respondedores.

Gene	Tempo 0	1º mês	3º mês
STAT6	\uparrow	\uparrow	\uparrow
IL-2		\uparrow	\uparrow
IL-4	\downarrow		
IL-6	\uparrow	\uparrow	\uparrow
IL-10		\uparrow	\uparrow
IL-8		\uparrow	\uparrow
IL-12	\downarrow	\uparrow	\uparrow
IL-18	\uparrow		\uparrow
GZMB	\uparrow		\downarrow
FAS-L	\uparrow		\downarrow
TGF- β	\uparrow	\uparrow	\uparrow
TNF- α			\uparrow
IRF2	\uparrow	\uparrow	\uparrow
IRF8			\uparrow
SOCS-1	\downarrow		\uparrow
CXCL9	\uparrow		\uparrow
CXCL10	\downarrow		
IFIT1	\uparrow		
OAS-3	\uparrow		
IFI27		\uparrow	\uparrow

É de salientar as diferenças de expressão observadas antes do tratamento. Os doentes não respondedores mostraram uma expressão aumentada, relativamente a respondedores, dos genes STAT6, IL-6, IL-18, GZMB, FAS-L, TGF- β , IRF2, CXCL9, IFIT1, e OAS-3. Por outro lado, os genes IL-4, IL-12, SOCS1, e CXCL10, apresentaram níveis de expressão mais elevados em doentes respondedores. Alguns dos genes sobre-expressos, no tempo 0, em doentes não respondedores, correspondem a ISGs (nomeadamente CXCL9, IFIT1, e OAS-3). Esta observação encontra-se em de acordo com a hipótese de que a existência, à partida, de uma resposta já maximamente induzida nestes doentes, esteja na base da ineficiência da terapia. (Shackel and McCaughan 2007) O mesmo não se observa ao nível da expressão de CXCL10 que, contrariamente ao que seria de esperar, mostra níveis de expressão mais elevados em doentes respondedores, antes do tratamento. Num estudo efectuado anteriormente em PBMCs de pacientes com infecção crónica pelo VHC, submetidos ao tratamento com Peg-IFN α e RBV, observaram-se resultados semelhantes, antes do tratamento, no que diz respeito a IL-6 e a IL-18, mas exactamente o oposto em relação aos genes GZMB e FAS-L. (Martinho 2010) Interessantemente, entre o tempo 0 e o 3^o mês de tratamento, a expressão dos genes FAS-L e GZMB teve tendência a aumentar em doentes respondedores, e a diminuir em não respondedores

Os resultados obtidos ao nível do tempo 0, podem ganhar especial relevância, na medida em que, se forem descobertos perfis de expressão génica definidos para doentes respondedores e não respondedores, antes do tratamento, poderá eventualmente prever-se, logo à partida, que tipo de acompanhamento prestar, logo de início, ao doente.

No futuro, serão necessários estudos adicionais, nomeadamente, com um número mais elevado de pacientes. Seria interessante também avaliar a expressão genética ao nível de diferentes subpopulações celulares, nomeadamente, no sentido de observar quais as células assumem uma contribuição maior para as diferenças observadas ao nível do perfil de expressão génica em PBMCs.

III. Associação de polimorfismos relacionados com o gene IL28B e a resposta ao tratamento

Recentemente, foi dada especial relevância à presença de polimorfismos associados ao gene IL28B, no que refere à sua relação com a resposta de pacientes infectados com o VHC. (Ge, Fellay et al. 2009) (Suppiah, Moldovan et al. 2009) (Tanaka, Nishida et al. 2009).

No presente trabalho procedeu-se à análise dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860, em amostras de DNA de 19 pacientes infectados com o VHC, 12 respondedores e 7 não respondedores.

O gene IL28B codifica a interleucina-28B [IL-28B], ou interferão λ do tipo III [INF- λ 3]), sendo que os IFNs do tipo III (λ) possuem actividades anti-virais semelhantes aos IFN do tipo I (α/β). (Tanaka, Nishida et al. 2009) Os polimorfismos rs8099917 e rs12979860 localizam-se, respectivamente, 8.9 e 3 kb a montante do gene IL28B. Estes polimorfismos rs8099917 e rs12979860 parecem assumir uma particular relevância na predição da resposta ao tratamento baseado em IFN- α , e na resolução espontânea do VHC. (Obeid, Printsevskaya et al. 2011) (Stattermayer, Stauber et al. 2011)

Nos resultados obtidos, prevaleceram os genótipos T/T e T/G, no caso do polimorfismo rs8099917, e os genótipos C/C e C/T, no do rs12979860 (tabela XXXVIII e figura 36).

Tabela XXXVIII. Número e percentagem de pacientes relativos aos genótipos dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860.

	Polimorfismo					
	Rs8099917			Rs12979860		
	Genótipo T/T	Genótipo T/G	Genótipo G/G	Genótipo C/C	Genótipo C/T	Genótipo T/T
Nº pacientes	9	9	1	9	8	2
%	47,3684210 5	47,3684210 5	5,26315789 5	47,3684210 5	42,1052631 6	10,5263157 9

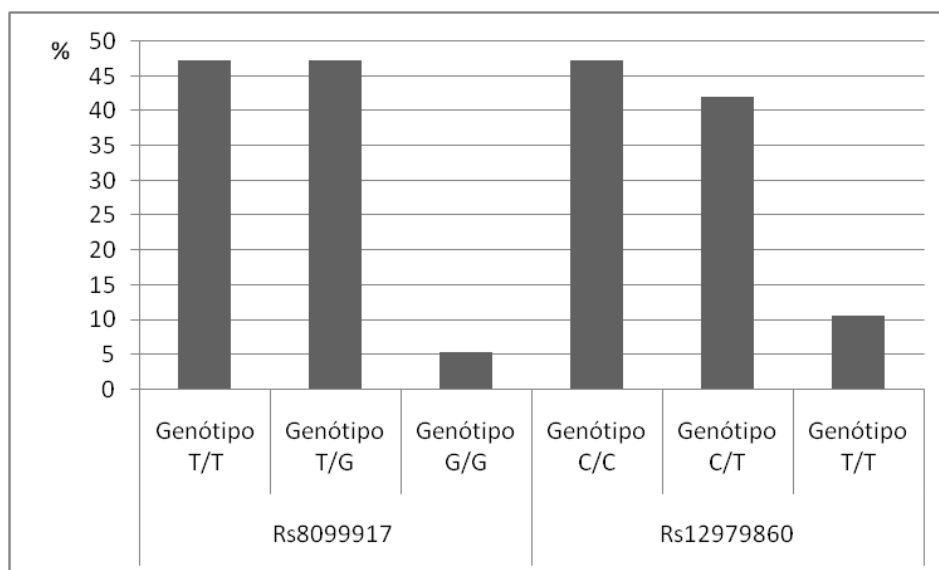


Figura 36. Percentagem de pacientes relativa aos genótipos dos polimorfismos rs8099917 e rs12979860.

Como reviu Younossi, relativamente ao polimorfismo rs12979860 o genótipo C/C é o que se encontra mais frequentemente associado a uma resposta positiva com a resposta ao tratamento, e inclusive, mostrou-se relacionado com um aumento de duas vezes mais na resposta positiva à terapia, quando comparado com os genótipos C/T e T/T. (Ge, Fellay et al. 2009) Observa-se, de facto, uma percentagem de pacientes respondedores C/C superior (embora não muito), relativamente a não respondedores. No caso dos doentes não respondedores, a maior parte apresenta o genótipo C/T, enquanto os respondedores, na sua maioria, são C/C.

No que refere ao polimorfismo rs8099917, observa-se uma situação semelhante ao anterior, agora relativamente aos genótipos T/T e T/G. Neste caso, é o genótipo T/T que se encontra, segundo estudos anteriores, relacionado positivamente com a resposta à terapia. Segundo Hsu (Hsu, Hsu et al. 2011), os pacientes com genótipo T/T apresentaram uma taxa de resolução da virémia mais elevada, relativamente aos de genótipo T/G.

Os pacientes portadores do genótipo rs8099917 T/T e rs12979860 C/C parecem estar relacionados com elevados índices de SVR, em resposta à terapia com Peg-IFN- α / RBV. (Scherzer, Stattermayer et al. 2011) Contudo, no presente estudo, observam-se 4 pacientes respondedores com este perfil, mas também 3 não respondedores. No entanto, é de salientar, que o número de pacientes a comparar é demasiado baixo para permitir retirar conclusões significativas.

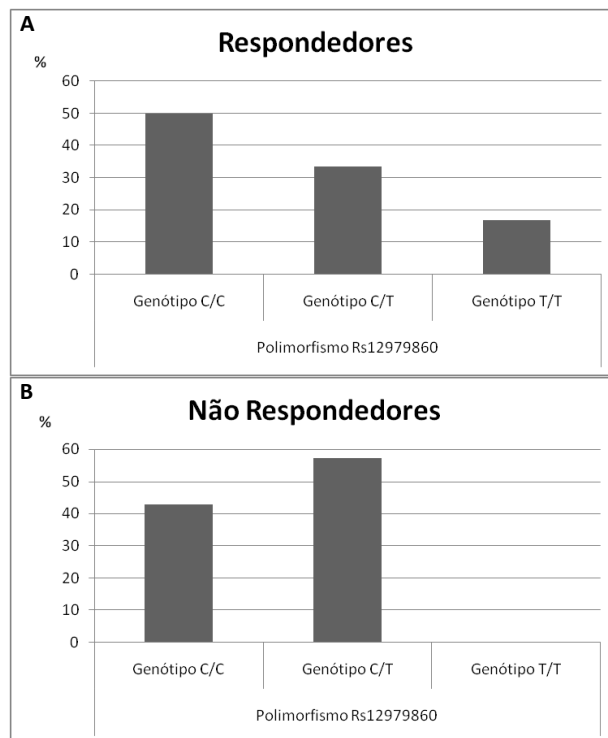


Figura 37. Percentagem de pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) relativa aos genótipos C/C, C/T, e T/T, do polimorfismo rs12979860.

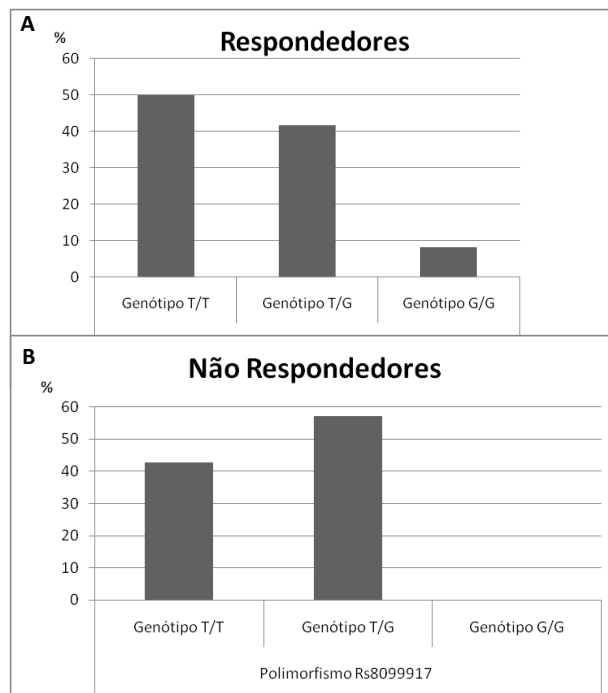


Figura 38. Percentagem de pacientes respondedores (A) e não respondedores (B) relativa aos genótipos T/T, T/G, e G/G, do polimorfismo rs8099917.

