



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional

Seroprevalência e subtipos do vírus da hepatite C
circulantes em indivíduos co-infectados com o vírus da
imunodeficiência humana

Maria Raquel Baptista do Espírito Santo Rocha

FEVEREIRO 2010



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**Seroprevalência e subtipos do vírus da hepatite C
circulantes em indivíduos co-infectados com o vírus da
imunodeficiência humana**

Maria Raquel Baptista do Espírito Santo Rocha

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE
DE BIOLOGIA MOLECULAR EM MEDICINA TROPICAL E INTERNACIONAL**

Orientador: Professora Doutora Aida Esteves Simões
Unidade de Ensino e Investigação de Virologia
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

FEVEREIRO 2010

Publicação no âmbito deste trabalho:

ROCHA, M^a R., PARREIRA, R., PIEDADE, J.& ESTEVES, A., 2009. Epidemiology of hepatitis C virus among HIV co-infected individuals in the Lisbon urban area. *Book of Abstracts of Microbiotec09, Poster Session: S3-Clinical Microbiology and Epidemiology*, 28-30 Novembro, Vilamoura, Portugal.

Apresentação em formato poster:

ROCHA, M^a R., PARREIRA, R., PIEDADE, J.& ESTEVES, A., 2009. Epidemiology of hepatitis C virus among HIV co-infected individuals in the Lisbon urban area. Congresso Microbiotec09, Vilamoura, Portugal.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Aida Esteves Simões, pelo ensinamento e conhecimento que partilhou comigo ao longo da realização deste trabalho e pela sua paciência, ajuda e disponibilidade incondicional.

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira pela sua disponibilidade, paciência e ajuda.

Ao Professor Doutor João Piedade pela sua ajuda e disponibilidade.

À Teresa pela ajuda laboratorial e carinho com que me recebeu.

Aos meus colegas de mestrado, que fizeram com que todos os momentos valessem a pena, pela partilha e aprendizagem que tivemos juntos. À Cristina por todo o apoio, interajuda e cumplicidade.

À minha família pelo que representam para mim. À minha avó, à Mimi e ao Tá pelo carinho e incentivo sempre demonstrado.

Aos meus pais e irmã agradeço toda a paciência, amor e dedicação que me têm dado e demonstrado de várias formas ao longo da minha vida, sem os quais nada disto seria possível. Bem - Haja por serem assim.

Dedico esta tese aos meus pais.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
ÍNDICE GERAL.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O vírus da hepatite C.....	3
1.1.1 Constituição do Virião.....	3
1.1.2 Organização Genómica.....	3
1.1.3 Ciclo Replicativo.....	5
1.2 Epidemiologia da hepatite C.....	7
1.2.1 Prevalência.....	7
1.2.2 Modos de transmissão e factores de risco.....	9
1.3 Curso da infecção pelo VHC.....	10
1.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC.....	11
1.5 Terapêutica da hepatite C.....	12
1.6 Diversidade genética do VHC.....	13
1.6.1 Genótipos, subtipos e <i>quasispecies</i>	13
1.6.2 Determinação do genótipo/subtipo.....	15
1.6.3 Epidemiologia de genótipos e subtipos.....	16
1.7 Objectivos do estudo.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 População estudada.....	20
2.2 Detecção de anticorpos anti-VHC.....	20
2.3 Isolamento do RNA viral.....	20
2.4 Síntese do cDNA.....	21
2.5 Amplificação por PCR das regiões 5' UTR, C/E1 e NS5B do VHC.....	22
2.5.1 Desenho e características dos <i>primers</i>	22
2.5.2 Amplificação da 5' UTR.....	25
2.5.3 Amplificação das regiões C/E1 e NS5B.....	25
2.5.4 Análise dos produtos de PCR.....	28
2.6 Purificação e Sequenciação dos Produtos de PCR.....	28

2.7	Análise Bio-informática.....	28
2.8	Análise estatística.....	30
3.	RESULTADOS.....	31
3.1	Prevalência de anticorpos anti-VHC.....	32
3.2	Prevalência da infecção activa.....	32
3.3	Amplificação das regiões C/E1 e NS5B por RT-PCR.....	33
3.4	Análise Filogenética.....	36
4.	DISCUSSÃO.....	56
5.	CONCLUSÕES.....	65
6.	BIBLIOGRAFIA.....	68
	ANEXOS.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

Figura 1.1	Representação esquemática da estrutura do virião, com indicação dos constituintes.....	3
Figura 1.2	Representação da estrutura do genoma viral, com indicação das proteínas codificadas e das suas principais funções.....	4
Figura 1.3	Ilustração esquemática dos principais passos do ciclo replicativo do VHC.....	6
Figura 1.4	Distribuição global da prevalência estimada para a hepatite C.....	7
Figura 1.5	Prevalência da infecção por VHC nos países Europeus da OMS.....	8

2. MATERIAL E MÉTODOS

Figura 2.1	Esquema representativo da estratégia de PCR utilizada na amplificação das diferentes regiões genômicas do VHC estudadas, com indicação do local aproximado de hibridação dos vários <i>primers</i> utilizados.....	24
------------	--	----

3. RESULTADOS

Figura 3.1	Representação gráfica da percentagem de indivíduos com serologia positiva e negativa para os anticorpos anti-VHC na população estudada (n=66).....	32
Figura 3.2	Produtos de amplificação por PCR da região 5' UTR, após electroforese em gel de 1,5% de agarose.....	33
Figura 3.3	Produtos de amplificação por PCR da região C/E1, após electroforese em gel de 1,5% de agarose.....	34
Figura 3.4	Produtos de amplificação por PCR da região NS5B, após electroforese em gel de 1,5% de agarose.....	35
Figura 3.5	Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de HCV do presente estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC.....	38
Figura 3.6	Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC.....	40
Figura 3.7	Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do VHC (127 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente	

	estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC.....	42
Figura 3.8	Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 1 de VHC.....	44
Figura 3.9	Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 1 de VHC.....	45
Figura 3.10	Árvore filogenética baseada na concatenação das sequências das regiões C/E1 e NS5B do VHC (686 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 2 de VHC.....	46
Figura 3.11	Árvore filogenética baseada na concatenação das sequências das regiões C/E1 e NS5B do VHC (686 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 3 de VHC.....	48
Figura 3.12	Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 4 de VHC.....	50
Figura 3.13	Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 4 de VHC.....	52
Figura 3.14	Representação gráfica da distribuição (%) de subtipos do VHC determinados na população de UDIs co-infectados com VIH.....	53

ÍNDICE DE TABELAS

2. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 2.1	<i>Primers</i> utilizados na amplificação das três regiões do genoma de VHC e a sua localização em relação à sequência de referência H77...	23
Tabela 2.2	Condições de amplificação da 5'UTR na primeira reacção (I) e segunda reacção (II) do <i>heminested</i> PCR	25
Tabela 2.3	Condições de amplificação por PCR de C/E1 com os <i>primers</i> CEo_f e CEi_r.....	26
Tabela 2.4	Condições de amplificação de C/E1 na primeira reacção (<i>primers</i> CEo_f e CEo_r) e segunda reacção (<i>primers</i> CEo_f e CEi_r e CEi_r ou <i>primers</i> CEi_f e CEi_r).....	26
Tabela 2.5	Condições de amplificação por <i>heminested</i> PCR de C/E1 (<i>primers</i> CEo_f e CEo_r e CEo_f e CEi_r respectivamente na primeira e segunda reacções).....	27
Tabela 2.6	Condições de amplificação de NS5B por PCR (<i>primers</i> NS5Bi_f e NS5B_r) e <i>heminested</i> PCR (<i>primers</i> NS5Bo_f e NS5B_r seguidos de NS5Bi_f e NS5B_r).....	27

3. RESULTADOS

Tabela 3.1	Distâncias genéticas (%) das regiões C/E1 e NS5B para os subtipos analisados.....	54
------------	---	----

ABREVIATURAS

Alguns termos técnicos com origem na língua inglesa são utilizados no decorrer do texto desta tese, não tendo sido traduzidos visto fazerem parte de um glossário científico estabelecido na literatura internacional.

A, C, G, T	Bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina respectivamente)
Ac	Anticorpos
Ag	Antigénios
AF	África
ALT	Alanina-aminotransferase
AZT	Azidotimidina, do inglês <i>Azidothymidine</i>
BSL	Nível de segurança biológica, do inglês <i>Level of Biological Safety</i>
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Cauc	Caucasiana
ddI	Didanosina, do inglês <i>Didanosine</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados
EDTA	Etilenodiaminotetracetato
<i>e.g.</i>	Por exemplo, da locução latina <i>exempli gratia</i>
eIF2	Factor 2 de iniciação da tradução, do inglês <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2</i>
eIF3	Factor 3 de iniciação da tradução, do inglês <i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 3</i>
<i>et al.</i>	Da locução latina <i>et alii</i> , indicando na citação bibliográfica a existência de vários autores sendo apresentado apenas o primeiro
GBV-B	Vírus GB - B
HCl	Ácido clorídrico
HAART	Terapêutica Antiretroviral Altamente Activa, do inglês <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
<i>i.e.</i>	Isto é, da locução latina <i>id est</i>
IFN-α	Interferão α
IRES	Sítio interno da entrada dos ribossomas, do inglês <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
KCl	Cloreto de potássio

LDLR	Receptor das lipoproteínas de baixa densidade, do inglês <i>Low-Density Lipoprotein Receptor</i>
M	Molaridade
MgCl₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nt	Nucleótido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
Países:	
AG	Angola
AUS	Austrália
BR	Brasil
CAM	Camarões
CH	China
COR	Coreia
CV	Cabo Verde
EGP	Egipto
ESP	Espanha
EUA	Estados Unidos América
FR	França
G	Guiné-Bissau
GER	Alemanha
IND	Índia
INDO	Indonésia
IR	Irlanda
IT	Itália
JP	Japão
MZ	Moçambique
NTH	Holanda
NZ	Nova Zelândia
PT	Portugal
RUS	Rússia
ST	São Tomé e Príncipe
TAIW	Taiwan
TUR	Turquia
UK	Reino Unido
USA	Estados Unidos da América
VIET	Vietname
P	Nível de significância
pb	Pares de bases

PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução
pmol	Picomole = 10^{-12} mole
RBV	Ribavirina
RdRp	Polimerase RNA dependente RNA, do inglês <i>RNA dependent RNA polymerase</i>
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuclease
RT	Transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>
RT-PCR	Reacção em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa, do inglês <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i>
RVS	Resposta virológica sustentada
seg	Segundos
SPP	Protease do retículo endoplasmático, do inglês <i>Signal Peptide Peptidase</i>
SR-BI	Tipo de receptor, do inglês <i>Scavenger Receptor class B type I</i>
TAE	Tampão Tris-acetato EDTA
TMA	Ensaio Mediado por Transcrição, do inglês <i>Transcription Mediated Assay</i>
Tris-HCL	Tris Hidrocloreto
U	Unidade
UDIs	Utilizadores de drogas injectáveis
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i>
VHC	Vírus da hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
μ	Micro, prefixo que designa 10^{-6}
μg	Micrograma
μl	Microlitros
μM	Micromolar
χ²	Teste bioestatístico do qui-quadrado

RESUMO

Mundialmente, estima-se que 40 milhões de pessoas estejam infectadas com VIH, 5 milhões das quais cronicamente infectadas com VHC. A co-infecção com VIH aumenta a taxa de persistência do VHC, acelera a velocidade de progressão da doença hepática e reduz significativamente a resposta à terapia do VHC. O VHC possui extensa diversidade genética, sendo classificado em seis genótipos e cerca de 90 subtipos com padrões epidemiológicos e resposta à terapia distintos. Tendo isto presente e devido a serem limitados os dados relativos aos genótipos e subtipos do VHC circulantes em Portugal e ainda ao facto de os utilizadores de drogas injectáveis (UDIs) serem um grupo de risco importante para a co-infecção por VIH e VHC, realizámos um estudo retrospectivo para determinar a prevalência da infecção por VHC e a distribuição de subtipos deste vírus num grupo de UDIs infectados com VIH.

Amostras de plasma de 66 indivíduos (1998-2001) foram testadas para anticorpos anti-VHC (ensaio imunoenzimático) e RNA do VHC (amplificação da 5'UTR por RT-PCR). Para identificar os subtipos de VHC e detectar recombinantes, as amostras com RNA viral detectável foram sujeitas a amplificação, sequenciação e análise filogenética de sequências nucleotídicas parciais para C/E1 e NS5B.

Encontrámos que 86,4% dos indivíduos possuíam anticorpos anti-VHC, 93,0% dos quais com infecção activa. Todas as amostras, exceptuando duas, com RNA viral detectável originaram amplicões para C/E1 e NS5B. A análise filogenética permitiu incluir as estirpes de VHC nos subtipos 1a (43,8%), 1b (3,6%), 2a (1,8%), 3a (21,1%), 4a (8,8%) e 4d (15,8%), revelando um padrão epidemiológico semelhante ao dos UDIs de outros países do Sul da Europa. Apenas uma amostra apresentou discordância entre os subtipos das duas regiões (4d para C/E1 e 4a para NS5B) sugerindo um potencial recombinante intragenótipo.

No total, os subtipos 1a, 4a e 4d do VHC são responsáveis por 68,4% das infecções nos UDIs infectados com VIH analisados. Considerando que apenas 20-30% dos doentes positivos para VIH e co-infectados com os genótipos 1 e 4 respondem à terapia do VHC e que ocorre transmissão do VHC dos UDIs para a população em geral, são prioritários estudos alargados de vigilância epidemiológica e implementação de estratégias de prevenção para controlar ambos os vírus neste grupo de risco.

ABSTRACT

Among the estimated 40 million persons infected with HIV worldwide, about 5 million are chronically infected with HCV. Co-infection with HIV increases HCV persistence, accelerates HCV-related liver disease, and dramatically reduces HCV treatment response rates. Based on its genetic variability, HCV has been classified into six major genotypes and about 90 subtypes with distinct epidemiological patterns and response to therapy. With this in mind and given that the HCV genotypes and subtypes circulating in Portugal is largely unknown and that injection drug users (IDUs) are an important risk group for co-infection with HIV and HCV, we conducted a retrospective study to determine the prevalence of HCV infection and HCV subtype distribution in a group of IDUs infected with HIV.

Plasma samples, collected between 1998 and 2001 from 66 IDUs, were tested for anti-HCV antibodies (immunoenzymatic test) and for viral RNA (RT-PCR amplification of the 5'UTR region). To identify HCV subtypes and detect potential recombinants, samples positive for HCV RNA were further subjected to amplification, sequencing and phylogenetic analysis of partial C/E1 and NS5B sequences.

We found 86.4% of the individuals with antibodies anti-HCV, 93.0% of whom showed active infection. All but two samples with detectable HCV RNA were amplified for C/E1 and NS5B regions. Phylogenetic analysis allowed us to classify the HCV strains as subtypes 1a (43.8%), 1b (3.6%), 2a (1.8%), 3a (21.1%), 4a (8.8%), and 4d (15.8%), in agreement with the epidemiologic pattern described for IDUs from Southern European countries. Globally, C/E1 and NS5B based trees demonstrated similar topologies. However, one sample presented discordant subtypes for C/E1 (4d) and NS5B (4a), suggesting infection by a potential intragenotype recombinant of HCV.

Overall, HCV subtypes 1a, 4a, and 4d account for 68.4% of the infections in the group of HIV-infected IDUs under study. Considering that only 20-30% of the HIV-positive patients infected with genotypes 1 and 4 respond to current HCV therapy and the strong evidence that IDUs spread HCV to the general population, there is urgent need of further studies on HCV and HIV epidemiologic surveillance and effective preventive strategies to control both viruses in this risk group.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (VHC) é o agente etiológico das hepatites de transmissão parentérica, vulgarmente designadas de hepatites pós-transfusionais. A hepatite viral é uma doença sistémica tendo, primordialmente, como órgão alvo o fígado. Actualmente, encontram-se descritos cinco vírus associados a hepatite humana, os vírus das hepatites A, B, C, D e E, sendo todos diferentes a nível estrutural e biológico.