Capítulo 3.

Conclusão

A enorme variabilidade genética do VHC, associada à sua capacidade de evasão da resposta imune, constitui ainda um entrave ao desenvolvimento de estratégias eficazes no combate à hepatite C crónica. Esta corresponde à maioria dos casos de infecção, encontrando-se associada ao desenvolvimento de cirrose hepática e hepatocarcinoma. Surge a necessidade de encontrar métodos de predição de resposta dos pacientes, no sentido de desenvolver estratégias que possibilitem um melhor e mais eficaz acompanhamento dos doentes, uma vez que, não há vacina, e o tratamento standard, baseado em interferão α peguilado e ribavirina (Peg-IFN / RBV), apresenta taxas de sucesso variáveis e com efeitos secundários.

Com o trabalho apresentado, pretendia-se contribuir para a descoberta de factores que pudessem encontrar-se associados aos mecanismos de evasão da resposta imune pelo VHC, e que permitissem ajudar a prever o tipo resposta à terapia.

Relativamente ao estudo da variabilidade das regiões NS3 e NS5A do genoma do VHC, apesar de todas as tentativas efectuadas no sentido de obter produtos de amplificação, não foi possível obter resultados. Vários motivos poderão estar relacionados com o insucesso dos procedimentos, nomeadamente, a escassez de RNA após extracção, o elevado tamanho dos fragmentos a amplificar, a enorme variabilidade do VHC, ou a falha na eficiência dos procedimentos. No entanto, devido ao importante papel das proteínas NS3 e NS5A ao nível de vários processos, tais como a evasão da resposta imune e a replicação viral, é importante continuar a investir em estratégias de estudo destas regiões. Nomeadamente, em futuros trabalhos, seria interessante enveredar por estratégias de clonagem, no sentido de obter uma maior quantidade de ácidos nucleicos para posteriores experiências.

No que refere à região 5'UTR, não se obteve um número elevado de mutações, o que se encontra de acordo com o grau de conservação desta região. No entanto, nas que se observaram, a maioria correspondia a mutações associadas à presença de duas bases no mesmo ponto da sequência, o que pode sugerir a existência de quasispecies. Nomeadamente, os pacientes não respondedores apresentaram um número de mutações deste género um pouco mais elevado, relativamente a respondedores. Ao nível do domínio III, observou-se um paciente não respondedor com três mutações ao nível do *loop* IIIa/b, sendo que anteriormente foi visto que as mutações ocorridas neste local se encontravam relacionadas com a destabilização da estrutura do RNA (El Awady, Azzazy et al. 2009). Seria interessante efectuar, no futuro, a análise das sequências ao longo de diferentes tempos de tratamento, e se possível, avaliando a composição em quasispecies das amostras. O estudo das populações de quasispecies pode efectuar-se através de métodos de amplificação, como RT-PCR, ou clonagem, com base nas regiões HVR1, ou ISDR, do genoma do VHC. (Brian Mullan 2002)

No estudo da região HVR1 da proteína E2, observou-se uma maior percentagem de mutações não sinónimas, algo que tinha já sido reportado anteriormente (Ângela 2010), sendo que o número de mutações não sinónimas foi superior nos pacientes não respondedores. Neste paciente observou-se ainda uma alteração ao nível da estrutura secundária da proteína. No entanto, o número de pacientes estudados foi demasiado baixo, pelo que serão necessários estudos adicionais.

Relativamente aos polimorfismos rs8099917 e rs12979860, associados ao gene IL28B, observou-se que, em ambos os polimorfismos, a percentagem de pacientes respondedores com o genótipo associado a uma resposta positiva (T/T para rs8099917, e C/C para rs12979860) à terapia era um pouco superior à observada em não respondedores, mas não demasiado. Contudo, a percentagem de pacientes respondedores com o genótipo intermédio não diferiu muito da que se observou para o genótipo favorável, embora fosse um pouco mais baixa. A apresentação simultânea dos genótipos associados a resposta favorável, para os dois polimorfismos, não pareceu ser um factor determinante no tipo de resposta. No entanto, será necessário proceder a estudos posteriores, nomeadamente, com um número mais elevado de pacientes.

Ao nível do estudo da expressão génica de mediadores imunológicos efectuada ao nível de células mononucleares do sangue periférico, e apesar do baixo número de pacientes em estudo, a resposta à terapêutica parece estar associada a diferenças na expressão de genes envolvidos nos mecanismos efectores de eliminação viral. Antes do tratamento, foi possível encontrar diferenças interessantes ao nível da expressão em pacientes respondedores. Particularmente, observaram-se alterações ao nível dos genes STAT6, IL-6, IL-18, GZMB, FAS-L, TGF- β , IRF2, CXCL9, IFIT1, e OAS-3, cuja expressão se mostrou mais elevada em doentes não respondedores, relativamente a respondedores, e dos genes IL-4, IL-12, SOCS1, e CXCL10, onde se verificou o oposto. Entre o tempo 0 e o 3º mês de tratamento, a expressão dos genes FAS-L e GZMB teve tendência a aumentar em pacientes respondedores, e a diminuir em não respondedores. Por outro lado, os níveis de expressão de genes indutíveis por IFN, antes do tratamento, tendem a mostrar-se mais elevados em pacientes não respondedores, o que vai de encontro com a hipótese de que a existência de uma resposta já maximamente induzida nestes doentes esteja na base da ineficiência da terapia. (Shackel and McCaughan 2007) Contudo, devido ao pequeno número de pacientes em estudo, não foi possível proceder aos estudos de significância estatística, o que seria interessante efectuar no futuro para os genes acima referidos.

Há que ter em conta que o fígado é o principal local de infecção, apesar de haver fortes suspeitas sobre a infecção e replicação em células do sangue periférico, pelo que o perfil de

expressão ao nível das PBMCs não será necessariamente semelhante ao que ocorre ao nível do tecido hepático.

Por outro lado, seria interessante avaliar a expressão génica ao nível de diferentes subpopulações celulares, nomeadamente, no sentido de observar quais as células assumem uma contribuição maior para as diferenças observadas ao nível das PBMCs.

De qualquer forma, embora as análises efectuadas em amostras provenientes de biopsias hepáticas reflectam aquilo que ocorre, em termos de expressão e inflamação, no principal órgão afectado, é importante continuar a investir na definição de marcadores ao nível do sangue periférico. Sobretudo, porque a biopsia hepática é um método invasivo e que ainda acarreta alguns riscos.

Em suma, os resultados obtidos com este trabalho, embora preliminares, podem sugerir focos de pesquisas posteriores, no sentido de procurar factores que possam ajudar a efectuar uma predição da resposta dos pacientes à terapia com e, simultaneamente, a elucidar os mecanismos que se encontram por detrás da evasão dos mecanismos da resposta imune pelo VHC.

Anexos

- A. Dados relacionados com o estudo da variabilidade das regiões NS5A e NS3 do genoma do VHC

Tabela XXXIX. Primers usados nas PCRs das regiões NS5A e NS3, e as respectivas temperaturas de *melting*.

Região e genótipo	Primer	Sequência do primer	Temperatura de melting (°C)
NS3 – 1b	3NS1bF1	5' TGCCTGGTACATCAAGGGCA 3'	63,30
	3NS1bR1	5' GAGGCGCACTCTTCATCTCA 3'	63,63
	3NS1bF2	5' GGGGTCATTACGTCCAAATGG 3'	63,05
	3NS1bR2	5' ATCCTGCCACAATGACCAC 3'	62,24
	3NS1bF3	5' CTATGGAAACTACCATGCGGT 3'	58,61
	3NS1bR3	5' CGAGTTGTCCGTAAAGACCGG 3'	62,74
	3NS1bR4	5' ATTAGAGCGTCTGTTGCCACG 3'	62,24
	3NS1bF4	5' CCTTGATGTGTCCGCATACC 3'	59,86
NS3 – 3a	3NS3aF1	5' GGGGAAAATACTTCCAGATG 3'	58,23
	3NS3aR1	5' CCTGAGACACCAGCTCCGTAT 3'	60,11
	3NS3aF2	5' GCTTGCGGAGATATTCTTTGCG 3'	66
	3NS3aR2	5' TAAGAGACGCCACAGCAGGGTT 3'	65,05
	3NS3aF3	5' CGTGYTRAATCCATCGGTGGC	64
	3NS3aR3	5' GACATGAAAGAGCCGAAGCCTA 3'	61,51
	3NS3aF4	5' TTGAACAGTACGTTGACTTCAGC 3'	66
	3NS3aR4	5' TCGGTACGTACCGAGTCTACC 3'	66

Tabela XXXIX. Primers usados nas PCRs das regiões NS5A e NS3, e as respectivas temperaturas de *melting*. (Continuação)

Região e genótipo	Primer	Sequência do primer	Temperatura de melting (°C)
NS5A – 1b	5NS1bF1	5' TCACTGATGGCATTACAGCCTC 3'	63,76
	5NS1bR1	5' TGGATAGGTTCCGGACGTCCTTCG 3'	64,66
	5NS1bF2	5' GTGTGCGCAGCAATACTGCG 3'	65,84
	5NS1bR2	5' ACTGTGGACGCCTTCGCCTT 3'	66,18
	5NS1bF3	5' AGCAACACGTGGCATGGAAC 3'	64,02
	5NS1bR3	5' GGCACCTTACGTTGTGTCAGTGGT 3'	64
	5NS1bF4	5' TGTCTGCGCCTTCCTTGAAGG 3'	66,66
	5NS1bR4	5' TTGGCCTCGATGAGGTCAGC 3'	65,63
NS5A – 3a	5NS3aF1	5' AACCTGTTGCCCGCCATACTATC 3'	64,02
	5NS3aR1	5' GAGCGAACGTCCTTCGCACTATA 3'	63,46
	5NS3aF2	5' CGGTACAGTGGATGAACAGGCT 3'	63,22
	5NS3aR2	5' CTTGTAATGGTCGTCGAGCACC 3'	63,68
	5NS3aF3	5' GAGCTCAAGTGCCGTGCCAAG 3'	64,64
	5NS3aR3	5' CTCAACATCGAGGTCAGCACAG 3'	62,91
	5NS3aF4	5' GTTGTGATTCTTGATTCTTCGA 3'	61,00
	5NS3aR4	5' CCATGGACAGTTGGTGGTACAT 3'	61,48

B. Dados relacionados com o estudo da região 5'UTR do genoma do VHC

Tabela XL. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 1a¹.