A hepatite C foi descrita pela primeira vez em meados dos anos 70, devido ao aparecimento de testes serológicos mais sensíveis que evidenciavam vários casos de hepatite cuja ocorrência não era devida à infecção pelos vírus da hepatite A ou da hepatite B, sendo a nova doença então designada de Não-A, Não-B. Simultaneamente, observou-se um aumento significativo de cirrose e carcinoma hepatocelular. Em 1989, após 15 anos de investigação, Choo e colaboradores recorrendo a técnicas de biologia molecular identificaram o agente causal desta infecção, que passou a designar-se vírus da hepatite C (VHC) (Choo *et al.*, 1989).

O VHC pertence ao género *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. Esta família inclui outros membros como os vírus da Dengue, Febre Amarela e West Nile com os quais o VHC partilha várias características estruturais e a organização genética. Contudo, considerando o genoma completo, a distância genética entre o VHC e os outros flavivírus é >50%. O VHC tem o Homem como único hospedeiro natural e apresenta distribuição mundial com uma taxa de prevalência global de cerca de 2,2-3%. Caracteriza-se por uma grande diversidade genética, representada por seis genótipos subdivididos em cerca de 90 subtipos, considerada um dos grandes obstáculos ao desenvolvimento de vacinas contra este vírus.

1.1 O vírus da hepatite C

1.1.1 Constituição do virião

O virião consiste numa partícula esférica de 40 a 70 nm de diâmetro, revestido por um invólucro lipídico, no interior do qual a proteína da cápside ou proteína do *core* (C) protege o RNA genómico viral. O invólucro tem inseridos heterodímeros das glicoproteínas E1 e E2 (Figura 1.1) (Moradpour *et al.*, 2007).

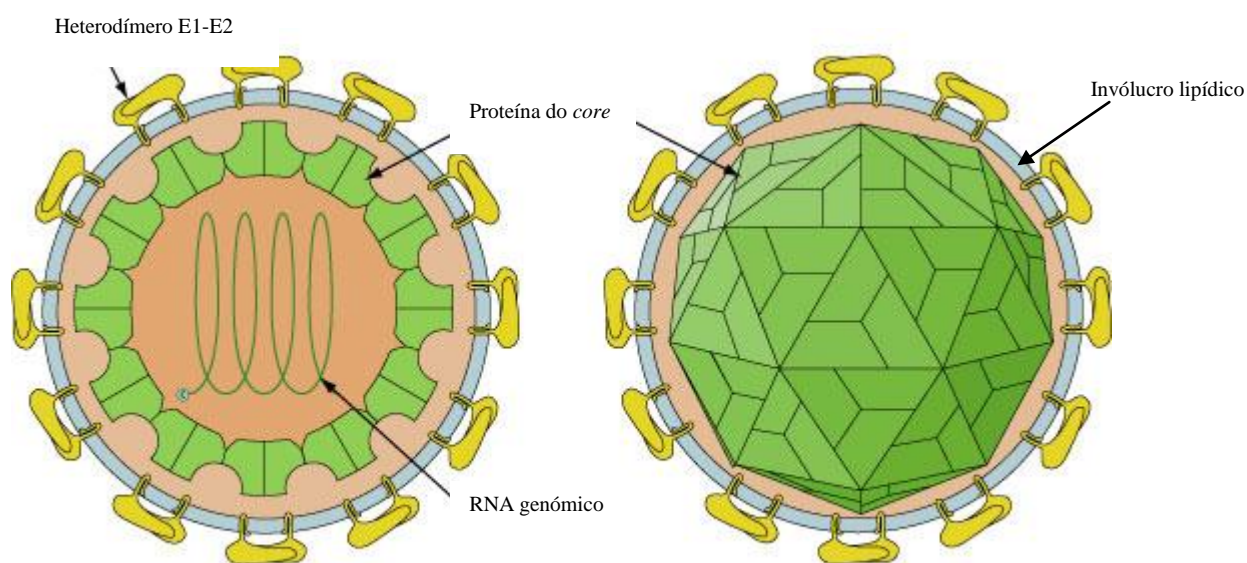


Figura 1.1 - Representação esquemática da estrutura do virião, com indicação dos constituintes (adaptado de <http://www.hcvdb.org/index>).

1.1.2 Organização Genómica

O VHC possui um genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva, de aproximadamente 9.600 nucleótidos de comprimento. O genoma contém uma única grelha de leitura aberta (*open reading frame*, ORF), que codifica uma poliproteína precursora com cerca de 3.000 aminoácidos. Nas extremidades 5' e 3', a ORF é flanqueada pelas regiões não traduzidas 5'UTR e 3'UTR (UTR, *untranslated region*) altamente conservadas, com cerca de 340 e 220-235 nucleótidos, respectivamente (Moradpour *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Timm e Roggendorf, 2007).

A 5'UTR possui quatro domínios altamente estruturados (I a IV) ricos em estruturas do tipo *stem-loop*. Os domínios II, III e IV constituem um sítio interno de entrada dos ribossomas (*Internal Ribosomal Entry Site, IRES*) essencial para a tradução independente de *cap 5'* e com capacidade para formar complexos de pré-iniciação da tradução estáveis, por ligação directa à subunidade 40S do ribossoma, constituindo o primeiro passo para a tradução da poliproteína. Esta região é igualmente importante para a replicação viral (Suzuki *et al.*, 2007; Timm e Roggendorf, 2007). A região 3'UTR, à semelhança da 5'UTR, é muito estruturada e crucial para a síntese do RNA viral (Suzuki *et al.*, 2007; Timm e Roggendorf, 2007).

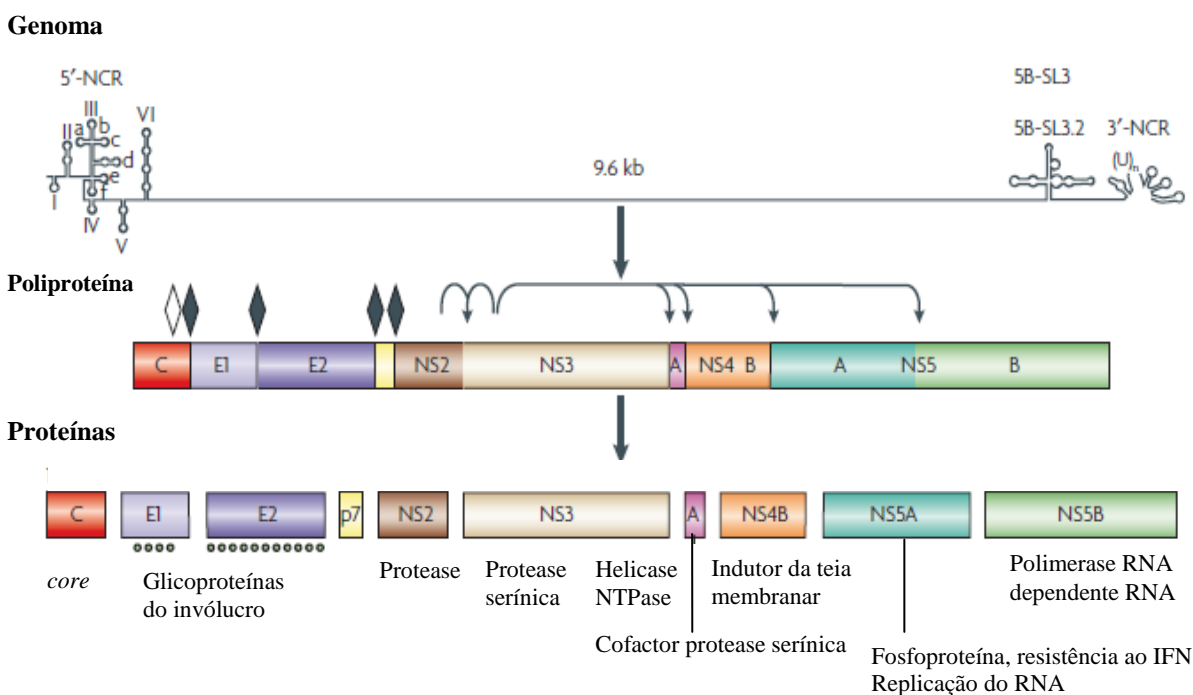


Figura 1.2 - Representação da estrutura do genoma viral, com indicação das proteínas codificadas e das suas principais funções. ♦ Indica os locais de clivagem do precursor da poliproteína do VHC por peptidase sinal do RE. ◄ Indica o local de clivagem pela protease SPP. ▽ Indica a clivagem pelas proteases NS2-3 e NS3-4A. ●●● indica glicosilação das proteínas do invólucro E1 e E2 (adaptado de Moradpour *et al.*, 2007).

Após tradução, por acção de proteases virais e celulares a poliproteína é hidrolisada dando origem a dez proteínas diferentes, quatro proteínas estruturais e seis proteínas não estruturais (Figura 1.2). As proteínas estruturais (C, E1 e E2) estão posicionadas no extremo amínico da poliproteína, enquanto as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) ocupam os restantes dois terços da poliproteína. Na junção das proteínas estruturais e não estruturais encontra-se uma pequena proteína adicional, p7, com propriedades de canal iónico e cuja presença na partícula viral é controversa (Figura 1.2) (Moradpour *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007; Timm e Roggendorf, 2007).

1.1.3 Ciclo replicativo

O ciclo replicativo do VHC, esquematicamente representado na Figura 1.3, pode ser dividido em seis etapas: (a) - ligação do vírus a receptores celulares e a sua internalização; (b) - descapsidação com libertação do RNA genómico para o citoplasma; (c) - tradução mediada por IRES, processamento da poliproteína e formação de complexos de replicação; (d) - replicação do RNA viral associada a estruturas membranares; (e) - montagem das partículas virais; (f) - maturação do virião e saída da célula.

Os hepatócitos são o principal alvo da replicação viral. O primeiro passo para a infecção por VHC consiste na ligação das partículas virais a receptores específicos na superfície da célula alvo. Várias moléculas têm sido descritas como estando envolvidas na ligação e entrada do VHC, *inter alia* CD81, receptores envolvidos no metabolismo de lípidos (LDLR e SR-BI) e claudina-1 (Sabahi, 2009). A interacção do vírus com os receptores celulares é mediada pela glicoproteína do invólucro E2, após o que ocorre endocitose em vesículas de clatrina e fusão das membranas viral e endossómica dependente de pH baixo (Sabahi, 2009). O RNA genómico é então traduzido através da ligação directa da estrutura IRES à subunidade 40S do ribossoma, seguido da associação dos factores de iniciação da tradução 2 e 3 (eIF2 e eIF3) e finalmente da subunidade 60S para formar um complexo de iniciação da tradução 80S (Fraser e Doudna, 2007).

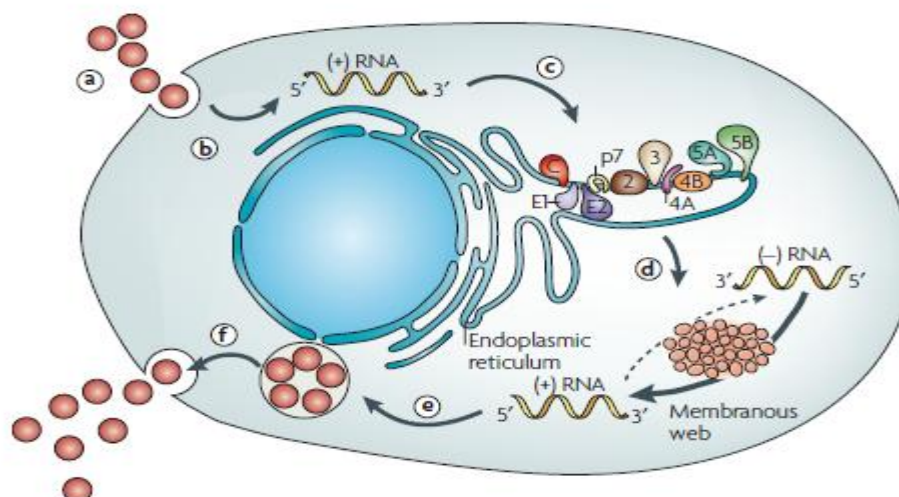


Figura 1.3 – Ilustração esquemática dos principais passos do ciclo replicativo do VHC, em que (a) - entrada do vírus; (b) - descapsidação; (c) - tradução e processamento da poliproteína; (d) - replicação do RNA viral; (e) - montagem das partículas virais; (f) - maturação do virião e saída da célula (adaptado de Moradpour *et al.*, 2007).

A poliproteína traduzida em associação com o retículo endoplasmático (RE) é processada inicialmente por peptidases celulares, dando origem às proteínas estruturais, e depois pelas proteases virais NS2-3 e NS3-4A com formação das proteínas não estruturais (Figura 1.2), todas elas, com exceção de NS2, necessárias à replicação do RNA viral (Lohmann *et al.*, 1999).

A replicação do RNA viral decorre no citoplasma em complexos de replicação associados a estruturas membranares características em forma de teia (Egger *et al.*, 2002). A síntese do RNA viral, catalisada pela polimerase de RNA dependente de RNA (RdRp, NS5B), ocorre em dois passos sucessivos. No primeiro o genoma viral serve de matriz à síntese de cadeias de polaridade negativa (intermediários replicativos) que, por sua vez, são usados como matriz para a síntese de numerosas cadeias de polaridade positiva. Estas são usadas em subsequentes ciclos de tradução e, posteriormente, encapsuladas em novas partículas virais.

No citoplasma forma-se a nucleocápside por oligomerização da proteína C e sua associação com o RNA genómico viral. A interação subsequente da nucleocápside com as glicoproteínas virais E1 e E2 associadas à membrana do RE permite, através de

gemulação para o lúmen do RE, a aquisição do invólucro viral e a saída da célula por exocitose (Moradpour *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007).

1.2 Epidemiologia da hepatite C

1.2.1 Prevalência

O VHC é uma das principais causas de doença hepática crônica que ocorre a nível mundial e de transplante hepático em países desenvolvidos. A elevada morbidade, mortalidade e custos associados à terapêutica constituem um elevado peso para os sistemas de saúde destes países (Mühlberger *et al.*, 2009; Rantala e de Laar, 2008; Shepard *et al.*, 2005).

Nos últimos 25 anos, a infecção por VHC tornou-se endêmica em todo o mundo e um importante problema de saúde pública mundial. Considerada pela OMS uma doença emergente, estima-se que aproximadamente 2,2-3,0% da população mundial se encontre infectada (*i.e.* 130-170 milhões de pessoas) (Lavanchy, 2009) verificando-se, no entanto, assimetrias geográficas quer no mesmo continente entre diferentes países quer no mesmo país entre diferentes áreas geográficas (Figura 1.4).