Mutação ao nível da sequência	Nº de ocorrências	(%)
76C>S	4	6,557377
104C>Y	4	6,557377
204A>C	6	9,836066
309G>R	11	18,03279
222delG	5	8,196721
107G>A	2	3,278689
121C>Y	1	1,639344
220T>K	1	1,639344
243A>R	1	1,639344
204A>Y	2	3,278689
248T>C	1	1,639344
79C>Y	2	3,278689
302T>K	1	1,639344
71G>R	1	1,639344
102G>K	1	1,639344
148C>Y	3	4,918033
150G>K	3	4,918033
151C>M	1	1,639344
152G>R	1	1,639344
229G>K	1	1,639344
119A>M	1	1,639344
175T>Y	1	1,639344
182A>R	1	1,639344
183C>Y	1	1,639344
204A>C	1	1,639344
224G>R	1	1,639344
247C>Y	1	1,639344
248T>Y	1	1,639344
68G>K	1	1,639344
Total	61	100

¹Sequência de referência NC_004102.1 no NCBI, e AF009606.1 no GenBank

Tabela XLI. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 1b¹.

Mutação	Nº de ocorrências	(%)
104 C>Y	4	11,11111111
183T>C	6	16,66666667
166T>K	5	13,88888889
22C>S	3	8,33333333
189G>A	2	5,55555556
255G>R	6	16,66666667
185C>Y	1	2,77777778
248T>K	1	2,77777778
189G>R	1	2,77777778
150C>Y	1	2,77777778
168delG	6	16,66666667
Total	36	100

¹ O alinhamento das sequências dos pacientes infectados com o genótipo 1b foram alinhadas com a sequência de referência HCV-1010 (GenBank: EF407459.1). No entanto, o respectivo isolado não foi sequenciado para os primeiros 54 nucleótidos, pelo que a numeração das mutações apresentadas está de acordo com a sequência de referência apresentada para o genótipo 1a (Sequência de referência NC_004102.1 no NCBI, e AF009606.1 no GenBank)

Tabela XLII. Mutações encontradas na sequenciação de um fragmento de 244 nucleótidos da região 5'UTR, no genótipo 3a.

Mutação	(%)
74C>S	14,285714
76C>T	14,285714
77C>Y	14,285714
102C>Y	14,285714
114A>M	14,285714
117A>C	14,285714
202C>T	14,285714
Total	100

¹Sequência de referência NZL1 (NCBI: NC_009824.1; GenBank: D17763.1)

C. Dados relacionados com o estudo da expressão genica de mediadores imunológicos

Tabela XLIII. Idade e sexo das pessoas cujas amostras serviram como controlo no estudo da expressão genica de mediadores imunológicos.

Pessoas Controlo	Sexo	Idade
233234	F	39
234087	F	31
239325	M	45
239337	M	67
239443	M	44
239444	M	47
239469	M	47
239471	M	44
239590	F	52
239735	F	48
12779	M	36

Tabela XLIV. Média e desvio padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados, em doentes e indivíduos controlo.

Tipo de Resposta	Tempo de Tratamento		NGE_STAT6	NGE_FASL	NGE_GZMB	NGE_IL2	NGE_IL4
Respondedores	Tempo 0	Mean	,65220482	1,86619652	,53465306	,11739363	2,26443664
		N	9	9	9	7	9
		Std. Deviation	,925688382	1,926379130	,957028532	,100741515	2,461792115
	1º Mês	Mean	,28777799	2,29091066	,68245124	,37895157	1,19069826
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,455460021	2,562523171	,612447196	,644659843	1,278308638
	3º Mês	Mean	,17053908	1,87264510	1,51069191	,16469113	,15953059
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,272338976	1,518669008	1,110871850	,178149720	,167434223
	NA	Mean	,63283892	,27930441	,06934378	2,62062376	,40051002
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	,42057203	1,82983671	,82000365	,33521177	1,31280967
		N	22	22	22	20	22
		Std. Deviation	,664476126	1,927045346	,967200393	,650452280	1,875231006
Não Respondedores	Tempo 0	Mean	,76154771	3,71959698	2,32797534	,03478022	,89845755
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	1,316218794	4,267225865	2,319379756	,016556105	,134336524
	1º Mês	Mean	1,17158404	1,68729876	,59233050	,51515548	,85395947
		N	3	3	3	2	2
		Std. Deviation	2,011335598	1,827110483	,826508946	,515394412	,366836964
	3º Mês	Mean	,80433512	1,25898175	,21863127	,66236827	,31681445
		N	4	4	4	4	4
		Std. Deviation	,920134117	,943165770	,251378349	1,107513821	,273800269
	5,00	Mean	2,88767872	,37628827	,20875899	,80659157	2,05609972
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	1,08221950	1,96662750	,89492742	,45907163	,77266491
		N	11	11	11	10	10
		Std. Deviation	1,341519927	2,444356604	1,450887970	,728650869	,571027746
Controlo	NA	Mean	,85569580	1,03437237	,92264003	1,22497244	1,38285792
		N	11	11	11	10	10
		Std. Deviation	,399589137	,408799312	,434860087	1,583958850	1,246569157
	Total	Mean	,85569580	1,03437237	,92264003	1,22497244	1,38285792
		Std. Deviation	,399589137	,408799312	,434860087	1,583958850	1,246569157
Total	Tempo 0	Mean	,67954054	2,17954664	,98298363	,09260961	1,92294186
		N	12	12	12	10	12
		Std. Deviation	,969862051	2,621466380	1,517242854	,091756789	2,189182670
	1º Mês	Mean	,58238001	2,08970669	,65241099	,41300255	1,10651356
		N	9	9	9	8	8
		Std. Deviation	1,155983737	2,242709999	,638155096	,582039545	1,100326169
	3º Mês	Mean	,42405750	1,62717976	,99386765	,36376199	,22244414
		N	10	10	10	10	10
		Std. Deviation	,656155197	1,295473370	1,073227959	,701813943	,217164189
	NA	Mean	,83712439	,97145004	,85153201	1,35184983	1,29355357
		N	12	12	12	11	11
		Std. Deviation	,386386665	,446581537	,482274086	1,560483795	1,219126385
	5,00	Mean	2,88767872	,37628827	,20875899	,80659157	2,05609972
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
Total	Mean	,69476484	1,66516832	,86439368	,58861690	1,20088193	
	N	44	44	44	40	42	
	Std. Deviation	,868784059	1,838709594	,996245574	1,024056558	1,507759174	

TabelaXLIV. Média e deso padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados em doetes e individuos controlo. (Continuação)

Tipo de Resposta	Tempo de Tratamento		NGE_IL6	NGE_IL10	NGE_IL12	NGE_CXCL1 0	NGE_CXCL9
Respondedores	Tempo 0	Mean	,44008667	,64434849	2,34463177	3,07302127	1,96211029
		N	8	9	8	9	9
		Std. Deviation	,338641306	,804881007	1,368214638	8,868935063	3,711508082
	1º Mês	Mean	,44540780	,82660867	1,32216604	,15606613	,62316074
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,444117054	,529688653	,793368525	,120670891	,631493949
	3º Mês	Mean	,23602464	,77229688	,72709080	,16199104	,27386169
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,147622778	,408934959	,422850029	,087850098	,205736349
	NA	Mean	2,67568864	,59045959	1,48443121	,26607599	,97259444
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	,48976079	,72650133	1,54938221	1,35598229	1,09153280
		N	21	22	21	22	22
		Std. Deviation	,595567955	,600540164	1,152727061	5,666483975	2,435559402
Não Respondedores	Tempo 0	Mean	1,27940994	,65837924	1,37824247	,04753186	1,61210237
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	,440075832	,712228663	,585211488	,039808598	1,235591489
	1º Mês	Mean	2,07461510	2,61848097	4,40036232	,30269340	,57610137
		N	2	2	2	3	2
		Std. Deviation	2,007418400	2,638787345	4,223176506	,464369221	,141155493
	3º Mês	Mean	1,25470042	2,27439447	1,56772744	,13371828	,49984461
		N	4	4	4	4	4
		Std. Deviation	,755479296	2,260525834	,825657437	,050184728	,297989061
	5,00	Mean	2,82825115	,84084410	2,90776411	,41463397	1,43386603
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	1,58345128	1,71505216	2,21141259	,18183481	,94217543
		N	10	10	10	11	10
		Std. Deviation	,992804750	1,835011485	1,954284248	,245640186	,815032555
Controlo	NA	Mean	,55203929	,70030979	1,07469147	,46386556	,53404758
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	,451023543	,424168199	,381028631	,441365458	,409403337
	Total	Mean	,55203929	,70030979	1,07469147	,46386556	,53404758
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	,451023543	,424168199	,381028631	,441365458	,409403337
Total	Tempo 0	Mean	,66899301	,64785618	2,08107105	2,31664892	1,87460831
		N	11	12	11	12	12
		Std. Deviation	,522215510	,750614885	1,258039828	7,686249892	3,212636245
	1º Mês	Mean	,85270962	1,27457675	2,09171511	,20494189	,61139590
		N	8	8	8	9	8
		Std. Deviation	1,133729817	1,372289980	2,242298769	,261506209	,536811990
	3º Mês	Mean	,64349495	1,37313592	1,06334546	,15068194	,36425486
		N	10	10	10	10	10
		Std. Deviation	,692153657	1,548518408	,717646558	,073076944	,258326567
	NA	Mean	,72901007	,69115561	1,10883644	,44738310	,57059315
		N	12	12	12	12	12
		Std. Deviation	,748834551	,405669826	,382066663	,424681200	,410366502
	5,00	Mean	2,82825115	,84084410	2,90776411	,41463397	1,43386603
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	,76647432	,94969671	1,58268473	,83941624	,91418603
		N	42	43	42	44	43
		Std. Deviation	,808302879	1,061400546	1,299299719	4,002963257	1,789618795

TabelaXLIV. Média e deso padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados em doetes e individuos controlo. (Continuação)

Tipo de Resposta	Tempo de Tratamento		NGE_TGFB1	SOCS1	NGE_TNFA	NGE_IL18	NGE_CCL3
Respondedores	Tempo 0	Mean	,93508141	,25741005	1,50571398	1,99552972	1,30517187
		N	9	9	9	9	9
		Std. Deviation	,501655107	,241585918	1,137996957	1,393609569	1,149454520
	1º Mês	Mean	2,47585446	1,27600093	2,53525943	3,07339058	2,26400244
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	2,041566300	1,843837907	1,562492691	1,166250739	1,585655682
	3º Mês	Mean	1,16804901	,39664611	1,13657061	1,87976793	1,10790057
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,691719687	,440229761	,750249897	1,351361713	,533764595
	NA	Mean	,92013040	6,49801917	1,03520052	1,65853590	1,86594989
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	1,41814927	,85684509	1,66443666	2,24260247	1,53835976
		N	22	22	22	22	22
		Std. Deviation	1,285108194	1,630311203	1,238780342	1,332567560	1,183896464
Não Respondedores	Tempo 0	Mean	3,38258249	,11598517	1,91420378	5,90621385	1,68482109
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	2,774453308	,168276817	,895683016	5,787386520	,992545089
	1º Mês	Mean	3,68392565	1,00140760	3,28295667	4,66082358	3,25777031
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	4,431905618	1,567262102	4,648770828	6,430785027	4,860992892
	3º Mês	Mean	2,03555877	,82560695	2,17764815	4,68779478	1,52643675
		N	4	4	4	4	4
		Std. Deviation	1,186875966	,731061755	1,734768909	3,756699280	1,184692108
	5,00	Mean	2,86773206	7,72749063	1,04965137	2,12860792	1,10950044
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	2,92813560	1,30746334	2,30470230	4,78008175	2,00391106
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	2,538275492	2,307768896	2,425346202	4,504970756	2,453021054
Controlo	NA	Mean	,94295991	1,14627567	1,19987816	,83849417	1,13266451
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	,339518200	,449982790	,383346992	,357025898	,395243206
	Total	Mean	,94295991	1,14627567	1,19987816	,83849417	1,13266451
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	,339518200	,449982790	,383346992	,357025898	,395243206
Total	Tempo 0	Mean	1,54695668	,22205383	1,60783643	2,97320075	1,40008418
		N	12	12	12	12	12
		Std. Deviation	1,675669027	,227345644	1,059169338	3,260439595	1,081436649
	1º Mês	Mean	2,87854486	1,18446982	2,78449184	3,60253491	2,59525840
		N	9	9	9	9	9
		Std. Deviation	2,807187463	1,660651797	2,658645327	3,437851493	2,779504736
	3º Mês	Mean	1,51505291	,56823045	1,55300163	3,00297867	1,27531504
		N	10	10	10	10	10
		Std. Deviation	,967504231	,578694205	1,266836212	2,796690432	,820259003
	NA	Mean	,94105745	1,59225430	1,18615502	,90683099	1,19377163
		N	12	12	12	12	12
		Std. Deviation	,323784978	1,603383932	,368585502	,414630648	,432232093
	5,00	Mean	2,86773206	7,72749063	1,04965137	2,12860792	1,10950044
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	1,67684851	1,04185730	1,70836345	2,52594522	1,55332377
		N	44	44	44	44	44
		Std. Deviation	1,704184332	1,619273608	1,519769746	2,772346118	1,489137904

TabelaXLIV. Média e deso padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados em doetes e individuos controlo. (Continuação)

Tipo de Resposta	Tempo de Tratamento		NGE_IL8	NGE_IFIT1	NGE_IRF2	NGE_IRF8	NGE_IFI27
Respondedores	Tempo 0	Mean	,42887510	1,26795832	1,82514013	3,68457676	1,99189562
		N	9	9	9	9	9
		Std. Deviation	,417133352	1,756651358	1,308605810	2,651676200	3,873045584
	1º Mês	Mean	,26811375	3,01383801	2,03497022	4,00065162	,71839519
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,172631908	,963120525	1,426728471	2,659263847	,923682455
	3º Mês	Mean	,32586362	2,16247843	1,01507587	1,70246582	1,05866497
		N	6	6	6	6	6
		Std. Deviation	,395468348	1,836827601	,781668267	1,409011424	1,190420874
	NA	Mean	,35353140	3,18194796	1,80238879	1,89199758	2,21900088
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	,35351234	2,07506689	1,66040575	3,14872241	1,40038284
		N	22	22	22	22	22
		Std. Deviation	,339638951	1,670698054	1,205884016	2,416257886	2,569655376
Não Respondedores	Tempo 0	Mean	,37964858	3,70632585	2,65535078	4,19654103	,04741474
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	,283058160	4,965043388	2,534751320	1,820895340	,061481972
	1º Mês	Mean	2,14896378	6,57374826	5,86341400	9,07092392	4,14006964
		N	3	3	3	3	3
		Std. Deviation	3,342211148	9,483928386	9,623387701	14,14306189	5,603847482
	3º Mês	Mean	4,45269914	2,69584576	2,44138144	5,83166779	1,33691644
		N	4	4	4	4	4
		Std. Deviation	7,547357472	2,625386841	2,136611160	6,085633243	1,046178446
	5,00	Mean	,27166681	,14457703	1,70516369	2,88767872	,00401582
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	2,33348186	3,79710749	3,36608944	6,00152225	1,62855770
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	4,766117413	5,396453365	4,880253929	7,520887516	3,090302768
Controlo	NA	Mean	,92779017	,65290619	1,22323123	1,39025037	,94556179
		N	11	11	11	11	11
		Std. Deviation	,440858593	,876163442	,319935548	,610062816	2,288942476
	Total	Mean	,92779017	,65290619	1,22323123	1,39025037	,94556179
		N	11	11	11	11	11
Std. Deviation	,440858593	,876163442	,319935548	,610062816	2,288942476		
Total	Tempo 0	Mean	,41656847	1,87755020	2,03269279	3,81256783	1,50577540
		N	12	12	12	12	12
		Std. Deviation	,376309595	2,818245506	1,598304036	2,402123204	3,418115910
	1º Mês	Mean	,89506376	4,20047476	3,31111815	5,69074239	1,85895334
		N	9	9	9	9	9
		Std. Deviation	1,922399324	5,121934728	5,299892876	7,800850459	3,363180632
	3º Mês	Mean	1,97659782	2,37582536	1,58559810	3,35414661	1,16996556
		N	10	10	10	10	10
		Std. Deviation	4,859625522	2,061024559	1,550368499	4,242013453	1,082938114
	NA	Mean	,87993527	,86365967	1,27149436	1,43206264	1,05168171
		N	12	12	12	12	12
		Std. Deviation	,451850241	1,109449975	,347858261	,599434390	2,213164876
	5,00	Mean	,27166681	,14457703	1,70516369	2,88767872	,00401582
		N	1	1	1	1	1
		Std. Deviation
	Total	Mean	,99207418	2,15003686	1,97753304	3,42230436	1,34372129
		N	44	44	44	44	44
		Std. Deviation	2,460544871	3,095870831	2,638753440	4,346096698	2,593663632

TabelaXLIV. Média e deso padrão relativos aos valores de expressão genica normalizados em doetes e individuos controlo. (Continuação)

Tipo de Resposta	Tempo de Tratamento		NGE_OAS3
Respondedores	Tempo 0	Mean	1,54082914
		N	9
		Std. Deviation	2,390449523
	1º Mês	Mean	2,81582002
		N	6
		Std. Deviation	1,957065788
	3º Mês	Mean	2,07863427
		N	6
		Std. Deviation	1,500040093
	NA	Mean	3,89037774
		N	1
		Std. Deviation	.
	Total	Mean	2,14202572
		N	22
		Std. Deviation	2,013914683
Não Respondedores	Tempo 0	Mean	4,59818584
		N	3
		Std. Deviation	6,970474003
	1º Mês	Mean	5,30996636
		N	3
		Std. Deviation	7,416278806
	3º Mês	Mean	2,13289696
		N	4
		Std. Deviation	1,760988817
	5,00	Mean	,55860881
		N	1
		Std. Deviation	.
	Total	Mean	3,52860484
		N	11
		Std. Deviation	4,960295138
Controlo	NA	Mean	1,31345946
		N	11
		Std. Deviation	1,470289458
	Total	Mean	1,31345946
	N	11	
	Std. Deviation	1,470289458	
Total	Tempo 0	Mean	2,30516831
		N	12
		Std. Deviation	3,860295849
	1º Mês	Mean	3,64720213
		N	9
		Std. Deviation	4,207054300
	3º Mês	Mean	2,10033935
		N	10
		Std. Deviation	1,511471428
	NA	Mean	1,52820265
		N	12
		Std. Deviation	1,587011000
	5,00	Mean	,55860881
		N	1
		Std. Deviation	.
Total	Mean	2,28152893	
	N	44	
	Std. Deviation	2,975402100	

D. Aminoácidos e ácidos nucleicos

Tabela XLV. Aminoácidos e respectivos códigos de uma e três letras. (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Aminoácidos	Código de três letras	Código de uma letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina o ácido glutâmico	Glx	Z
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptófano	try	W
Valina	Val	V

Tabela XLVI. Códigos de designação de DNA. (IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

Nucleótido	Designação
A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina
U	Uracil
R	G A (purina)
Y	T C (pirimidina)
K	G T (ceto)
M	A C (amino)
S	G C (ligações de hidrogênio fortes)
W	A T (ligações de hidrogênio fracas)
B	G T C (todos, menos A)
D	G A T (todos, menos C)
H	A C T (todos, menos G)
V	G C A (todos, menos T)
N	A G C T (qualquer nucleótido)

Referências

- . "AMV Reverse Transcriptase." 2012, from www.promega.com/products/pcr/rt-pcr/amv-reverse-transcriptase.
- . "In Protocol Online." 2012, from www.protocolonline.org/prot/Molecular_Biology/PCR/RT-PCR/index.html.
- (2010). MagAttract® Viral RNA M48 Handbook. QIAGEN.
- (2011). Guidelines for molecular analysis in Archive Tissues. Springer.
- (NIH), N. I. o. H. (2010). Chronic Hepatitis C: Current Disease Management. US Department of Health and Human Services.
- A.D.A.M. (16-10-2011). "Hepatitis C." Retrieved 16-05-2012, 2012, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0001329/>
- Adler, M., P. Goubau, et al. (2002). "Hepatitis C virus: the burden of the disease." *Acta Gastroenterol Belg* **65**(2): 83-86.
- Ahad, A. (2008). "Current Challenges in Hepatitis C." *Centers for Disease Control & Prevention*.
- Akiyama, H. (2012). "Healthy and cancerous serum RNA profiling by the novel RNA extraction reagent and highly sensitive DNA chip "3D-Gene"."
- Alexander, W. S. (2002). "Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 410-416.
- Ali, S., C. Pellerin, et al. (2004). "Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line." *J Virol* **78**(1): 491-501.
- Alter, M. J., P. J. Coleman, et al. (1989). "Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and non-A, non-B hepatitis." *JAMA* **262**(9): 1201-1205.
- Ângela (2010). Avaliação do perfil mutacional das regiões hipervariáveis na proteína do envelope E2 do vírus da hepatite C, Centro de Histocompatibilidade do Centro, Coimbra, Portugal.
- Aoudjehane, L., P. Podevin, et al. (2007). "Interleukin-4 induces human hepatocyte apoptosis through a Fas-independent pathway." *FASEB J* **21**(7): 1433-1444.
- Ashfaq, U. A., T. Javed, et al. (2011). "An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses." *Virology* **8**: 161.
- Asselah, T., I. Bieche, et al. (2008). "Liver gene expression signature to predict response to pegylated interferon plus ribavirin combination therapy in patients with chronic hepatitis C." *Gut* **57**(4): 516-524.
- Asselah, T., I. Bieche, et al. (2009). "Gene expression and hepatitis C virus infection." *Gut* **58**(6): 846-858.
- Asselah, T., E. Estrabaud, et al. (2010). "Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin." *Liver Int* **30**(9): 1259-1269.
- Asselah, T., L. Rubbia-Brandt, et al. (2006). "Steatosis in chronic hepatitis C: why does it really matter?" *Gut* **55**(1): 123-130.
- Averhoff, F. M., N. Glass, et al. (2012). "Global burden of hepatitis C: considerations for healthcare providers in the United States." *Clin Infect Dis* **55** Suppl 1: S10-15.
- B1, E. RT-PCR and Amplification of Viral RNA. Methods and compositions for identifying and characterizing hepatitis C.
- Bacon, B. R. (2011). "New Developments in HCV Screening, Diagnosis, and Assessment." **7**.
- Bantel, H. and K. Schulze-Osthoff (2003). "Apoptosis in hepatitis C virus infection." *Cell Death Differ* **10** Suppl 1: S48-58.