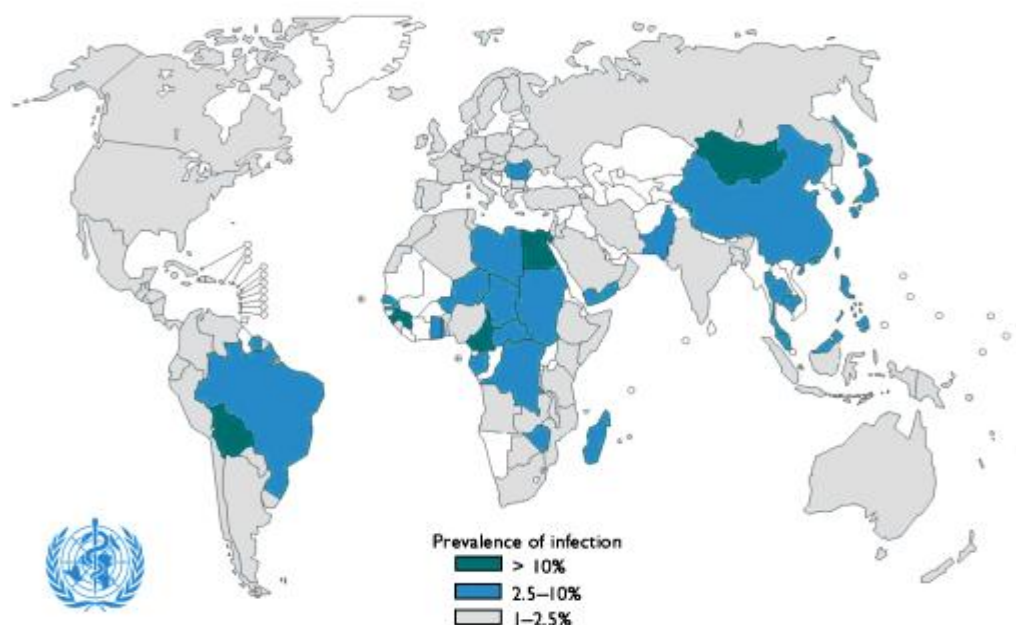


Figura 1. 4 – Distribuição global da prevalência estimada para a hepatite C (retirado de Lavanchy, 2009).

Assim, na Europa, América do Norte e Austrália a prevalência estimada é relativamente baixa (~1,0%) em comparação com outras áreas geográficas de África e Ásia, sendo o Egipto o país com maior prevalência (>15%) (Lavanchy, 2009; Kamal e Nasser, 2008; Rantala e de Laar, 2008). Contudo, a prevalência na Europa varia largamente entre países assim como dentro de cada país, apresentando um intervalo de 0,003% a 4,5%. As estimativas de prevalência mais baixas ($\leq 0,1\%$) são relativas aos países escandinavos, Áustria e Holanda e as mais elevadas ($\geq 1,2\%$) para a Grécia, Itália, Bulgária e Roménia (Figura. 1.5) (Mühlberger *et al.*, 2009).

Em Portugal, os dados relativos à infecção pelo VHC são limitados. No final da década de 90, as estimativas indicavam que cerca de 1,5% da população seria seropositiva para o VHC, sendo este responsável por 45% dos casos notificados de hepatite (Marinho *et al.*, 2001). Para o mesmo período de tempo, estimativas posteriores indicam valores mais baixos para Portugal, da ordem de 0,1-0,5% (Mühlberger *et al.*, 2009).

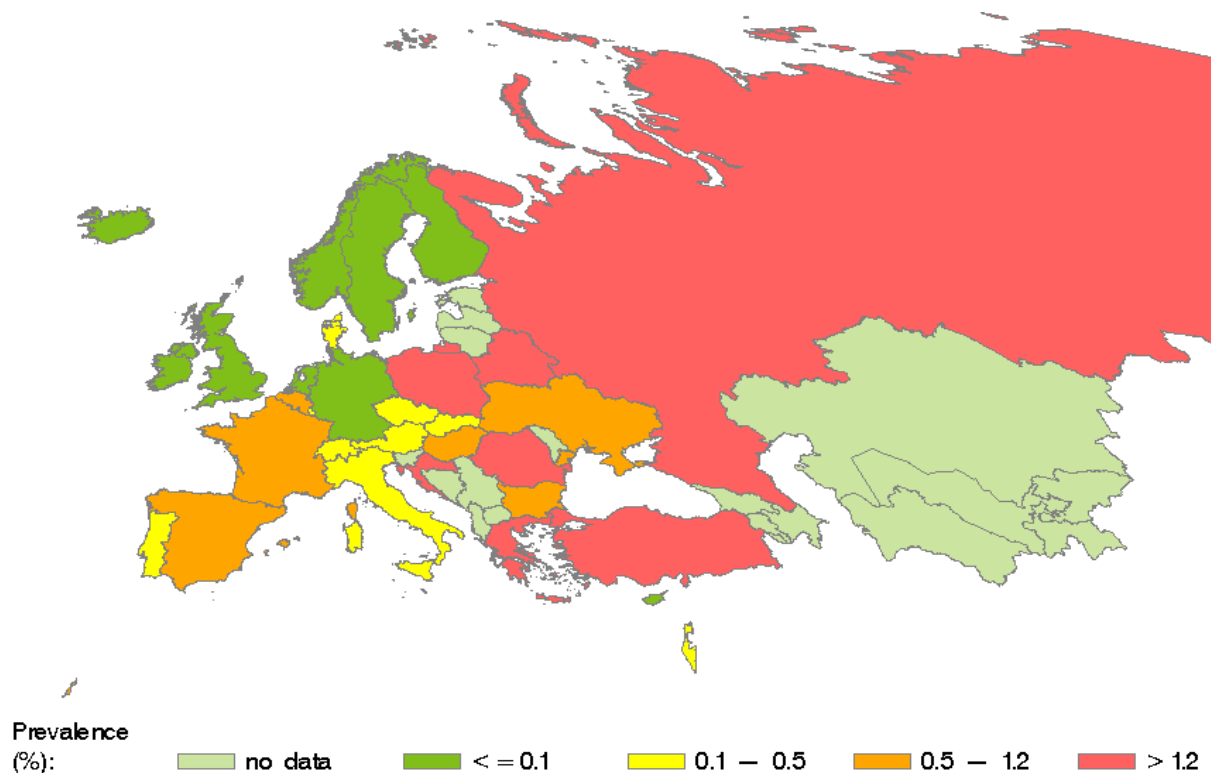


Figura 1. 5 – Prevalência da infecção por VHC nos países Europeus da OMS (retirado de Mühlberger *et al.*, 2009).

Nos EUA e Austrália 68% e 80%, respectivamente, das infecções são encontradas entre utilizadores de drogas injectáveis (UDIs) (Shepard *et al.*, 2005). Na União Europeia, as seroprevalências descritas para este grupo populacional são muito variáveis tanto entre países como dentro de um mesmo país. São muito comuns valores nacionais $\geq 60\%$, com alguns países da antiga União Soviética a apresentarem valores de 80-90% (EMCDDA, 2008). Em Portugal, no final de 2006, a percentagem de UDIs seropositivos para VHC era de 41,7-84,8% a nível nacional, com algumas regiões, designadamente no sul do país, apresentando valores $\geq 90\%$ (EMCDDA, 2008).

Devido a modos de transmissão comuns (ver secção seguinte, 1.2.2), a co-infecção por VHC e VIH é bastante frequente. Em 2005, estimava-se que a nível mundial 4-5 milhões de pessoas estariam infectadas por ambos os vírus correspondendo a cerca de 25% dos indivíduos infectados com VIH na Europa, Austrália e EUA (Singal e Anand, 2009; Thomas, 2008; Alter, 2006). No entanto, a prevalência de seropositivos VIH-VHC difere grandemente de acordo com o grupo de risco para a infecção pelo VIH. Uma vez que o VHC apresenta uma maior transmissão percutânea que o VIH (Gerberding, 1994), nos indivíduos seropositivos para VIH em que a utilização de drogas injectáveis é o factor de risco associado, os valores de prevalência de co-infecção com VHC atingem valores de 80-90% (Thomas, 2008; Alter, 2006; Verucchi *et al.*, 2004).

1.2.2 Modos de transmissão e factores de risco

O VHC é primariamente transmitido por via parentérica através do contacto com sangue infectado ou seus derivados. A transfusão de sangue e produtos derivados e o transplante de órgãos de dadores infectados, o consumo de drogas ilícitas injectáveis, a exposição a material cirúrgico contaminado ou inadequadamente esterilizado, a exposição ocupacional a sangue infectado (*e.g.* picadas com agulhas contaminadas), o nascimento de mães infectadas e a actividade sexual de risco com parceiros infectados são considerados factores de risco associados à aquisição da infecção por VHC (revisto em Alter, 2007; Alter 2002). Entre estes, a transfusão de sangue de dadores não testados, o consumo de drogas injectáveis e as infecções com agulhas reutilizadas são os mais importantes, registando-se, porém, diferenças temporais e geográficas significativas relativamente aos respectivos contributos para a disseminação do VHC.

Após a Segunda Guerra Mundial e até ao início da década de 90, a fonte mais importante de transmissão nos países desenvolvidos era a exposição a sangue

contaminado e seus derivados ou o consumo de drogas injectáveis. Com a aplicação dos testes de VHC ao rastreio das dádivas de sangue, o consumo de drogas injectáveis constitui actualmente o principal modo de transmissão nos países desenvolvidos e correspondia, no final da década de 90, a $\geq 40\%$ das infecções nos países em desenvolvimento e com economias de transição (Wasley e Alter, 2000). Nestes últimos países a reutilização de material de injeção é responsável por mais de 2 milhões de novas infecções anuais, correspondendo a 40% das infecções a nível mundial (Lavanchy, 2008; Hauri *et al.*, 2004). Esta prática quando do tratamento da chistosomíase endémica no Egipto foi responsável pela elevada prevalência de VHC verificada neste país. Modos de transmissão menos relevantes em termos de saúde pública e com menor variação geográfica incluem a transmissão perinatal (4-7%), ocupacional por picada acidental (1-2%) ou actividade sexual de risco (0-3%) (revisto em Lemon *et al.*, 2007).

1.3 Curso da infecção pelo VHC

Nos países industrializados, a infecção pelo VHC é responsável por 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crónica, 40% dos casos de cirrose terminal, 60% de carcinoma hepatocelular e 30% dos transplantes hepáticos (Mühlberger *et al.*, 2009).

A hepatite aguda, *i.e.* presença de sinais clínicos ou sintomas de hepatite num período de 6 meses após a presumível exposição ao vírus, surge apenas em cerca de 25% dos infectados, sendo subclínica ou assintomática nos restantes e consequentemente, não diagnosticada (Lavanchy *et al.*, 2008). Cerca de 1-2 semanas após a infecção, o RNA viral pode ser detectado no sangue, seguindo-se um aumento dos níveis de alanina-aminotransferase e lesões hepatocelulares, por vezes acompanhadas de sintomatologia ligeira (Blackard, 2008). Em média, 50-60 dias após a exposição são detectados anticorpos anti-VHC e resposta imune celular (Blackard, 2008; Page-Shafer *et al.*, 2008). No entanto, em 70% dos indivíduos infectados não há resolução espontânea da infecção e desenvolve-se uma infecção crónica com replicação viral activa e presença de RNA viral no sangue e tecido hepático. Durante muito tempo os indivíduos cronicamente infectados podem apresentar fadiga como único sintoma e, geralmente, apenas algumas décadas após o contágio surge doença hepática. Cerca de 10-20% destes indivíduos desenvolve cirrose num período de 10-30 anos e 1-5% evolui para carcinoma hepatocelular (de Bruijne *et al.*, 2009).

A infecção pelo VIH afecta adversamente a história natural da hepatite C em todas as fases. Assim, observa-se uma redução da probabilidade de resolução espontânea da infecção para <10% dos casos (Danta e Dusheiko, 2008) e uma vez estabelecida a infecção crónica pelo VHC, a progressão para fibrose é mais rápida, sendo o risco de cirrose duas vezes superior e o risco de falência hepática seis vezes superior comparativamente com a mono-infecção (Singal e Anand, 2009, Sulkowski, 2008; Graham *et al.*, 2001). Verifica-se igualmente uma maior incidência de carcinoma hepatocelular e o seu aparecimento mais precoce nos doentes co-infectados (García-Samaniego *et al.*, 2001). Ainda que a doença hepática crónica devido ao VHC seja uma das principais causas de morte nos infectados pelo VIH, o mecanismo de interacção entre os dois vírus e o seu impacto nas lesões hepáticas não está compreendido. Uma vez que o VHC não causa efeito citopático directo e a patogénese parece estar associada à resposta imune, poder-se-ia pensar que, devido à imunossupressão gerada pelo VIH, fosse menos grave a destruição hepática e que a terapêutica antiretroviral altamente activa (HAART) ao fazer a reconstituição do sistema imunitário deveria aumentar a doença hepática, um cenário não observado na prática clínica (Singal e Anand, 2009).

1.4 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo VHC

O diagnóstico da hepatite C pode ser feito na sequência de manifestações clínicas mas, na maioria das vezes, é feito de forma fortuita através de resultados laboratoriais alterados indicativos de doença hepática (*e.g.* nível elevados de ALT) ou no contexto de programas de rastreio.

O diagnóstico laboratorial da infecção baseia-se em dois tipos de testes, os testes serológicos para a determinação de anticorpos anti-VHC e os testes de biologia molecular para detecção do genoma viral (Poynard *et al.*, 2003). Os testes serológicos actualmente utilizados consistem em ensaios imunoenzimáticos que usam antigénios recombinantes da proteína C, NS3, NS4 e NS5 (Lemon *et al.*, 2007; Chevaliez e Pawlotsky, 2006). Estes ensaios de terceira geração detectam com elevada sensibilidade e especificidade a presença de anticorpos anti-VHC em amostras de soro ou plasma colhidas 4-10 semanas após a infecção. Estes ensaios apresentam como principal limitação o facto de não permitirem distinguir entre infecções activas (agudas ou crónicas) e infecções resolvidas.

A confirmação da infecção activa faz-se através da detecção de RNA viral. Estes testes podem ser qualitativos ou quantitativos (testes de carga viral). Os testes

qualitativos usados no diagnóstico e avaliação da resposta à terapia baseiam-se em técnicas de amplificação, *e.g.* PCR, PCR em tempo real ou *Transcription Mediated Assay* (TMA), precedidas de um passo de transcrição reversa (RT) (revisto em Chevaliez e Pawlotsky, 2006). A região de amplificação é invariavelmente a 5'UTR pelo seu elevado grau de conservação (Murphy *et al.*, 2007; Cantaloube *et al.*, 2006). Estes testes permitem detectar infecção activa na ausência de anticorpos, como é o caso de indivíduos no período de janela serológica ou de indivíduos severamente imunocomprometidos (*e.g.* co-infectados com VIH). A presença de RNA viral na ausência de anticorpos anti-VHC é fortemente indicativa de infecção aguda, a qual poderá ser confirmada posteriormente por seroconversão. No entanto, os indivíduos com infecção aguda podem também apresentar anticorpos quando do diagnóstico, o que dificulta a distinção da forma crónica sem outros dados clínicos. A ausência de RNA viral na presença de anticorpos é fortemente indicativa de uma infecção resolvida.

Os testes quantitativos permitem determinar a carga viral através da amplificação de sequências alvo (PCR competitivo e PCR em tempo real) ou da amplificação de sinal (“*branched DNA*”). Estes testes são usados na previsão da resposta ao tratamento e relapso. Os doentes com cargas virais mais elevadas possuem maiores taxas de relapso e, consequentemente, deverão fazer um tratamento mais prolongado (Poynard *et al.*, 2003)

1.5 Terapêutica da hepatite C

O tratamento padrão estabelecido para a hepatite C consiste, actualmente, na administração combinada do interferão alfa (IFN- α) “peguilado” e da ribavirina (RBV) (Myrmel *et al.*, 2009; Guillou-Guillemette *et al.*, 2007). O sucesso terapêutico deste regime, definido pela ausência de RNA do VHC seis meses após terminado o tratamento (resposta virológica sustentada, RVS), varia entre 42% e 80% (Myrmel *et al.*, 2009), sendo em grande parte determinado pelo genótipo viral. Assim, enquanto nos doentes infectados com os genótipos 2 e 3 se observa uma taxa de RVS elevada (~84%) após 24 semanas de tratamento, para os infectados com o genótipo 1 a taxa de RVS é baixa (~42%) mesmo após 48 semanas de tratamento (Farnik *et al.*, 2009; Hadziyannis, 2004; Fried, 2002; Manns *et al.*, 2001). Os estudos realizados para o genótipo 4 indicam uma taxa de RVS intermédia (43-70%) após 36-48 semanas, sendo superior nos egípcios relativamente aos europeus e africanos (Antaki *et al.*, 2009). Para o genótipo 5 é atingida RVS em >60% dos doentes após 48 semanas de terapia, enquanto para o genótipo 6 se observa RVS em 60-85% dos casos (Antaki *et al.*, 2009).

Nos indivíduos infectados com VIH, o tratamento da hepatite C torna-se prioritário devido à progressão acelerada da doença hepática, sendo a terapia usada semelhante à dos indivíduos mono-infectados e tendo a duração de 48 semanas (Thomas, 2008). Porém, nos indivíduos co-infectados a taxa de RVS baixa fortemente, variando entre 14 e 38% para o genótipo 1 sendo de apenas 60% para os genótipos 2 e 3 (revisado em Thomas, 2008). Alguns estudos realizados para o genótipo 4 descrevem taxas de RVS de 23-30% (Martín-Carbonero *et al.*, 2008; Legrand-Abravanel *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2005).

Os indivíduos co-infectados com VIH/VHC podem apresentar ainda problemas relacionados com a terapia da hepatite C, designadamente a anemia associada à ribavirina, que pode ser exacerbada pelo uso simultâneo de AZT, e a toxicidade causada pelos níveis aumentados de ddI também provocados pela ribavirina e que pode ser fatal (Thomas, 2008; Singal e Anand, 2009). A variabilidade da resposta à terapia actualmente utilizada, assim como a baixa taxa de RVS registada para os genótipos mais prevalentes, assim como para os co-infectados com VIH, tem potenciado o desenvolvimento de novos fármacos baseados em inibidores de alvos virais específicos (*e.g.* protease e RdRp), alguns dos quais estão na fase de ensaios clínicos (revisado em de Bruijne *et al.*, 2009).

1.6 Diversidade genética do VHC

1.6.1 Genótipos, subtipos e *quasispecies*

O VHC apresenta um elevado grau de diversidade genética resultante de pressões selectivas, associadas quer a eventos históricos subjacentes à sua adaptação ao hospedeiro humano quer à infecção de novo de cada indivíduo e subsequente exposição à resposta imune. Ainda, a acumulação de alterações genéticas como resultado de deriva genética “neutra”, em oposição às alterações selectivas, também deverá contribuir para a diversidade de sequências nucleotídicas observada no VHC (Simmonds, 2004).

A variabilidade genética do VHC observa-se em diferentes níveis. A comparação de sequências nucleotídicas de vírus oriundos de indivíduos de diferentes grupos de risco para a infecção e de diferentes regiões geográficas revelou a existência de pelo menos seis grupos genéticos principais, designados genótipos 1 a 6 (Simmonds *et al.*, 2005). Na sua totalidade, as sequências genómicas dos seis genótipos diferem em 30-35%, mas apresentam maior variabilidade concentrada nas regiões codificadoras das glicoproteínas

E1 e E2, enquanto as sequências do *core* e de algumas proteínas não estruturais, *e.g.* NS3, são mais conservadas. A sequência com menor variabilidade entre genótipos é a encontrada na 5'UTR, onde sequências específicas e estruturas secundárias do RNA são responsáveis pelas funções de tradução e replicação do genoma viral. Com exceção do genótipo 5, cada genótipo do VHC possui uma série de subtipos relacionados mas geneticamente distintos, cujas sequências nucleotídicas diferem em 20-25% (Kuiken *et al.*, 2008). Estão descritos cerca de 90 subtipos do VHC (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>) designados por letras minúsculas em associação com o algarismo do respectivo genótipo (*e.g.* 1a, 2c) (Simmonds *et al.*, 2005). Ao nível do indivíduo infectado, em cada momento, é possível ainda encontrar um conjunto de variantes virais (*quasispecies*) com sequências nucleotídicas distintas mas estreitamente relacionadas.

A diversidade genética do VHC, sob a qual são exercidas diversas pressões selectivas, é gerada continuamente quando da síntese do RNA genómico viral pela ausência de actividade de *proofreading* da RNA polimerase viral. Uma taxa de erro de 1:10000 a 1:100000 nucleótidos copiados estimada para as polimerases dos vírus de RNA (Domingo *et al.*, 1996; Drake *et al.*, 1998), combinada com uma taxa de replicação de aproximadamente 10^{12} viriões por dia (Neumann *et al.*, 1998), pode originar uma população de variantes virais que diferem umas das outras em pelo menos uma posição nucleotídica e em que todas as combinações de nucleótidos são possíveis. Outra fonte de diversidade genética dos vírus é a recombinação. Nos vírus de RNA de polaridade positiva esta ocorre durante a replicação do RNA genómico, por um processo de mudança da molécula matriz, quando da co-infecção com duas variantes virais. Relativamente ao VHC, apesar da sobreposição geográfica de diferentes genótipos e subtipos e de alguns grupos de risco, nomeadamente os UDIs, serem repetidamente expostos e infectados por estirpes diferentes, a recombinação parece ser pouco frequente. Até agora foram descritas as formas recombinantes naturais intergenótipos RF_2k1b (Kalinina *et al.*, 2002), RF_2b1b (Kageyama *et al.*, 2006), RF_2k5a (Legrand-Abravanel *et al.*, 2007), RF_2i6p (Noppornpanth *et al.*, 2006

infecção persistente são partilhadas pelos diferentes genótipos do VHC. Até agora apenas a diferença de susceptibilidade ao tratamento com interferão (monoterapia ou combinado com ribavirina) foi consistentemente observada (secção 1.5). Tipicamente, apenas 10-20% e 40-50% dos indivíduos cronicamente infectados com o genótipo 1, respectivamente em monoterapia e terapia combinada, apresentam resposta virológica sustentada, sendo estes valores mais elevados nas infecções com os genótipos 2 e 3 (50% e 70-80%, respectivamente) (revisto em Pawlotsky, 2003). Esta diferença sendo importante em termos de gestão e monitorização da terapia faz com que seja recomendada a genotipagem viral antes do seu início.

1.6.2 Determinação do genótipo/subtipo

Dada a importância da determinação do genótipo do VHC na prática clínica, foram desenvolvidos vários testes comerciais de genotipagem baseados em técnicas serológicas ou em técnicas de amplificação e hibridação de ácidos nucleicos. O genótipo do VHC pode ser determinado pela pesquisa de anticorpos dirigidos contra epítomos específicos de genótipo usando ensaios imunenzimáticos competitivos. Este tipo de testes origina resultados interpretáveis em 90% dos infectados imunocompetentes, sendo de difícil interpretação quando de infecções mistas ou infecções sucessivas com diferentes genótipos. Por outro lado não se aplicam a indivíduos imunocomprometidos (Pawlotsky *et al.*, 1997).

Os testes comerciais de genotipagem baseiam-se essencialmente na amplificação por RT-PCR da 5'UTR, seguido da hibridação com sondas específicas para diferentes genótipos e subtipos ou da análise directa da sequência amplificada. O facto da 5'UTR ser altamente conservada, permitindo desenhar *primers* capazes de amplificar virtualmente todos os genótipos descritos, tem a desvantagem de ocasionalmente classificar erradamente o genótipo 6 como genótipo 1 devido à identificação da 5'UTR 1a e 1b com a do genótipo 6. A adição de *primers* e sondas para a região do *core* a alguns destes kits comerciais permitiu ultrapassar esta questão (Bouchardeau *et al.*, 2007).

A genotipagem do VHC é ainda particularmente importante nos estudos de epidemiologia ou no despiste de uma fonte de infecção/contaminação. Neste caso a determinação precisa do subtipo, não conseguida com os testes comerciais, é essencial e é feita com base em ensaios *in house* para amplificação das regiões NS5B ou E1, seguido de sequenciação directa dos produtos obtidos, alinhamento com sequências de referência

de diferentes subtipos disponíveis nas bases de dados e análise filogenética (Murphy *et al.*, 2007; Hrabec *et al.*, 2006; Corbet *et al.*, 2003, Sandres-Sauné *et al.*, 2003).

1.6.3 Epidemiologia de genótipos e subtipos

Os genótipos e subtipos do VHC apresentam padrões epidemiológicos diversos, podendo apresentar distribuições geográficas específicas e associação a grupos de risco para a transmissão particulares.

Alguns subtipos, *e.g.* 1a, 1b e 3a, apresentam uma ampla distribuição mundial como resultado da transmissão através de transfusões sanguíneas (1b) e partilha de agulhas entre UDIs (1a e 3a) nos últimos 40-70 anos (Magiorinis *et al.*, 2009; Simmonds, 2004) e representam actualmente a grande maioria das infecções nos países ocidentais. Nalgumas partes de África e no Sudeste Asiático observa-se um padrão de diversidade de subtipos muito diferente, com associações estreitas entre genótipos e regiões geográficas restritas. Na África Ocidental as infecções são causadas essencialmente pelo genótipo 2 e caracterizam-se por uma larga variedade de subtipos deste genótipo (Candotti *et al.*, 2003; Jeannel *et al.*, 1998), enquanto na África Central predominam os genótipos 1 e 4, também com uma pluralidade de subtipos cada (Ndjomou *et al.*, 2003; Mellor *et al.*, 1995). Um padrão semelhante é observado para os genótipos 3 e 6 no Sudeste Asiático (Simmond, 2004, 2001). As regiões com este padrão epidemiológico para os diferentes genótipos são consideradas como potenciais locais de origem dos mesmos e fonte das estirpes virais pandémicas (Simmond, 2004). O genótipo 4 é ainda a causa mais frequente de hepatite C no Médio Oriente e Norte de África e, recentemente, tem-se disseminado no Sul da Europa, particularmente os subtipos 4a e 4d, entre UDIs e imigrantes (Esteban *et al.*, 2008; Kamal e Nasser, 2008; Nguyen e Keeffe, 2005). Ao contrário dos outros genótipos do VHC, a fonte endémica do genótipo 5 com um único subtipo descrito é desconhecida. O genótipo 5a é responsável por 40% das infecções na África do Sul e surge esporadicamente noutros pontos do mundo (Antaki *et al.*, 2009; Verbeeck *et al.*, 2006). A análise de estirpes belgas e sul-africanas demonstrou que o vírus circula há mais de 100 anos nestas duas populações, devendo ter sido introduzido a partir de uma região endémica desconhecida (Verbeeck *et al.*, 2006).

Relativamente a Portugal, existem poucos dados publicados sobre a prevalência dos genótipos do VHC e baseiam-se todos em testes de genotipagem comerciais, facto que se reflecte na ausência de sequências de estirpes portuguesas nas bases de sequências

internacionais. Um estudo multicêntrico português (n=567), apresentado no XXXI Congresso Anual da Fundação Espanhola para o Estudo do Fígado em 2006, refere a transmissão nos UDIs como responsável por 58,7% das infecções e descreve o genótipo 1 como sendo o mais frequente, 52,2%, seguido do genótipo 3 responsável por 34% dos indivíduos infectados (referido em Vieira *et al.*, 2007). Ainda, um estudo retrospectivo (1995-2004, n=408) realizado por Vieira e colaboradores num Hospital Distrital apresenta uma distribuição de genótipos semelhante (60%, 30% e 8%, respectivamente para os genótipos 1, 3 e 4) e refere a associação entre o subtipo 3a e uma história epidemiológica de UDIs (Vieira *et al.*, 2007).

1.7 Objectivos do estudo

A investigação dos diferentes genótipos e subtipos do VHC circulantes e a sua evolução é crucial não só para a análise epidemiológica e clínica como também contribui para melhorar os testes de diagnóstico e regimes terapêuticos. Considerando que:

- 1) em Portugal os dados relativos à epidemiologia da infecção por VHC são muito limitados,
- 2) a genotipagem dos vírus circulantes baseia-se em testes de hibridação, havendo até agora apenas 5 sequências de isolados portugueses depositados nas bases de dados internacionais,
- 3) em Portugal, à semelhança dos outros países ocidentais, os UDIs constituem o principal grupo de risco para a infecção por VHC e
- 4) a co-infecção com VIH tem um efeito dramático na progressão da doença hepática e na resposta à terapia do VHC, nomeadamente para alguns genótipos, procedeu-se a um estudo retrospectivo (1998-2001) de caracterização genética das estirpes do VHC circulantes num grupo de indivíduos residentes na área metropolitana de Lisboa, seropositivos para VIH e tendo como principal risco de infecção a utilização de drogas injectáveis.

Os principais objectivos deste trabalho foram:

- i. Estimar a seroprevalência do VHC através da detecção de anticorpos (teste rápido imunoenzimático);
- ii. Estimar a prevalência de infecção activa através da detecção de RNA genómico viral (amplificação por RT-PCR da 5'UTR);
- iii. Determinar a distribuição dos diferentes genótipos e subtipos tendo como alvo duas regiões diferentes do genoma viral (amplificação por RT-PCR das regiões codificadoras de C/E1 e NS5B, seguido de sequenciação e análise filogenética);
- iv. Identificar a presença de potenciais vírus recombinantes;
- v. Analisar as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC portuguesas e as de outras regiões geográficas no sentido de tentar identificar a origem das primeiras;
- vi. Calcular a distância genética dos diferentes subtipos para inferir sobre o seu tempo de circulação relativo;
- vii. Estabelecer possíveis associações entre algumas características demográficas e os resultados obtidos de serologia, genotipagem e subtipagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 População estudada

Este estudo incidiu sobre um total de 66 amostras de plasma de indivíduos utilizadores de drogas injectáveis seropositivos para o VIH, colhidas entre 1998 e 2001 no Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca (Amadora/Sintra) e no Centro de Atendimento a Toxicodependentes das Taipas. Da população estudada, 22 doentes eram do sexo feminino (33,3%) e 44 do sexo masculino (66,7%), com idades compreendidas entre os 20 e 49 anos (idade média de 31,2 anos; $\sigma=6,39$). A população estudada possui nacionalidade Portuguesa (81,8%), Africana (16,7%) e Brasileira (1,5%).

As características epidemiológicas referentes às diferentes amostras incluídas no estudo encontram-se em anexo (Anexo I).

2.2 Detecção de anticorpos anti-VHC

A presença de anticorpos anti-VHC nas amostras de plasma mantidas a -80°C foi determinada pelo teste imunocromatográfico rápido “*ImmunoFlowTM HCV rapid test*” (Core Diagnostics, Reino Unido), segundo as indicações do fabricante. As amostras foram consideradas positivas após o aparecimento de banda corada na zona correspondente à retenção de anticorpos anti-VHC, sendo a validação dos resultados efectuada pelo aparecimento de uma banda na zona do controlo.

2.3 Isolamento do RNA viral

A extracção do RNA viral foi realizada com o Kit comercial “*INSTANT VIRUS RNA kit*” (Analytikjena bio solutions, Alemanha) a partir de plasmas. Em primeiro lugar foi efectuada a lise das partículas virais numa sala de bio-segurança de nível 3 (BSL3) através da adição de 150 μl de plasma a 450 μl de solução lise RL. Após a inactivação das partículas virais, os restantes procedimentos foram efectuados num laboratório BSL2 em ambiente tentativamente sem nucleases. O RNA foi purificado por cromatografia em coluna após a adição de 600 μl de solução de ligação RBS. As colunas foram lavadas

sucessivamente com 500 µl de solução de lavagem HS e 650 µl de solução de lavagem LS.