- Bartels, D. J., Y. Zhou, et al. (2008). "Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naive subjects." *J Infect Dis* **198**(6): 800-807.
- Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, et al. (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." *J Virol* **68**(8): 5045-5055.
- Bartenschlager, R., M. Frese, et al. (2004). "Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence." *Adv Virus Res* **63**: 71-180.
- Bartenschlager, R. and V. Lohmann (2000). "Replication of the hepatitis C virus." *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* **14**(2): 241-254.
- Barth, H., T. J. Liang, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry: molecular biology and clinical implications." *Hepatology* **44**(3): 527-535.
- Barth, H., A. Ulsenheimer, et al. (2005). "Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells." *Blood* **105**(9): 3605-3614.
- Bartosch, B., J. Bukh, et al. (2003). "In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14199-14204.
- Behrens, S. E., L. Tomei, et al. (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." *EMBO J* **15**(1): 12-22.
- Benedicto, I., F. Molina-Jimenez, et al. (2009). "The tight junction-associated protein occludin is required for a postbinding step in hepatitis C virus entry and infection." *J Virol* **83**(16): 8012-8020.
- Berg, T., C. Sarrazin, et al. (2003). "Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy." *Hepatology* **37**(3): 600-609.
- Bernard N. Fields, D. M. K., Peter M. Howley (2007). *Fields Virology*. L. W. Wilkins.
- Bieche, I., T. Asselah, et al. (2005). "Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection." *Virology* **332**(1): 130-144.
- Biodavidson. "Random Priming Technique." 2012, from www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/randompriming.html. .
- Biosystems, A. "TaqMan® and SYBR® Green Chemistries." 2012, from www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/NucleicAcid-Amplification-and-Expression-Profiling/qRT-PCR/Real-Time_PCR-Misc/Absolute-vsRelative-Quantitation.html.
- Biron, C. A. (1999). "Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease." *Curr Opin Microbiol* **2**(4): 374-381.
- Bittar, C., A. C. Jardim, et al. (2010). "Genetic diversity of NS5A protein from hepatitis C virus genotype 3a and its relationship to therapy response." *BMC Infect Dis* **10**: 36.
- Blackard, J. T., M. T. Shata, et al. (2008). "Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem." *Hepatology* **47**(1): 321-331.
- Blanchard, E., S. Belouzard, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis." *J Virol* **80**(14): 6964-6972.
- Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, et al. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." *Science* **290**(5498): 1972-1974.
- Blight, K. J. and C. M. Rice (1997). "Secondary structure determination of the conserved 98-base sequence at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." *J Virol* **71**(10): 7345-7352.
- Boulestin, A., K. Sandres-Saune, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon-alpha." *J Med Virol* **68**(2): 221-228.
- Brass, V., E. Bieck, et al. (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." *J Biol Chem* **277**(10): 8130-8139.

- Bressanelli, S., L. Tomei, et al. (2002). "Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides." *J Virol* **76**(7): 3482-3492.
- Brian Mullan, L. F., Fergus Shabahan, Daniel Sullivant (2002). RT-PCR for the Assessment of Genetically Heterogenous Populations of the Hepatitis C Virus. *Methods in Molecular Biology, RT-PCR Protocols*. D. J. O'Connell, Humana Press. **193**.
- Brian W. J. Mahy, M. H. V. V. R. (2010). Desk Encyclopedia of Human and Medical Virology. E. Ltd.
- Brown, E. A., H. Zhang, et al. (1992). "Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs." *Nucleic Acids Res* **20**(19): 5041-5045.
- Brown, T. A. (2010). *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*.
- Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1992). "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4942-4946.
- Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1994). "Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(17): 8239-8243.
- Buratti, E., S. Tisminetzky, et al. (1998). "Functional analysis of the interaction between HCV 5'UTR and putative subunits of eukaryotic translation initiation factor eIF3." *Nucleic Acids Res* **26**(13): 3179-3187.
- Butera, D., S. Marukian, et al. (2005). "Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C." *Blood* **106**(4): 1175-1182.
- Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, et al. (1996). "Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa." *Hepatology* **24**(1): 6-9.
- Cady (2003). Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures. *Biosensors and Bioelectronics*. **19**.
- Caetano, J., A. Martinho, et al. (2008). "Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV." *J Virol* **82**(15): 7567-7577.
- Carrere-Kremer, S., C. Montpellier-Pala, et al. (2002). "Subcellular localization and topology of the p7 polypeptide of hepatitis C virus." *J Virol* **76**(8): 3720-3730.
- Casrouge, A., J. Decalf, et al. (2011). "Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV." *J Clin Invest* **121**(1): 308-317.
- Castelain, S., H. Khorsi, et al. (2002). "Variability of the nonstructural 5A protein of hepatitis C virus type 3a isolates and relation to interferon sensitivity." *J Infect Dis* **185**(5): 573-583.
- Cecere, A., F. Marotta, et al. (2004). "Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile." *Panminerva Med* **46**(3): 171-187.
- Chang, K. M., B. Rehermann, et al. (1997). "Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus." *J Clin Invest* **100**(9): 2376-2385.
- Charles, E. D. and L. B. Dustin (2011). "Chemokine antagonism in chronic hepatitis C virus infection." *J Clin Invest* **121**(1): 25-27.
- Chen, H., H. Sun, et al. (2011). "Activation of STAT6 by STING is critical for antiviral innate immunity." *Cell* **147**(2): 436-446.
- Chen, L., I. Borozan, et al. (2005). "Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection." *Gastroenterology* **128**(5): 1437-1444.
- Cheng, J. C., M. F. Chang, et al. (1999). "Specific interaction between the hepatitis C virus NS5B RNA polymerase and the 3' end of the viral RNA." *J Virol* **73**(8): 7044-7049.
- Chevaliez, S. and J. M. Pawlotsky (2007). "Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy." *World J Gastroenterol* **13**(17): 2461-2466.

- Choo, Q. L., G. Kuo, et al. (1989). "Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome." *Science* **244**(4902): 359-362.
- Choo, Q. L., K. H. Richman, et al. (1991). "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2451-2455.
- Colin, C., D. Lanoir, et al. (2001). "Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature." *J Viral Hepat* **8**(2): 87-95.
- Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." *Nat Immunol* **5**(12): 1219-1226.
- Connelly, M. A. and D. L. Williams (2004). "Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids." *Curr Opin Lipidol* **15**(3): 287-295.
- Cooper, S., A. L. Erickson, et al. (1999). "Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus." *Immunity* **10**(4): 439-449.
- Cribier, B., C. Schmitt, et al. (1998). "Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus." *J Med Virol* **55**(2): 89-91.
- Crisan (2010). "Genomic Mecanisms of Neoplastic Diseases." *Hematopathology*.
- Dalagiorgou, G., N. Vassilaki, et al. (2011). "High levels of HCV core+1 antibodies in HCV patients with hepatocellular carcinoma." *J Gen Virol* **92**(Pt 6): 1343-1351.
- Dao, T., W. Z. Mehal, et al. (1998). "IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells." *J Immunol* **161**(5): 2217-2222.
- de Bruijne, J., C. J. Weegink, et al. (2009). "New developments in the antiviral treatment of hepatitis C." *Vox Sang* **97**(1): 1-12.
- Deutsch, M. and S. J. Hadziyannis (2008). "Old and emerging therapies in chronic hepatitis C: an update." *J Viral Hepat* **15**(1): 2-11.
- Dhiman, R. K. and Y. Chawla (2005). "Acute viral hepatitis C should be treated." *Indian J Gastroenterol* **24**(2): 68-71.
- Diehl, S. and M. Rincon (2002). "The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation." *Mol Immunol* **39**(9): 531-536.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1996). "The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C." *J Mol Med (Berl)* **74**(10): 583-588.
- Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." *Lancet* **346**(8981): 1006-1007.
- Dinarello, C. A. (1999). "IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family." *J Allergy Clin Immunol* **103**(1 Pt 1): 11-24.
- Dore, G. J., M. MacDonald, et al. (2003). "Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia." *Aust Fam Physician* **32**(10): 796-798.
- Drexler, J. F. (2009). "A Novel Diagnostic Target in the Hepatitis C Virus Genome." **6**.
- Drummer, H. E., A. Maerz, et al. (2003). "Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins." *FEBS Lett* **546**(2-3): 385-390.
- Dubuisson, J., F. Helle, et al. (2008). "Early steps of the hepatitis C virus life cycle." *Cell Microbiol* **10**(4): 821-827.
- Dustin, L. B. and C. M. Rice (2007). "Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C." *Annu Rev Immunol* **25**: 71-99.
- Egger, D., B. Wolk, et al. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex." *J Virol* **76**(12): 5974-5984.
- Einav, S., M. Elazar, et al. (2004). "A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication." *J Virol* **78**(20): 11288-11295.
- El-Hage, N. and G. Luo (2003). "Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA." *J Gen Virol* **84**(Pt 10): 2761-2769.