Realizou-se uma primeira eluição do RNA com 30 µl de água sem nucleases (*RNase-free water*), precedida de uma incubação durante 2 min à temperatura ambiente. O material eluído foi distribuído por 3 tubos em quantidades de 5 µl (2X) e 20 µl. Uma segunda eluição permitiu obter mais 30 µl de solução de RNA numa concentração mais diluída que, à semelhança da anterior, foi guardada a -80°C.

2.4 Síntese do cDNA

Usando o Kit “*ImProm-IITM Reverse Transcription System*” (Promega, EUA), foi efectuada a transcrição reversa (RT) do RNA extraído no ponto anterior. Na sala denominada de “limpa” foi preparada uma mistura de reacção com 5,1 µl de água sem nucleases, 4 µl de tampão de reacção *InPromII 5X*, 2,4 µl de $MgCl_2$ 3 mM, 1 µl de dNTPs 0,5 mM, 0,5 µl de inibidor de RNAses *RNasin* (40 U/ µl) e 1 µl de transcriptase reversa por cada amostra. Aos tubos com 5 µl do RNA extraído no passo anterior foi adicionado 1 µl de hexâmeros ao acaso (0,5 µg/µl). Para o controlo negativo da reacção, o RNA foi substituído por água. O controlo negativo e as amostras foram incubados num banho-maria a 70°C durante 5 min e, de seguida, transferidos rapidamente para um banho de água com gelo onde permaneceram durante 5 min. Posteriormente, adicionou-se 14 µl de mistura de reacção RT por tubo e a síntese do cDNA decorreu num termociclador nas seguintes condições: 25°C, 5 min; 42°C, 60 min; 70°C, 15 min.

Como alternativa, na síntese do cDNA foi usado o Kit “*RevertedAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*” (Fermentas, Lituânia). Para cada RT usou-se 5 µl do RNA extraído em 2.3. A mistura de reacção consistiu em 4 µl de tampão de reacção 5X, 1 µl do inibidor de RNAses *RiboLockTM RNase* (20 U/µl), 2 µl de dNTPS 10 mM e 1 µl da enzima *RevertAidTM H Minus-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µl) para cada amostra. Às amostras de RNA foi adicionado 6 µl de água tratada com DEPC e 1 µl de hexâmeros ao acaso. O controlo negativo consistiu em 11 µl de água tratada com DEPC e 1 µl de hexâmeros ao acaso. De seguida as amostras foram incubadas num banho-maria a 70°C durante 5 min, seguido de um banho de gelo durante 5 min. Posteriormente adicionou-se 8 µl da mistura de reacção RT a cada amostra e a síntese do cDNA foi efectuado nas condições anteriormente descritas.

Para evitar a contaminação na obtenção do RNA viral e do cDNA todas as pipetagens efectuadas em 2.3 e 2.4 foram realizadas usando pontas de micropipeta com filtro.

2.5 Amplificação por PCR das regiões 5'UTR, C/E1 e NS5B do VHC

2.5.1 Desenho e características dos *primers*

Os *primers* usados para amplificação, por PCR, *heminested-PCR* e *nested-PCR*, das regiões 5'UTR, NS5B e C/E1 foram desenhados com base no alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas de estirpes de VHC com genoma completo, disponíveis na base de dados (*Los Alamos sequence database*, <http://www.hcv.lanl.gov>) e seleccionadas aleatoriamente para cada genótipo e subtipo, contra a estirpe de referência H77. Na Tabela 2.1 estão apresentadas as respectivas sequências e posições na estirpe de referência H77.

Tabela 2.1 - *Primers* utilizados na amplificação das três regiões do genoma de VHC e sua localização em relação à sequência de referência H77.

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Localização no genoma (posição nucleotídica na estirpe H77*)
UTR_f	GAA AGC GTC TAG CCA TGG CGT AGT	71 – 95
UTRo_r	TGC TCA TGG TGC ACG GTC TAC GAG A	348 – 324
UTRi_r	CTA TCA GGC AGT ACC ACA AGG	279 – 299
NS5Bi_f	TAT GA(CT) ACC (AC)GC TG(CT) TTT GAC TC	8256 – 8278
NS5Bo_f	TGG GGT T(CT)T C(AGCT)T ATG A(CT)A CC(AC) G(AC)T G	8246 – 8270
NS5B_r	GG(AGCT) GC(AGCT) GA(AG) TAC CTG GTC ATA GC(CT) TCC GTG AA	8616 – 8647
CEo_f	GCA ACA GGG AA(CT) (CT)T(AGT) CC(CT) GGT TGC TC	859 – 834
CEi_f	AA(CT) (CT)T(AGT) CCC GGT TGC TC(CT) TT(CT) CTC TAT	843 - 870
CEo_r	GT(AG) GG(AGCT) GAC C(AG)T TCA TCA TCA	1306 – 1327
CEi_r	TTC ATC ATC AT(AG) TCC CA(AGCT) GCC AT	1315 - 1293

*(nº de acesso NC_004102).

Os *primers* foram preparados como soluções aquosas stock (200 µM) e de trabalho (10µM) e mantidos a -20°C.

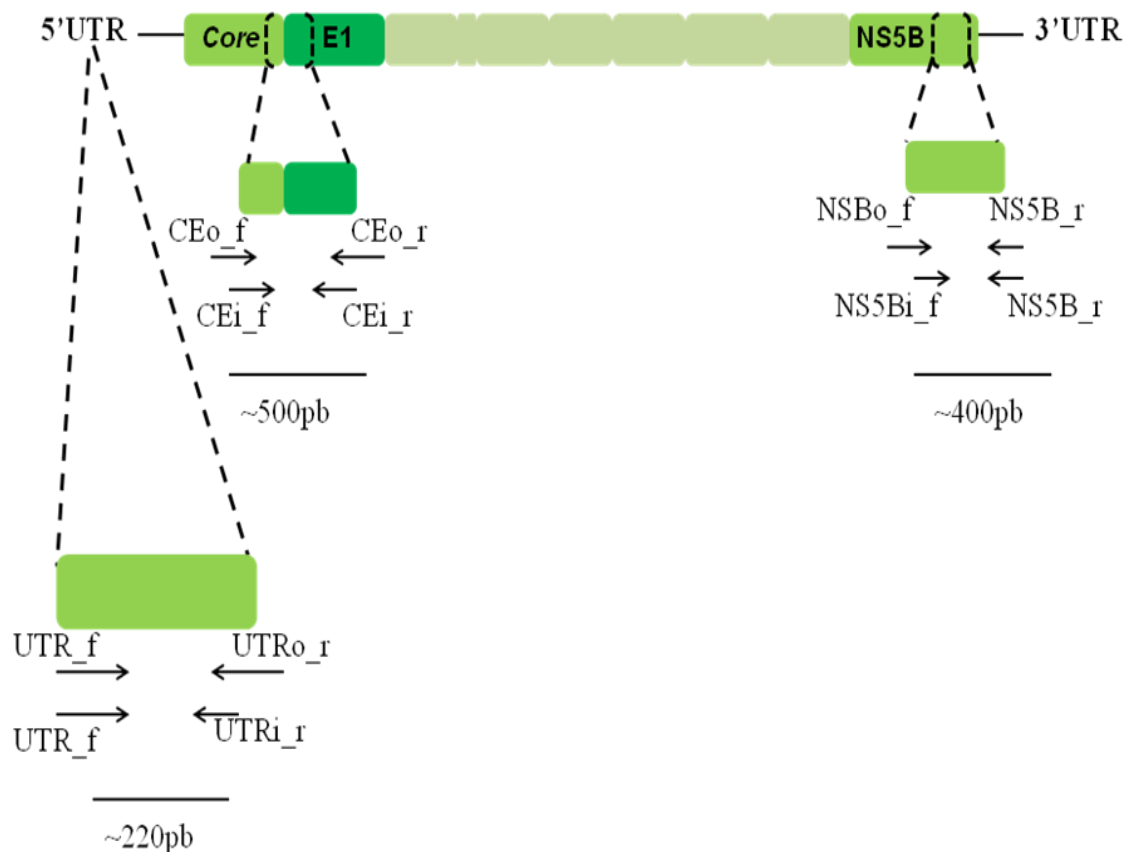


Figura 2.1 – Esquema representativo da estratégia de PCR utilizada na amplificação das diferentes regiões genómicas do VHC estudadas, com indicação do local aproximado de hibridação dos vários *primers* utilizados.

As condições de termociclagem foram estabelecidas tendo em conta as temperaturas de hibridação dos diferentes *primers* e as dimensões dos fragmentos de DNA a amplificar.

Para evitar contaminações das reacções de amplificação, o processamento das amostras, das misturas de reacção e produtos de PCR foi efectuado em compartimentos fisicamente distintos e todas as pipetagens efectuadas com pontas de micropipetas com filtro.

2.5.2 Amplificação da 5'UTR

Para a amplificação da 5'UTR do cDNA usou-se o sistema *illustra™ PuRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido) em que cada esfera liofilizada, quando hidrolizada num volume final de 25 µl, dá origem a uma mistura de reacção que é constituída por dNTPS 200 µM, Tris.HCl 10 mM, pH 9,0, KCl 50 mM e MgCl₂ 1,5 mM. Na amplificação por *heminested* PCR, foram efectuadas duas reacções de PCR (Tabela 2.2), em que o produto da primeira reacção foi usado como matriz para a segunda reacção de PCR. Na primeira reacção, foram usados os *primers* UTR_f e UTRo_r, numa concentração de 0,4 pmole/µl cada, e 5 µl de cDNA. Para a segunda reacção foram usados os *primers* UTR_f e UTRi_r, 0,8 pmole/µl cada, e 1 µl do produto da primeira reacção de amplificação.

Tabela 2.2 - Condições de amplificação da 5'UTR para a primeira reacção (I) e segunda reacção (II) do *heminested* PCR.

	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos	
Desnaturação inicial	94	2 min	1	} I
Desnaturação	94	1 min	35	
Hibridação	60	1 min		
Extensão	72	1 min		
Extensão final	72	5 min	1	
Desnaturação inicial	94	2 min	1	} II
Desnaturação	94	30 seg	35	
Hibridação	60	30 seg		
Extensão	72	1 min		
Extensão final	72	5 min	1	

2.5.3 Amplificação das regiões C/E1 e NS5B

Para a amplificação destas regiões também foi usado o sistema *illustra™ PuRe Taq™ Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Reino Unido) descrito em 2.5.2. Na reacção de PCR (Tabela 2.3) para C/E1 foram usados os *primers* CEo_f e CEi_r. Na amplificação por *heminested* PCR (Tabela 2.4), foram usados os *primers* CEo_f e CEo_r na primeira reacção e os *primers* CEo_f e CEi_r na segunda reacção. Em alternativa, a

segunda reacção de PCR foi efectuada com os *primers* CEi_f e CEi_r (Tabela 2.4). As condições descritas na Tabela 2.4 foram usadas nas amostras que amplificaram a sequência 5'UTR com uma única reacção de PCR, as condições da Tabela 2.5 foram usadas nas amostras que apresentaram amplificação da 5'UTR apenas com duas reacções de PCR. As condições de amplificação para a sequência C/E1 descritas na Tabela 2.5 foram usadas para 2 amostras (R49 e R50) que não amplificaram com as condições descritas nas Tabela 2.4.

Para as reacções de PCR, *heminested* PCR e *nested* PCR usou-se 0,8 pmole/ μ l de cada *primer*. Na primeira reacção de amplificação foram usados 2 μ l de cDNA e na segunda reacção usados 2 μ l do produto da primeira reacção.

Tabela 2.3 - Condições de amplificação por PCR de C/E1 com os *primers* CEo_f e CEi_r.

	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 seg	} 35
Hibridação	60	30 seg	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	1

Tabela 2.4 - Condições de amplificação de C/E1 da primeira reacção (*primers* CEo_f e CEo_r) e segunda reacção (*primers* CEo_f e CEi_r ou CEi_f e CEi_r).

	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 seg	} 35
Hibridação	50	30 seg	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	1

Tabela 2.5 - Condições de amplificação por *heminested* PCR de C /E1 (*primers* CEo_f e CEo_r e CEo_f e CEi_r, respectivamente na primeira e segunda reacções).

	Temperatura (°C)	Tempo de duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 seg	}
Hibridação	55	30 seg	
Extensão	72	1 min	
Desnaturação	94	30 seg	}
Hibridação	60	30 seg	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	1

Para a região NS5B foi efectuada uma reacção de PCR com os *primers* NS5Bi_f e NS5B_r ou um *heminested* PCR com os pares de *primers* NS5Bo_f e NS5B_r e NS5Bi_f e NS5B_r, respectivamente na primeira e segunda reacções (Tabela 2.6). No PCR e *heminested* PCR foram utilizados 1,2 pmole/ μ l de cada *primer*. Na primeira reacção de amplificação usou-se 2 μ l de cDNA e na segunda reacção usou-se 2 μ l do produto da primeira reacção.

Tabela 2.6 – Condições de amplificação de NS5B por PCR (*primers* NS5Bi_f e NS5B_r) e *heminested* PCR (*primers* NS5Bo_f e NS5B_r seguidos de NS5Bi_f e NS5B_r).

	Temperatura (°C)	Tempo de duração	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94	2 min	1
Desnaturação	94	30 seg	}
Hibridação	55	45 seg	
Extensão	72	1 min	
Desnaturação	94	30 seg	}
Hibridação	60	30 seg	
Extensão	72	1 min	
Extensão final	72	10 min	1

2.5.4 Análise dos produtos de PCR

Os produtos amplificados foram analisados em gel de 1,5% de agarose em tampão TAE 0,5 x (2,42 g Tris.base, 0,57 ml de ácido acético glacial, 1 ml de EDTA 0,5M, pH8,0 e 1000 ml de água) e com 0,5 µg/µl de brometo de etídio para a sua visualização. De forma a verificar se o tamanho do produto amplificado correspondia ao esperado, no mesmo gel correu, em simultâneo, um marcador de tamanhos moleculares (*GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas, Lituânia). A visualização foi efectuada pela leitura com luz ultra-violeta no aparelho *Gel Doc XR System* (BioRad, EUA).

2.6 Purificação e sequenciação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados, para posterior sequenciação, com o Kit “*QIAquick PCR® Purification Kit*” (Qiagen, Alemanha) segundo as indicações do fabricante. A eluição final do DNA foi feita num volume final de 30 µl de água. A quantidade de DNA obtida foi analisada por electroforese em gel de agarose como atrás descrito e comparou-se a intensidade das bandas dos produtos purificados e do marcador de tamanhos moleculares (*GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus*, Fermentas, Lituânia).

Após purificação, os produtos de PCR foram directamente sequenciados (STAB VIDA, Oeiras, Portugal) no sequenciador automático *ABI 3730XL*, (Applied Biosystems) com o kit *BigDye® terminator V1.1* (Applied Biosystems, EUA). Na sequenciação foram usados os *primers* NS5Bi_f, CEo_f e CEi_f, e UTR_f, respectivamente para as regiões NS5B, C/E1, 5’UTR.

2.7 Análise Bio-informática

Os cromatogramas obtidos durante a sequenciação foram cuidadosamente analisados para verificação da concordância entre o cromatograma e a sequência de bases atribuídas e da existência ou não de picos sobrepostos. Procedeu-se também ao corte das sequências correspondentes aos *primers* (~40 bases iniciais). A correcção manual da sequência nucleotídica, foi feita com o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.0.9 (Hall, 1999). Posteriormente foi realizada a tradução em aminoácidos usando o programa *GENE Runner*, versão 3.05 (<http://www.generunner.net>) para verificar a concordância entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos e detectar a existência ou não de erros na sequência obtida e a correcção desses mesmos erros com o *BLASTx*.

Após a edição das sequências, com o objectivo de confirmar a sua identidade, foi realizada uma pesquisa de homologia genética recorrendo ao programa *HCV BLAST* da base de dados *HCV sequence database Blast search* (http://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html).

As sequências nucleotídicas obtidas ao longo do trabalho foram alinhadas entre si e com sequências de referência através do programa *MAFFT* versão 6, disponível em <http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/software/>, usando os parâmetros de alinhamento pré-definidos. Os alinhamentos foram editados e corrigidos manualmente no programa *BioEdit*. Os estudos filogenéticos foram efectuados com o programa *MEGA* versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de matrizes de distâncias genéticas calculadas com base no algoritmo de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética sugerida foi avaliada através do método de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985), com base em 1000 réplicas. Foram considerados estatisticamente significativos, os agrupamentos que apresentavam valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 75%. As sequências de referência dos diferentes genótipos e subtipos do VHC utilizadas na análise filogenética foram retiradas da base de dados *online Hepatitis C virus database* (<http://www.hcvdb.org>) com os seguintes números de acesso: Genótipo 1 - EU362878, M62321, AF511950, AF011753, D10749, AJ000009, AJ132996, AF176573, M84754, U16362, AY587016, AF313916, AY051292, AM910652; Genótipo 2 - AF169002, D00944, NC_009823, AY746460, AB047639, AF169003, AF238485, AB030907, DQ430815, D50409, DQ155561, AB031663; Genótipo 3 - DQ437509, DQ430819, X76918, D28917, AF046866, NC_009824, AY956467, D49374, D63821; Genótipo 4 - DQ988074, DQ418782, DQ516084, DQ988078, DQ988079, DQ418784, DQ988075, DQ988076, NC_009825, DQ418788, DQ418783, DQ418785, DQ516083, DQ418786, EU392172, EF589160, EU392171, AJ291268, AJ291245, AJ291292, AJ291258, FJ025854, FJ025855; Genótipo 5 - NC_009826, EF026073; Genótipo 6 - AY859526, DQ480514; EU246931, EU246932; NC_009827; D84264; AY878652; Genótipo 7 - EF108306; GB-VB - AJ277947.

As sequências obtidas ao longo deste trabalho foram depositadas na base de dados do *GenBank* com os seguintes números de acesso: 5'UTR, FN398085 e FN398087; C/E1, FN401016 a FN401069; e NS5B, FN401072 e FN401141 a FN401196.

2.8 Análise estatística

A análise efectuada às variáveis de estatuto serológico e subtipos do VHC foi uma análise de distribuição. Para a idade fez-se o cálculo da média e desvio padrão e o grau de associação entre algumas variáveis consideradas foi estudado recorrendo ao teste de χ^2 , aplicado à análise das tabelas de contingência (com correcção de Yates). Os valores de frequência esperados foram inferiores a 5 recorrendo-se ao teste exacto de Fisher bilateral. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando as ferramentas disponíveis em <http://www.physics.csbsju.edu/stats/>, sendo considerado um nível de significância de 0,05.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Prevalência de anticorpos anti-VHC

Das 66 amostras de plasma usadas no estudo, 57 (86,4%) revelaram a presença de anticorpos anti-VHC, quando avaliadas através de um teste rápido imunocromatográfico.

Para as 66 amostras foi analisada a associação entre as características demográficas conhecidas (idade, sexo, origem geográfica) e o facto de terem serologia positiva ou negativa. A análise efectuada com o teste do χ^2 , revelou valores de $P > 0,05$ para todas as variáveis. Assim, não se observou qualquer influência das características demográficas no estatuto serológico anti-VHC.

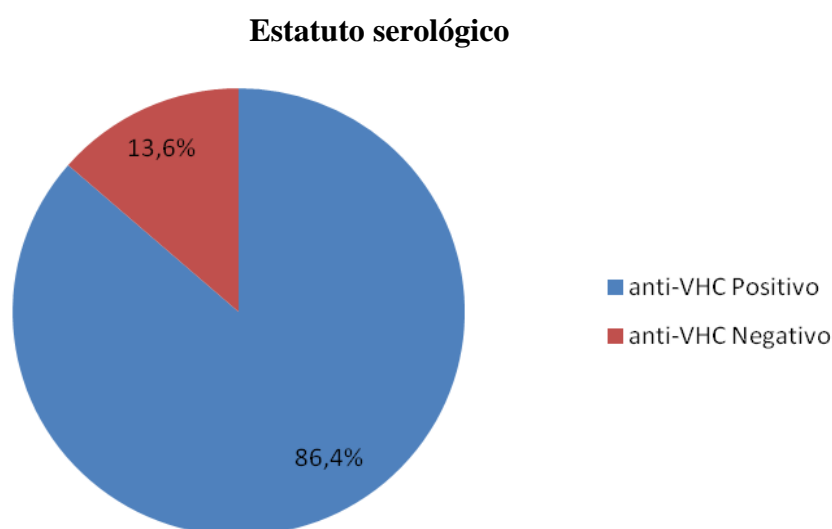


Figura 3.1- Representação gráfica da percentagem de indivíduos com serologia positiva e negativa para os anticorpos anti-VHC na população estudada (n=66).

3.2 Prevalência da infecção activa

Uma vez que os testes serológicos não permitem distinguir entre infecção resolvida e infecção activa, procedeu-se à amplificação por RT-PCR da região 5'UTR do VHC para detectar a presença de RNA genómico viral. Por outro lado, como a população estudada está co-infectada com o VIH, a não detecção de anticorpos contra VHC pode ocorrer na presença de infecção activa, optámos por testar a presença de RNA viral na totalidade das amostras (n=66).

A maioria das amostras analisadas (n=48) deu origem a amplicões após a primeira reacção de PCR (Figura 3.2), não sendo necessário efectuar a segunda reacção de amplificação, sendo estas amostras consideradas positivas. Para as restantes amostras, foi necessário efectuar a segunda reacção de PCR. Das restantes 18 amostras cujo cDNA foi submetido a *heminested* PCR, 9 evidenciaram amplificação. Assim, um total de 57 (86,4%) amostras apresentou infecção activa. Curiosamente, 4 (44,4%) das 9 amostras com serologia negativa apresentaram infecção activa, enquanto 53 (93,0%) das 57 amostras com serologia positiva apresentaram infecção activa.

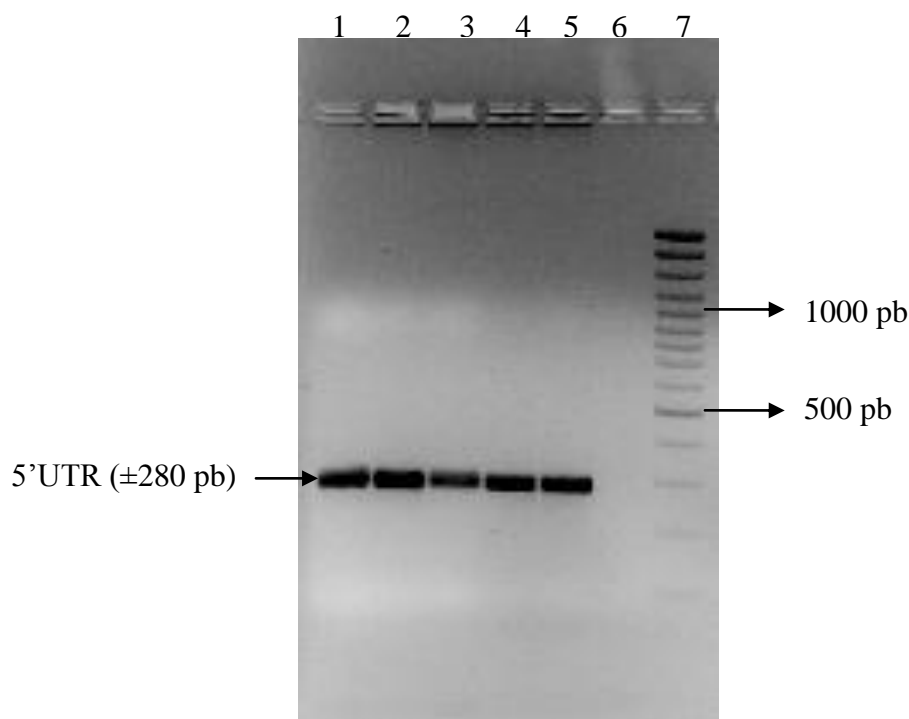


Figura 3.2 - Produtos de amplificação por PCR da região 5'UTR, após electroforese em gel de 1,5% de agarose. Identificação das pistas: 1 a 5- amostras; 6- controlo negativo; 7- marcador de tamanhos moleculares *GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus* (Fermentas).

3.3 Amplificação das regiões C/E1 e NS5B por RT-PCR

Com o objectivo de subtipar e avaliar as relações filogenéticas das amostras de VHC estudadas, entre si e com outras estirpes de referência do VHC, procedeu-se à amplificação das regiões C/E1 e NS5B para todas as amostras que apresentaram amplificação da região 5'UTR (n=57).

A maioria das amostras (n=51, 89,5%), à semelhança do observado para a 5'UTR, apresentou amplificação da região C/E1 com a realização de uma única reacção de PCR. Nas condições descritas na Tabela 2.3 (Figura 3.3), 49 amostras deram origem a amplicões, enquanto duas outras requereram a redução da temperatura de hibridação para 50°C.

As restantes amostras (n=6) foram submetidas a *heminested* PCR (Tabela 2.4) tendo duas apresentado amplificação da região C/E1. As outras 4 amostras foram submetidas a *nested* PCR de acordo com a Tabela 2.4, tendo uma apresentado amplificação da região alvo. As restantes amostras foram ainda submetidas a um novo *heminested* PCR nas condições descritas na Tabela 2.5. Uma amostra apresentou amplificação após subida da temperatura de hibridação para 65°C.

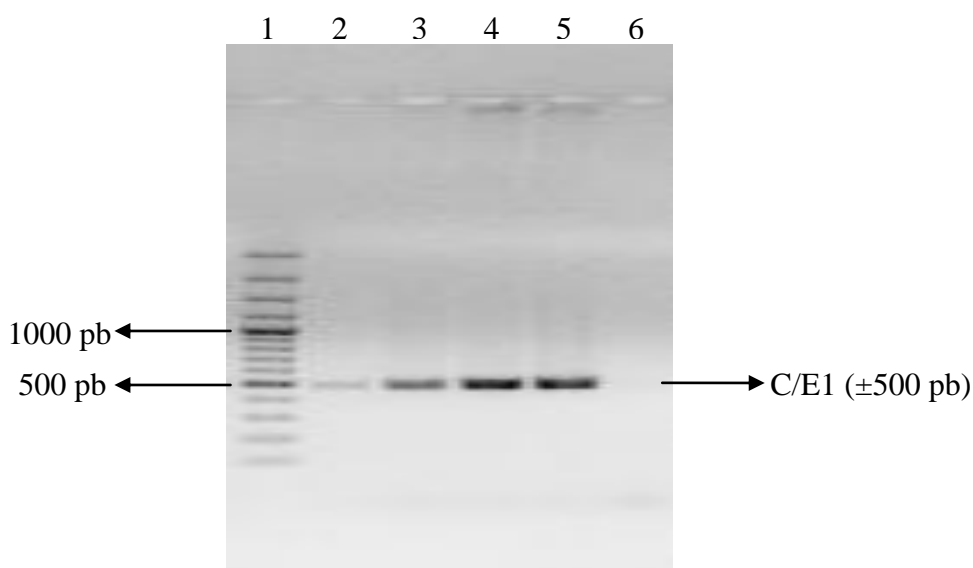


Figura 3.3 - Produtos de amplificação por PCR da região C/E1, após electroforese em gel de 1,5% de agarose. Identificação das pistas: 1- marcador de tamanho molecular *GeneRuler*TM 100bp *DNA Ladder Plus* (Fermentas); 2 a 5- amostras; 6- controlo negativo.

Para a região NS5B, 51 das 57 amostras (89,5%) apresentaram amplificação após a realização de uma única reacção de PCR com os *primers* NS5Bi_f e NS5B_r (Figura 3.4). Exceptuando uma amostra, que requereu redução da temperatura de hibridação para 50°C, todas as amostras geraram amplicões com as condições da Tabela 2.6. As restantes

amostras (n=6) foram submetidas a *heminested* PCR (Tabela 2.6). As seis amostras apresentaram amplificação da região NS5B.

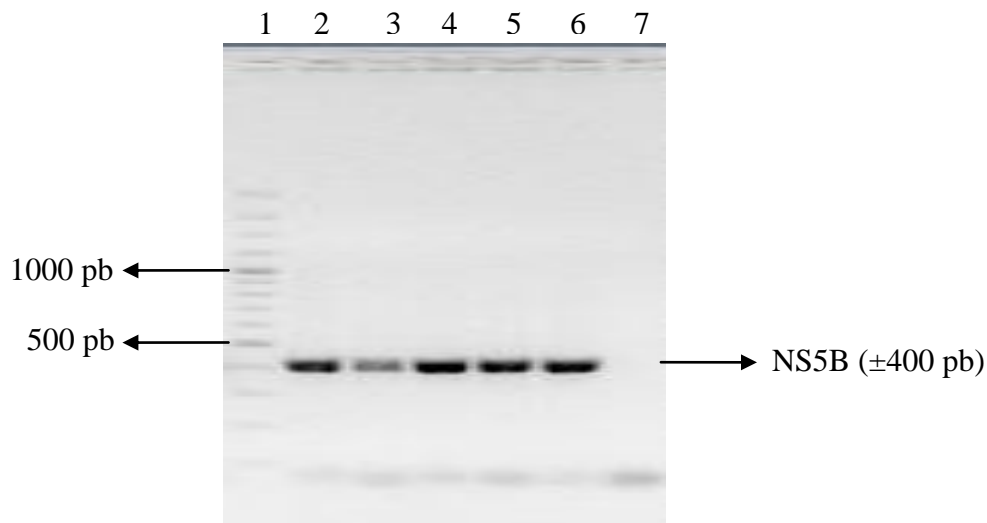


Figura 3.4 - Produtos de amplificação por PCR da região NS5B, após electroforese em gel de 1,5% de agarose. Identificação das pistas: 1- marcador de tamanho molecular *GeneRuler*TM 100bp *DNA Ladder Plus* (Fermentas); 2 a 6- amostras; 7- controlo negativo.

No conjunto, para 57 amostras com infecção activa, *i.e.* que apresentaram amplificação da região 5'UTR, foram obtidos com sucesso amplicões para a região NS5B enquanto para a região C/E1 apenas 55 amostras apresentaram amplificação. Para as amostras R47 e R50 que não apresentaram amplificação de C/E1 foi usada a região 5'UTR para a análise filogenética, uma vez que corresponde ao mesmo extremo do genoma.

Após realização da pesquisa de homologias por *BLAST* encontrou-se que para as amostras R49 e R50 havia discordância a nível dos subtipos (R49) e mesmo dos genótipos (R50) para as duas regiões sequenciadas, C/E1 (4d) e NS5B (4a) e 5'UTR (2a) e NS5B (4a), respectivamente. Assim, procedeu-se a nova extracção e amplificação de RNA de cada amostra isoladamente para eliminar o risco de contaminação. Quando da repetição confirmou-se o resultado da primeira análise de *BLAST* para a amostra R49. No entanto, para a amostra R50, apesar de continuar a mostrar discordância, o subtipo de NS5B sugerido passou a ser 1a e não 4a como inicialmente observado. Uma vez que se dispunha de plasma de uma segunda colheita (R62) deste indivíduo, efectuou-se nova

extracção e amplificação de RNA tendo-se confirmado o subtipo 1a para NS5B. No total, prosseguimos com a análise filogenética de 59 sequências de NS5B (57 inicialmente obtidas, uma da repetição de R50 e outra da amplificação de R62), 55 sequências C/E1 e 2 sequências 5'UTR.