- El Awady, M. K., H. M. Azzazy, et al. (2009). "Positional effect of mutations in 5'UTR of hepatitis C virus 4a on patients' response to therapy." *World J Gastroenterol* **15**(12): 1480-1486.
- Enomoto, N., I. Sakuma, et al. (1995). "Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region." *J Clin Invest* **96**(1): 224-230.
- Esteban, J. I., S. Sauleda, et al. (2008). "The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe." *J Hepatol* **48**(1): 148-162.
- Evans, M. J., T. von Hahn, et al. (2007). "Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry." *Nature* **446**(7137): 801-805.
- Fan, Z., Q. R. Yang, et al. (1999). "Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein." *J Med Virol* **59**(2): 131-134.
- Farci, P., R. Strazzera, et al. (2002). "Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3081-3086.
- Farrel, R. (2010) "RNA methodologies."
- Feinstone, S. M., A. Z. Kapikian, et al. (1975). "Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B." *N Engl J Med* **292**(15): 767-770.
- Feld, J. J. and J. H. Hoofnagle (2005). "Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C." *Nature* **436**(7053): 967-972.
- Ferrari, E., J. Wright-Minogue, et al. (1999). "Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in Escherichia coli." *J Virol* **73**(2): 1649-1654.
- Fischer, R., T. Baumert, et al. (2007). "Hepatitis C virus infection and apoptosis." *World J Gastroenterol* **13**(36): 4865-4872.
- Fletcher, N. F., J. P. Yang, et al. (2010). "Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines." *Gastroenterology* **139**(4): 1365-1374.
- Foster, T. L., T. Belyaeva, et al. (2010). "All three domains of the hepatitis C virus nonstructural NS5A protein contribute to RNA binding." *J Virol* **84**(18): 9267-9277.
- Frasca, L., P. Del Porto, et al. (1999). "Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells." *J Immunol* **163**(2): 650-658.
- Fridell, R. A., D. Qiu, et al. (2010). "Resistance analysis of the hepatitis C virus NS5A inhibitor BMS-790052 in an in vitro replicon system." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(9): 3641-3650.
- Friebe, P. and R. Bartenschlager (2002). "Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication." *J Virol* **76**(11): 5326-5338.
- Friebe, P., V. Lohmann, et al. (2001). "Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication." *J Virol* **75**(24): 12047-12057.
- Furuse, M. and S. Tsukita (2006). "Claudins in occluding junctions of humans and flies." *Trends Cell Biol* **16**(4): 181-188.
- Gale, M., Jr. (2003). "Effector genes of interferon action against hepatitis C virus." *Hepatology* **37**(5): 975-978.
- Gale, M. J., Jr., M. J. Korth, et al. (1997). "Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein." *Virology* **230**(2): 217-227.
- Gastaminza, P., K. A. Dryden, et al. (2010). "Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture." *J Virol* **84**(21): 10999-11009.
- Gavel, Y. and G. von Heijne (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." *Protein Eng* **3**(5): 433-442.
- Ge, D., J. Fellay, et al. (2009). "Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance." *Nature* **461**(7262): 399-401.
- GeneCards. "OAS-3." 2012, from <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OAS3>.

- Germi, R., J. M. Crance, et al. (2002). "Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption." *J Med Virol* **68**(2): 206-215.
- Ghany, M. G., D. B. Strader, et al. (2009). "Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update." *Hepatology* **49**(4): 1335-1374.
- Goff, S. P. (2004). "Retrovirus restriction factors." *Mol Cell* **16**(6): 849-859.
- Goffard, A., N. Callens, et al. (2005). "Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins." *J Virol* **79**(13): 8400-8409.
- Gorrell, M. D. (2005). "Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders." *Clin Sci (Lond)* **108**(4): 277-292.
- Gosert, R., D. Egger, et al. (2003). "Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons." *J Virol* **77**(9): 5487-5492.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." *J Virol* **67**(5): 2832-2843.
- Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(22): 10583-10587.
- Gramenzi, A., P. Andreone, et al. (2005). "Cytokine profile of peripheral blood mononuclear cells from patients with different outcomes of hepatitis C virus infection." *J Viral Hepat* **12**(5): 525-530.
- Grebely, J., M. Prins, et al. (2012). "Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine." *Lancet Infect Dis* **12**(5): 408-414.
- Gremion, C. and A. Cerny (2005). "Hepatitis C virus and the immune system: a concise review." *Rev Med Virol* **15**(4): 235-268.
- Gretton, S. N., A. I. Taylor, et al. (2005). "Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci." *J Gen Virol* **86**(Pt 5): 1415-1421.
- Griffin, S. D., L. P. Beales, et al. (2003). "The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine." *FEBS Lett* **535**(1-3): 34-38.
- Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response." *Annu Rev Immunol* **19**: 65-91.
- Gupta, R., M. Subramani, et al. (2006). "Analysis of mutations within the 5' untranslated region, interferon sensitivity region, and PePHD region as a function of response to interferon therapy in hepatitis C virus-infected patients in India." *J Clin Microbiol* **44**(3): 709-715.
- Halliday, J., P. Klenerman, et al. (2011). "Vaccination for hepatitis C virus: closing in on an evasive target." *Expert Rev Vaccines* **10**(5): 659-672.
- Han, J. H. and M. Houghton (1992). "Group specific sequences and conserved secondary structures at the 3' end of HCV genome and its implication for viral replication." *Nucleic Acids Res* **20**(13): 3520.
- Harvey, C. E., J. J. Post, et al. (2003). "Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation." *J Leukoc Biol* **74**(3): 360-369.
- Hayashi, N. and E. Mita (1999). "Involvement of Fas system-mediated apoptosis in pathogenesis of viral hepatitis." *J Viral Hepat* **6**(5): 357-365.
- Hayashida, A., N. Inaba, et al. (2007). "Re-evaluation of the true rate of hepatitis C virus mother-to-child transmission and its novel risk factors based on our two prospective studies." *J Obstet Gynaecol Res* **33**(4): 417-422.
- He, X.-S. (2006). Regulation of Adaptive Immunity by HCV. *Hepatitis C Virus, Genomes and Molecular Biology*. S.-L. Tan. Horizon bioscience.
- Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, et al. (2006). "Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6." *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(3): 173-188.

- Helbig, K. J., D. T. Lau, et al. (2005). "Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector." *Hepatology* **42**(3): 702-710.
- Helle, F. and J. Dubuisson (2008). "Hepatitis C virus entry into host cells." *Cell Mol Life Sci* **65**(1): 100-112.
- Honda, M., M. R. Beard, et al. (1999). "A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation." *J Virol* **73**(2): 1165-1174.
- Honda, M., E. A. Brown, et al. (1996). "Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA." *RNA* **2**(10): 955-968.
- Hsu, C. S., S. J. Hsu, et al. (2011). "Association of IL28B gene variations with mathematical modeling of viral kinetics in chronic hepatitis C patients with IFN plus ribavirin therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(9): 3719-3724.
- Huang, L., J. Hwang, et al. (2005). "Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein." *J Biol Chem* **280**(43): 36417-36428.
- Hugle, T., F. Fehrmann, et al. (2001). "The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein." *Virology* **284**(1): 70-81.
- Hurtado, C. W., L. Golden-Mason, et al. (2010). "Innate immune function in placenta and cord blood of hepatitis C--seropositive mother-infant dyads." *PLoS One* **5**(8): e12232.
- Hwang, J., L. Huang, et al. (2010). "Hepatitis C virus nonstructural protein 5A: biochemical characterization of a novel structural class of RNA-binding proteins." *J Virol* **84**(24): 12480-12491.
- Invitrogen, L. T. "SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR".
- Invitrogen™ (2006). SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR.
- Isagulants, M. G., A. Widell, et al. (2002). "Antibody responses against B-cell epitopes of the hypervariable region 1 of hepatitis C virus in self-limiting and chronic human hepatitis C followed-up using consensus peptides." *J Med Virol* **66**(2): 204-217.
- Ito, K., K. Higami, et al. (2011). "The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B." *J Clin Microbiol* **49**(5): 1853-1860.
- Ito, T., S. M. Tahara, et al. (1998). "The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site." *J Virol* **72**(11): 8789-8796.
- Jacobson, I. M., J. G. McHutchison, et al. (2011). "Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection." *N Engl J Med* **364**(25): 2405-2416.
- Jensen, D. M., T. R. Morgan, et al. (2006). "Early identification of HCV genotype 1 patients responding to 24 weeks peginterferon alpha-2a (40 kd)/ribavirin therapy." *Hepatology* **43**(5): 954-960.
- Ji, H., C. S. Fraser, et al. (2004). "Coordinated assembly of human translation initiation complexes by the hepatitis C virus internal ribosome entry site RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(49): 16990-16995.
- Jr, D. S. C. a. M. G. (2006). HCV Regulation of Host Defense. *Hepatitis C Virus, Genomes and Molecular Biology*. S.-L. Tan. Horizon bioscience.
- Kakumu, S., A. Okumura, et al. (1997). "Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease." *Clin Exp Immunol* **109**(3): 458-463.
- Kaneko, T., Y. Tanji, et al. (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(1): 320-326.
- Kaplanski, G., C. Farnarier, et al. (1997). "Increased levels of soluble adhesion molecules in the serum of patients with hepatitis C. Correlation with cytokine concentrations and liver inflammation and fibrosis." *Dig Dis Sci* **42**(11): 2277-2284.

- Kawai, T. and S. Akira (2009). "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition." Int Immunol **21**(4): 317-337.
- Kennard, J. (2006) "Signs and Symptoms of Hepatitis, Diagnostic tests for hepatitis."
- Khromykh, A. A., H. Meka, et al. (2001). "Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication." J Virol **75**(14): 6719-6728.
- Khromykh, A. A. and E. G. Westaway (1997). "Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications." J Virol **71**(2): 1497-1505.
- Kieft, J. S., K. Zhou, et al. (2001). "Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA." RNA **7**(2): 194-206.
- Kim, J. L., K. A. Morgenstern, et al. (1996). "Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide." Cell **87**(2): 343-355.
- Kolykhalov, A. A., S. M. Feinstone, et al. (1996). "Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA." J Virol **70**(6): 3363-3371.
- Koo, B. C., P. McPoland, et al. (2006). "Relationships between hepatitis C virus replication and CXCL-8 production in vitro." J Virol **80**(16): 7885-7893.
- Kountouras, J., C. Zavos, et al. (2003). "Apoptosis in hepatitis C." J Viral Hepat **10**(5): 335-342.
- Krieger, N., V. Lohmann, et al. (2001). "Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations." J Virol **75**(10): 4614-4624.
- Kuby, R. A. G. J. (2003). Immunology.
- Kuo, G., Q. L. Choo, et al. (1989). "An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis." Science **244**(4902): 362-364.
- Kupfer, B. (2012). HCV Structure and Viral Replication The Flying Publisher, Short Guide to Hepatitis C
- Lagging, M., A. I. Romero, et al. (2006). "IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection." Hepatology **44**(6): 1617-1625.
- Lauer, G. M., E. Barnes, et al. (2004). "High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection." Gastroenterology **127**(3): 924-936.
- Lavanchy, D. (2011). "Evolving epidemiology of hepatitis C virus." Clin Microbiol Infect **17**(2): 107-115.
- Lavie, M., A. Goffard, et al. (2006). HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1-E2 Heterodimer. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- Le Guen, B., G. Squadrito, et al. (1997). "Hepatitis C virus genome complexity correlates with response to interferon therapy: a study in French patients with chronic hepatitis C." Hepatology **25**(5): 1250-1254.
- Lechner, F., D. K. Wong, et al. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." J Exp Med **191**(9): 1499-1512.
- Leruez-Ville, M., J. M. Kunstmann, et al. (2000). "Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men." Lancet **356**(9223): 42-43.
- Lesburg, C. A., M. B. Cable, et al. (1999). "Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site." Nat Struct Biol **6**(10): 937-943.
- Lin, C., J. W. Wu, et al. (1997). "The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins." J Virol **71**(9): 6465-6471.
- Lin, W., S. S. Kim, et al. (2006). "Hepatitis C virus core protein blocks interferon signaling by interaction with the STAT1 SH2 domain." J Virol **80**(18): 9226-9235.
- Lin, W., W. L. Tsai, et al. (2010). "Hepatitis C virus regulates transforming growth factor beta1 production through the generation of reactive oxygen species in a nuclear factor kappaB-dependent manner." Gastroenterology **138**(7): 2509-2518, 2518 e2501.