3.4 Análise Filogenética

As sequências de nucleótidos obtidas a partir dos fragmentos da região 5'UTR, C/E1 e NS5B das amostras em estudo foram alinhadas entre si e com correspondentes sequências de referência do VHC, obtidas da base de dados *online Hepatitis C virus database* <http://www.hcvdb.org>, cujos números de acesso se encontram descritas em 2.7.1. Como *outgroup* usaram-se as sequências de referência correspondentes a C/E1 e NS5B do subtipo 7a do VHC e a 5'UTR do vírus GBV-B.

A partir dos alinhamentos múltiplos editados, correspondentes a 390 nucleótidos para a região C/E1, 296 nucleótidos para a região NS5B e 127 nucleótidos para a região 5'UTR, construíram-se as árvores filogenéticas de *Neighbor-Joining*. A robustez da inferência filogenética foi avaliada por *bootstrapping* de 1000 réplicas, tendo permitido estabelecer relações entre as estirpes analisadas e as estirpes de referência de vários subtipos do VHC.

Para identificar os genótipos dos vírus analisados, numa primeira fase construíram-se árvores filogenéticas separadas para as regiões C/E1 e NS5B, em que foram incluídas as sequências de todos os vírus do estudo e um número limitado de sequências de referência, seleccionadas de forma a incluir sequências de todos os genótipos do VHC. Todas as sequências do estudo surgiram agrupadas com sequências dos genótipos 1, 2, 3 ou 4, sendo os agrupamentos suportados por valores de *bootstrap* $\geq 99\%$, tanto para as sequências C/E1 (Figura 3.5) como para as sequências NS5B (Figura 3.6). Os resultados obtidos com a análise destas árvores foram concordantes com os do *BLAST*.

A maioria das sequências C/E1 surge agrupada com sequências do genótipo 1 (27/55), enquanto 15 formam um agrupamento com sequências do genótipo 4, 12 com sequências do genótipo 3 e 1 com sequências do genótipo 2. Relativamente a NS5B, 30 sequências estão agrupadas com sequências de referência do genótipo 1, 16 com sequências do genótipo 4, 12 com genótipo 3 e 1 com sequências do genótipo 2. Para a grande maioria dos vírus para os quais se dispõe de sequências para as 2 regiões

analizadas (54/55), observou-se concordância entre os genótipos determinados, facto que se reflecte na semelhança da topologia das duas árvores (Figura 3.5 e 3.6).

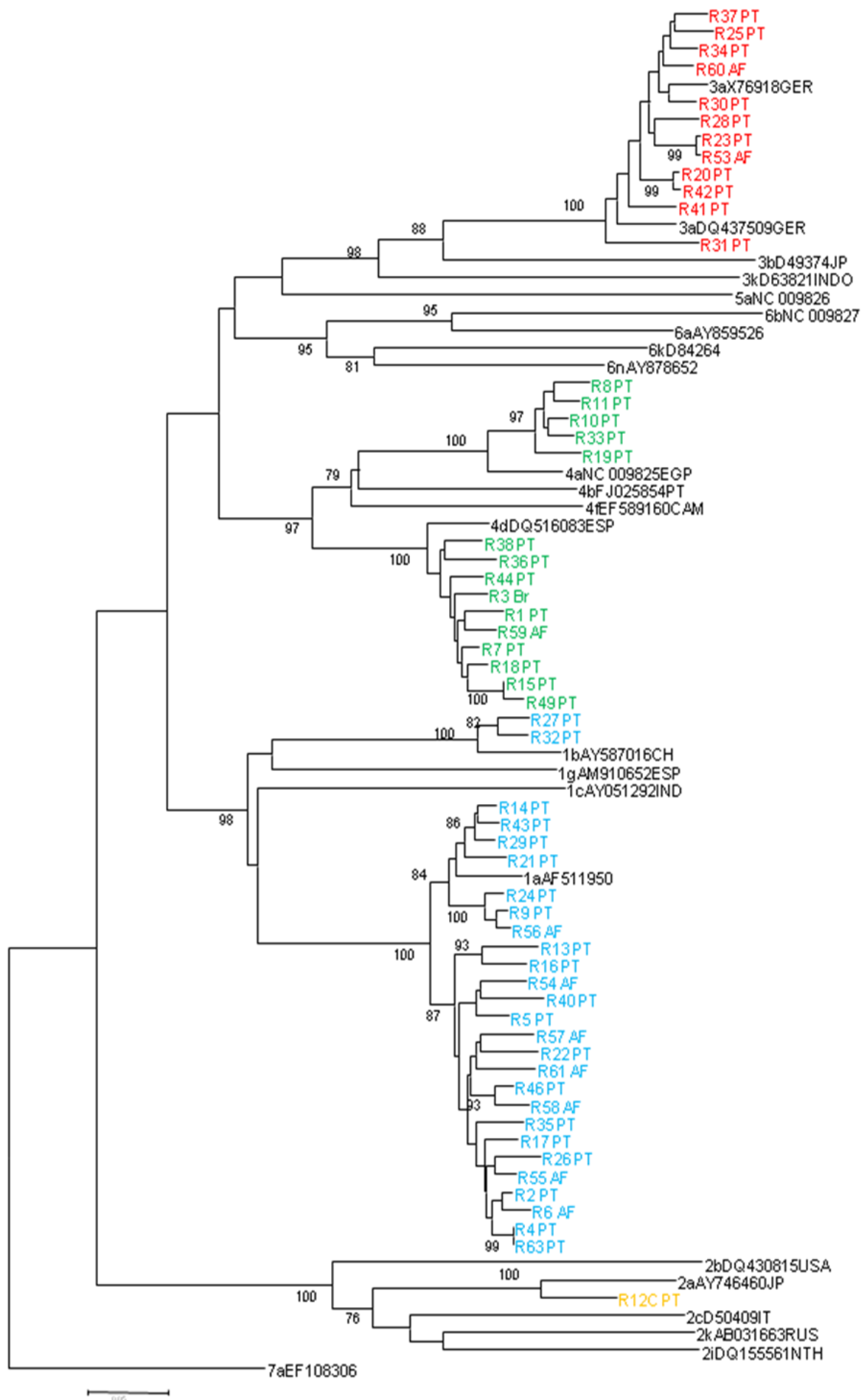


Figura 3.5 – Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 1; Verde, sequências agrupadas com sequências do genótipo 4; Vermelho, sequências agrupadas com sequências do genótipo 3; Amarelo, sequências agrupadas com sequências do genótipo 2; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África; BR, Brasil). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas.

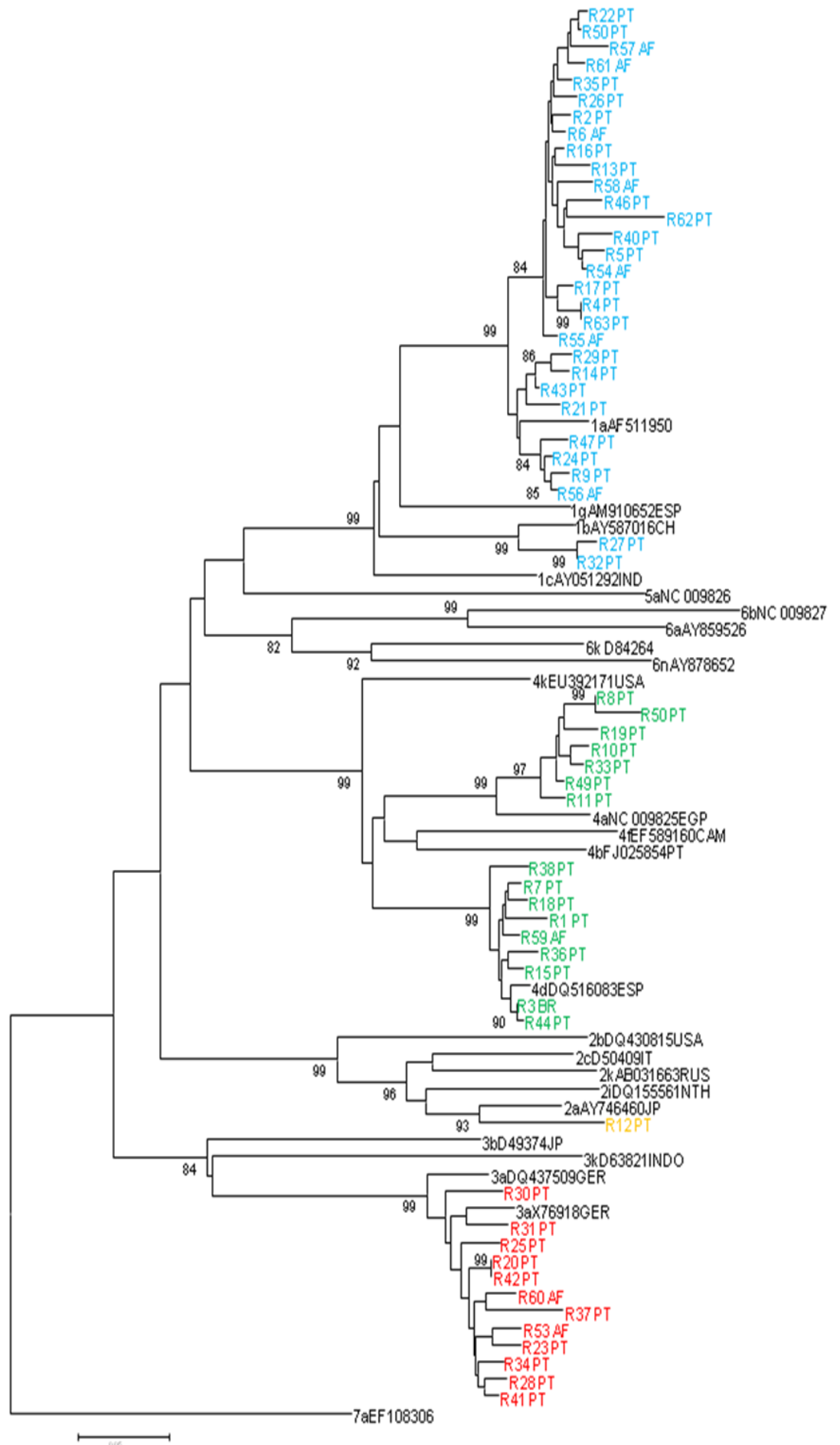


Figura 3.6 – Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC. Azul sequências agrupadas com sequências do genótipo 1; Verde, sequências agrupadas com sequências do genótipo 4; Vermelho, sequências agrupadas com sequências do genótipo 3; Amarelo, sequências agrupadas com sequências do genótipo 2; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África; BR, Brasil). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas.

Após a análise filogenética global para identificação dos genótipos do VHC, foram construídas árvores filogenéticas para os genótipos individuais com introdução de sequências adicionais do VHC, correspondentes aos subtipos com os quais as sequências estudadas surgem agrupadas com valores de *bootstrap* elevados. Esta análise teve como objectivo identificar inequivocamente os subtipos das sequências de VHC do estudo, avaliar o seu relacionamento entre si e com sequências provenientes da base de dados e, eventualmente, inferir sobre a sua origem e o seu padrão de transmissão. Para os genótipos 2 e 3, em que se observou concordância entre genótipos e subtipos para as regiões C/E1 e NS5B, optou-se por construir árvores baseadas em sequências concatenadas. Para os genótipos 1 e 4, em que se observou discordância relativamente a subtipos para algumas amostras e onde estão incluídas outras que não amplificaram para as duas regiões, optámos por fazer árvores individuais para cada região. Em duas das amostras analisadas (R47 e R50) não se conseguiu obter amplificação da região C/E1 tendo sido sequenciado o amplicão obtido para a região 5'UTR e realizada a árvore filogenética correspondente.

Na Figura 3.7 está representada a árvore filogenética correspondente à região 5'UTR. Uma vez que a sequência do subtipo 7a do VHC nesta região não surge num ramo independente e afastado, utilizou-se como *outgroup* a sequência correspondente do vírus GBV-B. Podemos observar que a sequência R47 está incluída no grupo das sequências dos genótipos 1 e 6 suportado por um valor de *bootstrap* de 83%. A ausência de subgrupos devido à grande semelhança entre as sequências, reflectida na ausência de ramos definidos, não permite classificar o genótipo ou subtipo desta amostra. A

sequência R50 apresenta-se agrupada com as sequências de referência do genótipo 2, subtipo 2a, ainda que com valores de *bootstrap* <75%, não sendo a relação filogenética obtida concordante com a análise da região NS5B (Figura 3.13). Assim, o genótipo das duas sequências nesta região é considerado indeterminado, com maior probabilidade de ser 1 ou 6 para a amostra R47 e 2 para a amostra R50.

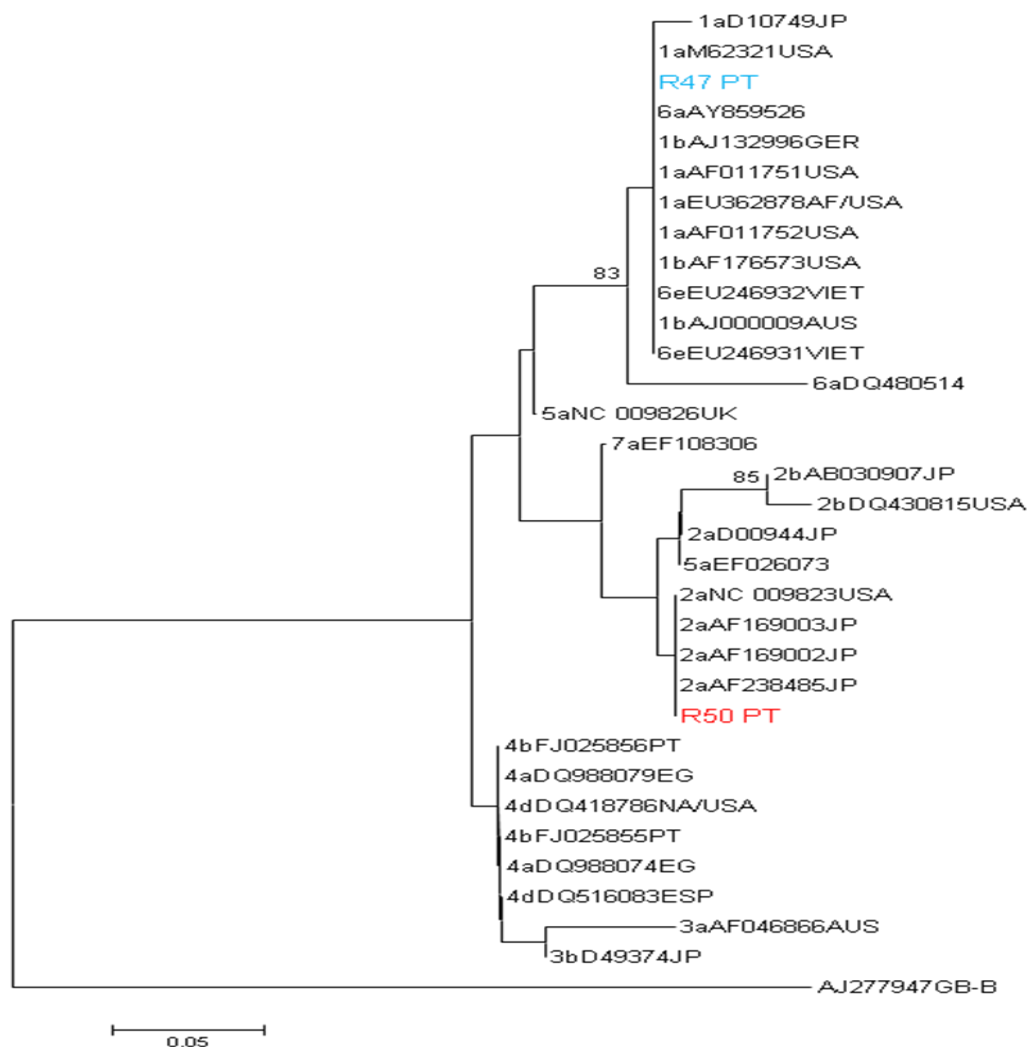


Figura 3.7 – Árvore filogenética baseada na região 5'UTR do VHC (127 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas de todos os genótipos de VHC. Azul, sequência agrupada com as sequências dos genótipos 1 e 6; Vermelho, sequência agrupada com sequências do genótipo 2; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas.