- Lindenbach, B. D., M. J. Evans, et al. (2005). "Complete replication of hepatitis C virus in cell culture." *Science* **309**(5734): 623-626.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." *Nature* **436**(7053): 933-938.
- Lohmann, V., F. Korner, et al. (1997). "Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity." *J Virol* **71**(11): 8416-8428.
- Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." *Science* **285**(5424): 110-113.
- Loza, M. J. and B. Perussia (2004). "Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN." *Int Immunol* **16**(1): 23-32.
- Lundin, M., H. Lindstrom, et al. (2006). "Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein." *J Gen Virol* **87**(Pt 11): 3263-3272.
- Luo, G., S. Xin, et al. (2003). "Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA." *J Virol* **77**(5): 3312-3318.
- Lusa (2011) "Hepatites/contágio."
- Macdonald, A., K. Crowder, et al. (2004). "The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity." *J Gen Virol* **85**(Pt 3): 721-729.
- Macdonald, A. and M. Harris (2004). "Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein." *J Gen Virol* **85**(Pt 9): 2485-2502.
- Machida, K., K. Tsukiyama-Kohara, et al. (2001). "Inhibition of cytochrome c release in Fas-mediated signaling pathway in transgenic mice induced to express hepatitis C viral proteins." *J Biol Chem* **276**(15): 12140-12146.
- Malta Fde, M., J. E. Medeiros-Filho, et al. (2010). "Sequencing of E2 and NS5A regions of HCV genotype 3a in Brazilian patients with chronic hepatitis." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **105**(1): 92-98.
- Manavi, M., T. Watkins-Riedel, et al. (1999). "Evidence of hepatitis C virus in cervical smears." *J Infect* **38**(1): 60-61.
- Markus Cornberg, S. H., Kerstin Port, and H. W. Michael P. Manns (2012). Hepatitis C Standard of Care The 2012 Short Guide to Hepatitis C
- Martinho, A. (2010). Molecular epidemiology of viral hepatitis C in Portugal.
- Mathy, J. E., S. Ma, et al. (2008). "Combinations of cyclophilin inhibitor NIM811 with hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B polymerase inhibitors enhance antiviral activity and suppress the emergence of resistance." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(9): 3267-3275.
- McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." *J Viral Hepat* **7**(1): 2-14.
- McLauchlan, J., M. K. Lemberg, et al. (2002). "Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets." *EMBO J* **21**(15): 3980-3988.
- Meertens, L., C. Bertaux, et al. (2006). "Hepatitis C virus entry requires a critical postinternalization step and delivery to early endosomes via clathrin-coated vesicles." *J Virol* **80**(23): 11571-11578.
- Miller, R. H. and R. H. Purcell (1990). "Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6): 2057-2061.
- Moller, M. e. (2006). PCR, second edition, The Basis.
- Moradpour, D., V. Brass, et al. (2004). "Membrane association of the RNA-dependent RNA polymerase is essential for hepatitis C virus RNA replication." *J Virol* **78**(23): 13278-13284.
- Moradpour, D., V. Brass, et al. (2005). "Function follows form: the structure of the N-terminal domain of HCV NS5A." *Hepatology* **42**(3): 732-735.

- Morgello, S. (2005). "The nervous system and hepatitis C virus." *Semin Liver Dis* **25**(1): 118-121.
- Moucari, R., T. Asselah, et al. (2008). "Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level, and liver fibrosis." *Gastroenterology* **134**(2): 416-423.
- Moura, A. S., R. A. Carmo, et al. (2009). "Soluble inflammatory markers as predictors of hepatocellular damage and therapeutic response in chronic hepatitis C." *Braz J Infect Dis* **13**(5): 375-382.
- Moura, A. S., R. A. Carmo, et al. (2011). "Soluble inflammatory markers as predictors of virological response in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with interferon-alpha plus ribavirin." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **106**(1): 38-43.
- Nedderrmann, P., A. Clementi, et al. (1999). "Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein." *J Virol* **73**(12): 9984-9991.
- Nelson, D. R., Z. Tu, et al. (2003). "Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect." *Hepatology* **38**(4): 859-868.
- Neuman, M. G., J. P. Benhamou, et al. (2001). "Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C." *Clin Biochem* **34**(3): 173-182.
- Neumann, A. U., N. P. Lam, et al. (1998). "Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy." *Science* **282**(5386): 103-107.
- Nguyen, M. H. and E. B. Keeffe (2005). "Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5, and 6." *Clin Gastroenterol Hepatol* **3**(10 Suppl 2): S97-S101.
- Obeid, O. E. (2011). "Hepatitis C virus (HCV) and the genome-wide association studies: The role of IL-28B in HCV chronicity." *International Research Journal of Microbiology (IRJM)* **Vol. 2(12) pp. 479-483**.
- Obeid, S., S. S. Printsevskaya, et al. (2011). "Inhibition of hepatitis C virus replication by semi-synthetic derivatives of glycopeptide antibiotics." *J Antimicrob Chemother* **66**(6): 1287-1294.
- Ogata, S., R. H. Florese, et al. (2003). "Identification of hepatitis C virus (HCV) subtype 1b strains that are highly, or only weakly, associated with hepatocellular carcinoma on the basis of the secondary structure of an amino-terminal portion of the HCV NS3 protein." *J Clin Microbiol* **41**(7): 2835-2841.
- Oh, J. W., G. T. Sheu, et al. (2000). "Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template." *J Biol Chem* **275**(23): 17710-17717.
- Osburn, W. O., B. E. Fisher, et al. (2010). "Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection." *Gastroenterology* **138**(1): 315-324.
- Otto, G. A., P. J. Lukavsky, et al. (2002). "Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction." *RNA* **8**(7): 913-923.
- Otto, G. A. and J. D. Puglisi (2004). "The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation." *Cell* **119**(3): 369-380.
- Oyanagi, Y., T. Takahashi, et al. (1999). "Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C." *Liver* **19**(6): 464-472.
- Park, J., W. Kang, et al. (2012). "Hepatitis C virus infection enhances TNFalpha-induced cell death via suppression of NF-kappaB." *Hepatology*.
- Pascu, M., P. Martus, et al. (2004). "Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences." *Gut* **53**(9): 1345-1351.
- Patargias, G., N. Zitzmann, et al. (2006). "Protein-protein interactions: modeling the hepatitis C virus ion channel p7." *J Med Chem* **49**(2): 648-655.

- Paul, A. V., J. H. van Boom, et al. (1998). "Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase." *Nature* **393**(6682): 280-284.
- Pawlotsky, J. M. (1999). "Diagnostic tests for hepatitis C." *J Hepatol* **31 Suppl 1**: 71-79.
- Pawlotsky, J. M. (2002). "Molecular diagnosis of viral hepatitis." *Gastroenterology* **122**(6): 1554-1568.
- Pawlotsky, J. M., S. Chevaliez, et al. (2007). "The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies." *Gastroenterology* **132**(5): 1979-1998.
- Pawlotsky, J. M., G. Germanidis, et al. (1998). "Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations." *J Virol* **72**(4): 2795-2805.
- Penin, F., J. Dubuisson, et al. (2004). "Structural biology of hepatitis C virus." *Hepatology* **39**(1): 5-19.
- Pereira, A. A. and I. M. Jacobson (2009). "New and experimental therapies for HCV." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **6**(7): 403-411.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Piccininni, S., A. Varaklioti, et al. (2002). "Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein." *J Biol Chem* **277**(47): 45670-45679.
- Pietschmann, T., A. Kaul, et al. (2006). "Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(19): 7408-7413.
- Pileri, P., Y. Uematsu, et al. (1998). "Binding of hepatitis C virus to CD81." *Science* **282**(5390): 938-941.
- Ploss, A., M. J. Evans, et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." *Nature* **457**(7231): 882-886.
- Polyak, S. J., K. S. Khabar, et al. (2001). "Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy." *J Virol* **75**(13): 6209-6211.
- Polyak, S. J., K. C. Klein, et al. (2006). Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. S. L. Tan. Norfolk (UK).
- Polyak, S. J., S. McArdle, et al. (1998). "Evolution of hepatitis C virus quasispecies in hypervariable region 1 and the putative interferon sensitivity-determining region during interferon therapy and natural infection." *J Virol* **72**(5): 4288-4296.
- Pondé (2011). "Hidden hazards of HCV transmission." *Medical microbiology and immunology*
- Poordad, F., J. McCone, Jr., et al. (2011). "Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection." *N Engl J Med* **364**(13): 1195-1206.
- Poynard, T., M. Colombo, et al. (2009). "Peginterferon alfa-2b and ribavirin: effective in patients with hepatitis C who failed interferon alfa/ribavirin therapy." *Gastroenterology* **136**(5): 1618-1628 e1612.
- Poynard, T., F. Imbert-Bismut, et al. (2004). "Overview of the diagnostic value of biochemical markers of liver fibrosis (FibroTest, HCV FibroSure) and necrosis (ActiTest) in patients with chronic hepatitis C." *Comp Hepatol* **3**(1): 8.
- PreAnalytiX (2008). Manual do PAXgene® Blood RNA Kit PreAnalytiX. Q. B. Company.
- Premkumar, A., L. Wilson, et al. (2004). "Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride." *FEBS Lett* **557**(1-3): 99-103.
- Promega. "GoTaq® Amplification Family." 2012, from <http://www.promega.com/products/pcr/routine-pcr/gotaq-amplification-family/>.
- QIAGEN (2011). QuantiTect® SYBR Green PCR Handbook®
- Radhakrishnana (1999). Improved sensitivity of reverse transcriptase polymerase chain reaction for hepatitis C virus

- using random hexamer primers. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. E. Science. **33**.
- Radkowski, M., A. Bednarska, et al. (2004). "Infection of primary human macrophages with hepatitis C virus in vitro: induction of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 8." J Gen Virol **85**(Pt 1): 47-59.
- Ranjith-Kumar, C. T., L. Gutshall, et al. (2002). "Requirements for de novo initiation of RNA synthesis by recombinant flaviviral RNA-dependent RNA polymerases." J Virol **76**(24): 12526-12536.
- Ranjith-Kumar, C. T., Y. C. Kim, et al. (2002). "Mechanism of de novo initiation by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: role of divalent metals." J Virol **76**(24): 12513-12525.
- Rathindra M Mukherjee, B. B., Puja Gangwal, Aparna Jakkampudi, Panyala B Reddy, Padaki N Rao, Rajesh Gupta, D Nageshwar Reddy (2012). "Human Interferon Regulatory Factor 2 Gene Expression is Induced in Chronic Hepatitis C Virus Infection—A Possible Mode of Viral Persistence." Journal of Clinical Experimental Hepatology **2**(1): 27-34.
- Rauch, A., Z. Kutalik, et al. (2010). "Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study." Gastroenterology **138**(4): 1338-1345, 1345 e1331-1337.
- Rehermann, B. (2009). "Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence." J Clin Invest **119**(7): 1745-1754.
- Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." Nat Rev Immunol **5**(3): 215-229.
- Rehman, S., U. A. Ashfaq, et al. (2011). "Antiviral drugs against hepatitis C virus." Genet Vaccines Ther **9**: 11.
- Reynolds, G. M., H. J. Harris, et al. (2008). "Hepatitis C virus receptor expression in normal and diseased liver tissue." Hepatology **47**(2): 418-427.
- Rispeter, K., M. Lu, et al. (1997). "Cloning and characterization of a complete open reading frame of the hepatitis C virus genome in only two cDNA fragments." J Gen Virol **78** (Pt **11**): 2751-2759.
- Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, et al. (2008). "The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry." PLoS One **3**(4): e1866.
- Roche Expand Long Template PCR System.
- Roche "Hepatite C."
- Rustgi, V. K., W. M. Lee, et al. (2009). "Merimepodib, pegylated interferon, and ribavirin in genotype 1 chronic hepatitis C pegylated interferon and ribavirin nonresponders." Hepatology **50**(6): 1719-1726.
- Sandres, K., M. Dubois, et al. (2000). "Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy." J Virol **74**(2): 661-668.
- Santolini, E., G. Migliaccio, et al. (1994). "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein." J Virol **68**(6): 3631-3641.
- Sarrazin, C. L. a. C. (2012). New Drugs The 2012 Short Guide to Hepatitis C
- Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." EMBO J **21**(19): 5017-5025.
- Scherzer, T. M., A. F. Stattermayer, et al. (2011). "Impact of IL28B on treatment outcome in hepatitis C virus G1/4 patients receiving response-guided therapy with peginterferon alpha-2a (40KD)/ribavirin." Hepatology **54**(5): 1518-1526.
- Schmitt-Koppling (2008). "Capillary Electrophoresis, Methods and Protocols." Humana Press.
- Schulz, O., S. S. Diebold, et al. (2005). "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells." Nature **433**(7028): 887-892.
- Scott, J. D. and D. R. Gretch (2007). "Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review." JAMA **297**(7): 724-732.

- Serebrov, V. and A. M. Pyle (2004). "Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase." *Nature* **430**(6998): 476-480.
- Shackel, N. A. and G. W. McCaughan (2007). "Intrahepatic interferon-stimulated gene responses: can they predict treatment responses in chronic hepatitis C infection?" *Hepatology* **46**(5): 1326-1328.
- Shapiro, S., V. Gershtein, et al. (1998). "mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFN-alpha) treatment." *Clin Exp Immunol* **114**(1): 55-60.
- Sharma, A., A. Chakraborti, et al. (2009). "Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis." *Immunology* **128**(1 Suppl): e514-522.
- Shepard, C. W., L. Finelli, et al. (2005). "Global epidemiology of hepatitis C virus infection." *Lancet Infect Dis* **5**(9): 558-567.
- Shields, P. L., C. M. Morland, et al. (1999). "Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver." *J Immunol* **163**(11): 6236-6243.
- Shiffman, M. L. (2011). *Chronic Hepatitis C Virus: Advances in Treatment, Promise for the Future*.
- Shirota, Y., H. Luo, et al. (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." *J Biol Chem* **277**(13): 11149-11155.
- Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, et al. (2004). "Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection." *Annu Rev Microbiol* **58**: 391-424.
- Sillanpaa, M., K. Melen, et al. (2009). "Hepatitis C virus core, NS3, NS4B and NS5A are the major immunogenic proteins in humoral immunity in chronic HCV infection." *Virology* **6**: 84.
- Silva, J. (2003). "DETECÇÃO ELETROQUÍMICA EM ELETROFORESE CAPILAR." *Quimica Nova* **26**.
- Simmonds, P. (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." *J Gen Virol* **82**(Pt 4): 693-712.
- Simmonds, P. (2004). "Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on." *J Gen Virol* **85**(Pt 11): 3173-3188.
- Simmonds, P., J. Bukh, et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* **42**(4): 962-973.
- Simmonds, P., A. Tuplin, et al. (2004). "Detection of genome-scale ordered RNA structure (GORS) in genomes of positive-stranded RNA viruses: Implications for virus evolution and host persistence." *RNA* **10**(9): 1337-1351.
- Slater-Handshy, T., D. A. Droll, et al. (2004). "HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing." *Virology* **319**(1): 36-48.
- Smith, D. B., J. Mellor, et al. (1995). "Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group." *J Gen Virol* **76** (Pt 7): 1749-1761.
- Spahn, C. M., J. S. Kieft, et al. (2001). "Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit." *Science* **291**(5510): 1959-1962.
- Spangenberg, H. C., S. Viazov, et al. (2005). "Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection." *Hepatology* **42**(4): 828-837.
- Stattermayer, A. F., R. Stauber, et al. (2011). "Impact of IL28B genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naive patients with chronic hepatitis C." *Clin Gastroenterol Hepatol* **9**(4): 344-350 e342.
- Steinmann, E., F. Penin, et al. (2007). "Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions." *PLoS Pathog* **3**(7): e103.
- Su, A. I., T. Wiltshire, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(16): 6062-6067.

- Suppiah, V., M. Moldovan, et al. (2009). "IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy." *Nat Genet* **41**(10): 1100-1104.
- Takaki, A., M. Wiese, et al. (2000). "Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C." *Nat Med* **6**(5): 578-582.
- Tanaka, T., N. Kato, et al. (1996). "Structure of the 3' terminus of the hepatitis C virus genome." *J Virol* **70**(5): 3307-3312.
- Tanaka, Y., N. Nishida, et al. (2009). "Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C." *Nat Genet* **41**(10): 1105-1109.
- technologies, I. "Platinum®Taq DNA Polymerase." 2012, from <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/pcr-enzymes-master-mixes/taq-dna-polymerase-enzymes/platinum-taq-dna-polymerase.html>.
- Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, et al. (2004). "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." *J Biol Chem* **279**(47): 48576-48587.
- Thibeault, D., C. Bousquet, et al. (2004). "Sensitivity of NS3 serine proteases from hepatitis C virus genotypes 2 and 3 to the inhibitor BILN 2061." *J Virol* **78**(14): 7352-7359.
- Thimme, R., D. Oldach, et al. (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." *J Exp Med* **194**(10): 1395-1406.
- Tohme, R. A. and S. D. Holmberg (2010). "Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission?" *Hepatology* **52**(4): 1497-1505.
- Tsai, S. L., Y. F. Liaw, et al. (1997). "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity." *Hepatology* **25**(2): 449-458.
- Tuplin, A., J. Wood, et al. (2002). "Thermodynamic and phylogenetic prediction of RNA secondary structures in the coding region of hepatitis C virus." *RNA* **8**(6): 824-841.
- Veillon, P., C. Payan, et al. (2007). "Quasispecies evolution in NS5A region of hepatitis C virus genotype 1b during interferon or combined interferon-ribavirin therapy." *World J Gastroenterol* **13**(8): 1195-1203.
- Veldt, B. J., E. J. Heathcote, et al. (2007). "Sustained virologic response and clinical outcomes in patients with chronic hepatitis C and advanced fibrosis." *Ann Intern Med* **147**(10): 677-684.
- Vieira, A. (2001). *Engenharia Genética – princípios e aplicações*.
- Walewski, J. L., T. R. Keller, et al. (2001). "Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame." *RNA* **7**(5): 710-721.
- Walters, K. A., M. A. Joyce, et al. (2006). "Host-specific response to HCV infection in the chimeric SCID-beige/Alb-uPA mouse model: role of the innate antiviral immune response." *PLoS Pathog* **2**(6): e59.
- Wan, L., Y. J. Kung, et al. (2009). "Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha." *Biochem Biophys Res Commun* **379**(4): 855-860.
- Weiner, A. J., H. M. Geysen, et al. (1992). "Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3468-3472.
- Weissenborn, K., A. B. Tryc, et al. (2009). "Hepatitis C virus infection and the brain." *Metab Brain Dis* **24**(1): 197-210.
- WHO "Hepatitis C."
- Wolk, B., D. Sansonno, et al. (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines." *J Virol* **74**(5): 2293-2304.
- Xu, Z., J. Choi, et al. (2001). "Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift." *EMBO J* **20**(14): 3840-3848.

- Yamashita, T., S. Kaneko, et al. (1998). "RNA-dependent RNA polymerase activity of the soluble recombinant hepatitis C virus NS5B protein truncated at the C-terminal region." J Biol Chem **273**(25): 15479-15486.
- Yanagi, M., R. H. Purcell, et al. (1997). "Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8738-8743.
- Yao, N., P. Reichert, et al. (1999). "Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase." Structure **7**(11): 1353-1363.
- Yasui, K., T. Wakita, et al. (1998). "The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein." J Virol **72**(7): 6048-6055.
- Yi, M. and S. M. Lemon (2003). "3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA." J Virol **77**(6): 3557-3568.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, et al. (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.
- Yoshida, E. M., M. Sherman, et al. (2009). "Re-treatment with peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C who have relapsed or not responded to a first course of pegylated interferon-based therapy." Can J Gastroenterol **23**(3): 180-184.
- Younossi, Z. M., A. Baranova, et al. (2009). "Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin." Hepatology **49**(3): 763-774.
- Younossi, Z. M., A. Binerdinc, et al. (2012). "The impact of IL28B genotype on the gene expression profile of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha and ribavirin." J Transl Med **10**: 25.
- Yu, X., M. Qiao, et al. (2007). "Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles." Virology **367**(1): 126-134.
- Zeisel, M. B., G. Koutsoudakis, et al. (2007). "Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81." Hepatology **46**(6): 1722-1731.
- Zhang, S. Z., J. J. Liang, et al. (1999). "Cloning of the non-structural gene 3 of hepatitis C virus and its inducible expression in cultured cells." World J Gastroenterol **5**(2): 125-127.
- Zhang, Y., C. J. Ma, et al. (2011). "Cross-talk between programmed death-1 and suppressor of cytokine signaling-1 in inhibition of IL-12 production by monocytes/macrophages in hepatitis C virus infection." J Immunol **186**(5): 3093-3103.
- Zhou, X. M., P. K. Chan, et al. (2011). "Mutations around interferon sensitivity-determining region: a pilot resistance report of hepatitis C virus 1b in a Hong Kong population." World J Gastroenterol **17**(48): 5317-5323.
- Zhu, F. L., H. Y. Lu, et al. (1998). "Cloning and expression of NS3 cDNA fragment of HCV genome of Hebei isolate in E.coli." World J Gastroenterol **4**(2): 165-168.
- Zhu, Q., J. T. Guo, et al. (2003). "Replication of hepatitis C virus subgenomes in nonhepatic epithelial and mouse hepatoma cells." J Virol **77**(17): 9204-9210.