Na análise da árvore filogenética para o genótipo 1 relativa à região do C/E1 (Figura 3.8) verifica-se que as sequências estudadas formam dois agrupamentos distintos suportados por valores de *bootstrap* de 100%, um com as sequências de referência do subtipo 1a (n=25) e outro com as sequências de referência do subtipo 1b (n=2).

Dentro do subtipo 1a verifica-se a existência de dois grupos monofiléticos distintos. Um deles é suportado por um valor de *bootstrap* de 90% e inclui sequências de referência de origem geográfica diversa. O outro grupo (valor de *bootstrap* de 78%), engloba a maioria das sequências 1a analisadas (18/25) e não inclui quaisquer sequências provenientes da base de dados, podendo representar uma linhagem de vírus endêmica. Observa-se ainda, a existência de grupos constituídos por 2 a 3 sequências (R4/R63; R46/R58, R13/R16, R24/R56/R9, R29/R14/R43), suportados por elevados valores de *bootstrap* ($\geq 91\%$) sugestivos de possível transmissão local entre indivíduos epidemiologicamente relacionados.

Na análise filogenética da região NS5B do genótipo 1 (Figura 3.9), à semelhança de C/E1, verifica-se que as sequências estudadas apresentam homologia com os subtipos 1a e 1b, formando dois grupos distintos com as sequências de referência correspondentes a cada um destes subtipos. No subtipo 1a, são observados novamente dois grupos separados de sequências, ainda que sustentados por valores de *bootstrap* $< 75\%$. O pare de sequências R4/R63, assinalados com uma seta na Figura 3.9, surge novamente agrupado entre si com um valor de *bootstrap* de 99% confirmando o relacionamento epidemiológico sugerido na análise de C/E1.

As sequências R50 e R62 (assinaladas a vermelho na Figura 3.9) são provenientes do mesmo indivíduo (primeira e segunda colheita, respectivamente). No entanto, apesar de ambas se encontrarem agrupadas com sequências de referência do subtipo 1a, surgem com posicionamento distinto na árvore não estando estreitamente relacionadas como seria de esperar. A sequência R62 apresenta um ramo mais saliente em relação às restantes sequências estudadas e às sequências das bases de dados.

No seu conjunto, das 30 sequências NS5B analisadas, duas delas provenientes do mesmo indivíduo, 28 são classificadas como subtipo 1a e as duas restantes como 1b. Ainda, as 27 amostras analisadas para a região C/E1 apresentam o mesmo subtipo para a região NS5B. As amostras R47, R50 e R62 não possuem amplificação correspondente para C/E1.

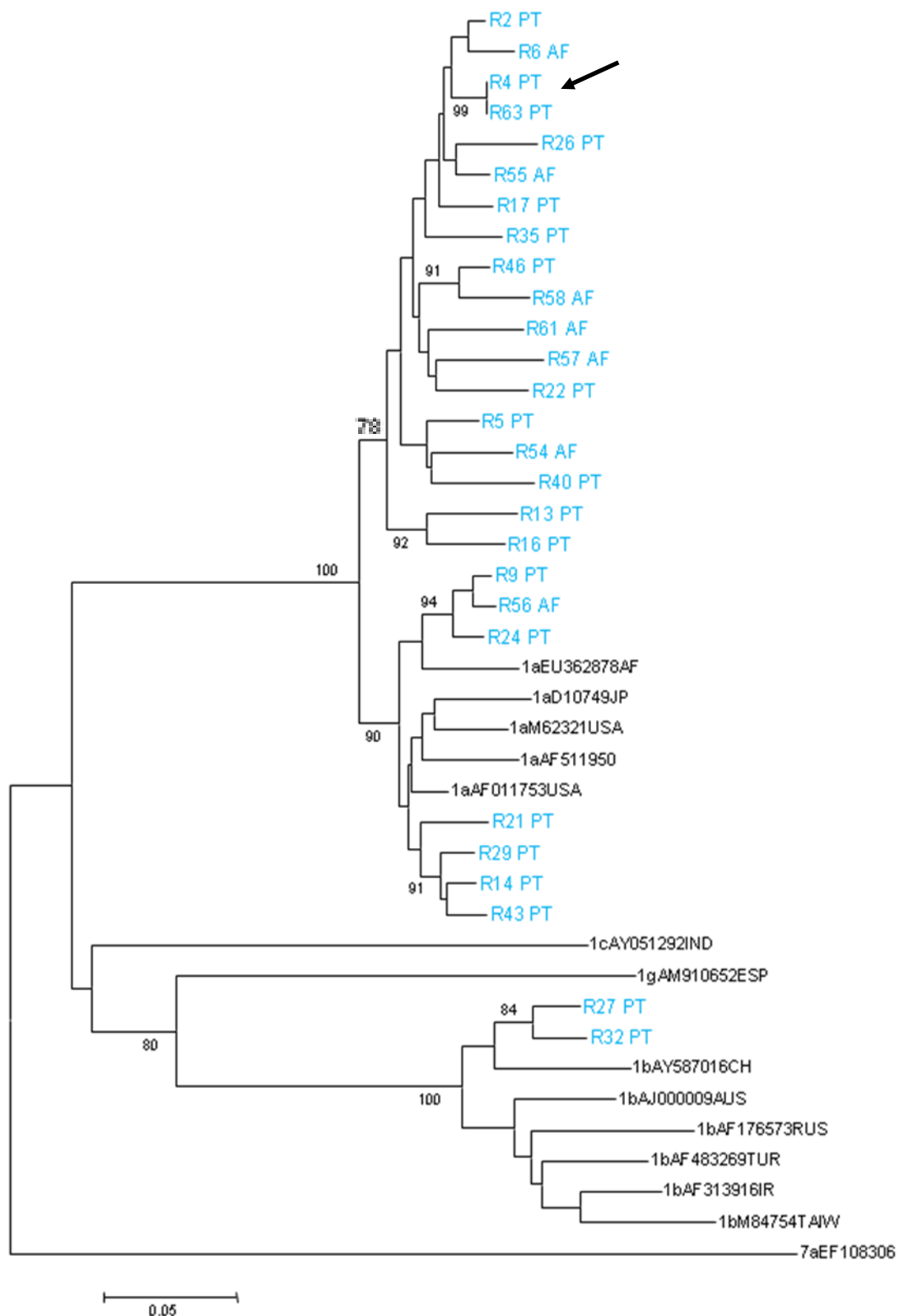


Figura 3.8 – Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 1 de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 1; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África). Árvore filogenética construída

peelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas. A seta indica as sequências que apresentam um elevado grau de similaridade.

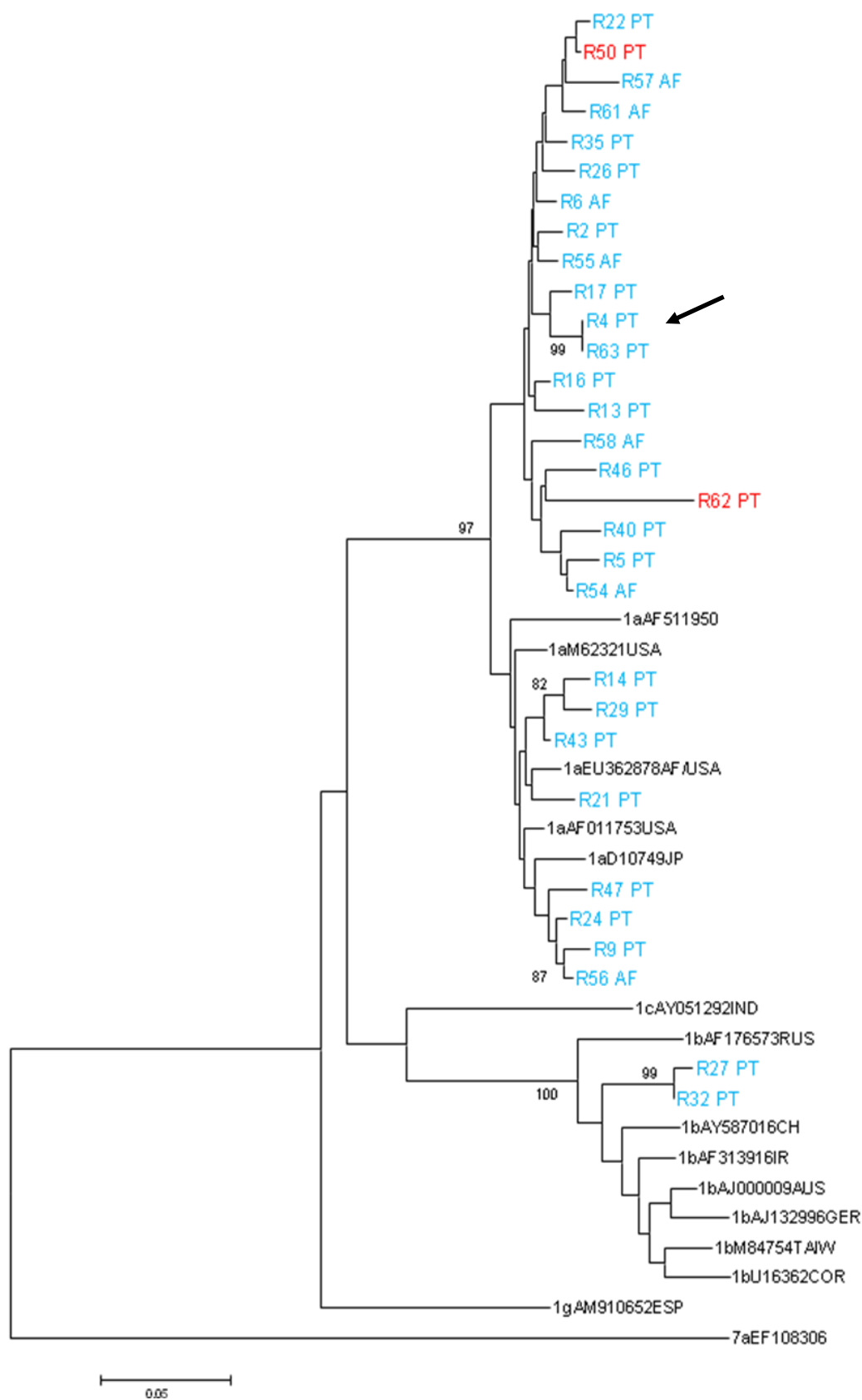


Figura 3.9 – Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 1 de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 1; Vermelho, sequências com subtipo discordante; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas. A seta indica as sequências que apresentam um elevado grau de similaridade.

A análise da árvore filogenética resultante da concatenação das sequências C/E1 e NS5B para o genótipo 2 (Figura 3.10) demonstra claramente (valor de *bootstrap* de 100%) o agrupamento da sequência R12 com as sequências de referência do subtipo 2a, indicando assim a sua inclusão neste subtipo do genótipo 2 do VHC.

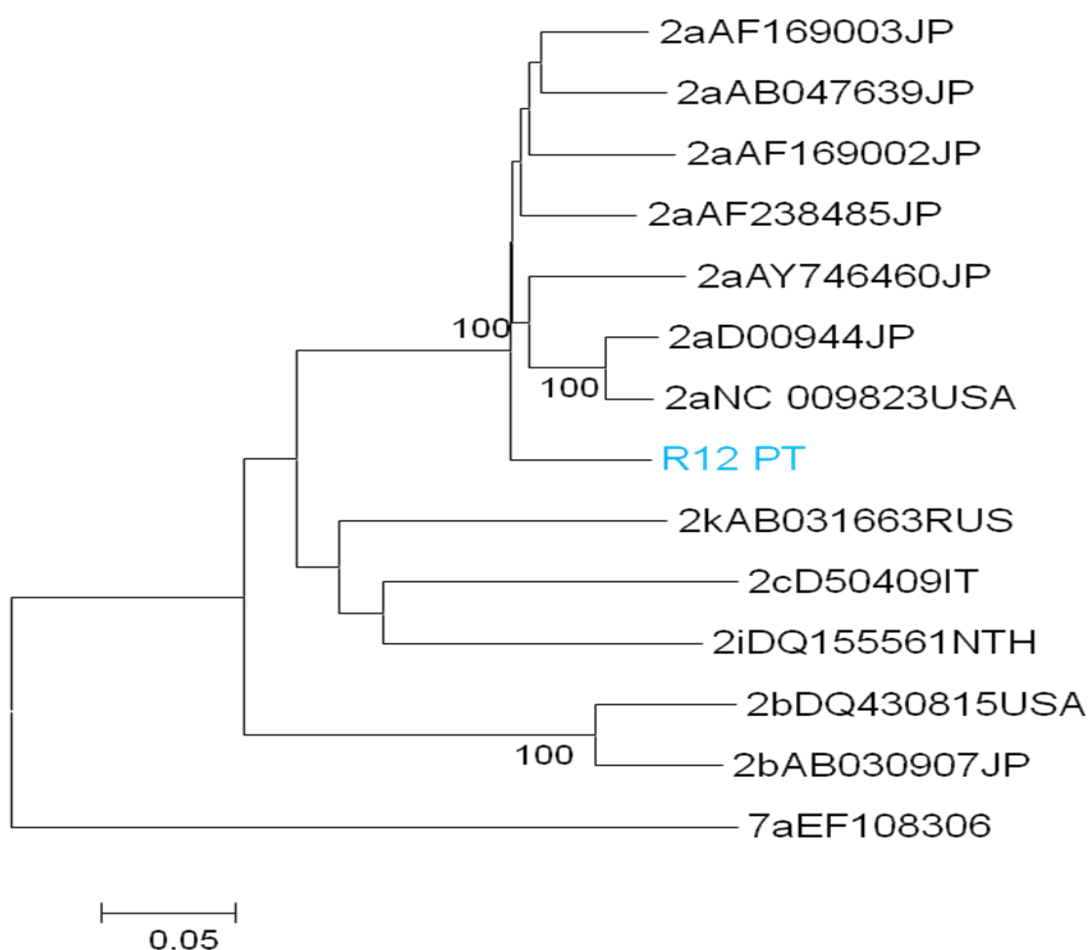


Figura 3.10 – Árvore filogenética baseada na concatenação das sequências das regiões C/E1 e NS5B do HCV (686 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 2 de VHC. Azul, sequência agrupada com sequências do genótipo 2; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas.

A árvore filogenética de sequências concatenadas das regiões C/E1 e NS5B construída para o genótipo 3 (Figura 3.11) mostra que todas as sequências (n=12) se agrupam com as sequências de referência do subtipo 3a (valor de *bootstrap* de 100%). Por outro lado, os pares de sequências analisadas R20/R42 e R23/R53 (assinalados com uma seta na Figura 3.11) apresentam-se agrupadas entre si com um valor de *bootstrap* de 100% e com ramos muito curtos, sugerindo uma relação epidemiológica estreita entre as estirpes virais correspondentes. Ainda, as sequências dos vírus 3a do estudo apresentam-se dispersas no seio das sequências de referência de origem geográfica muito distinta.

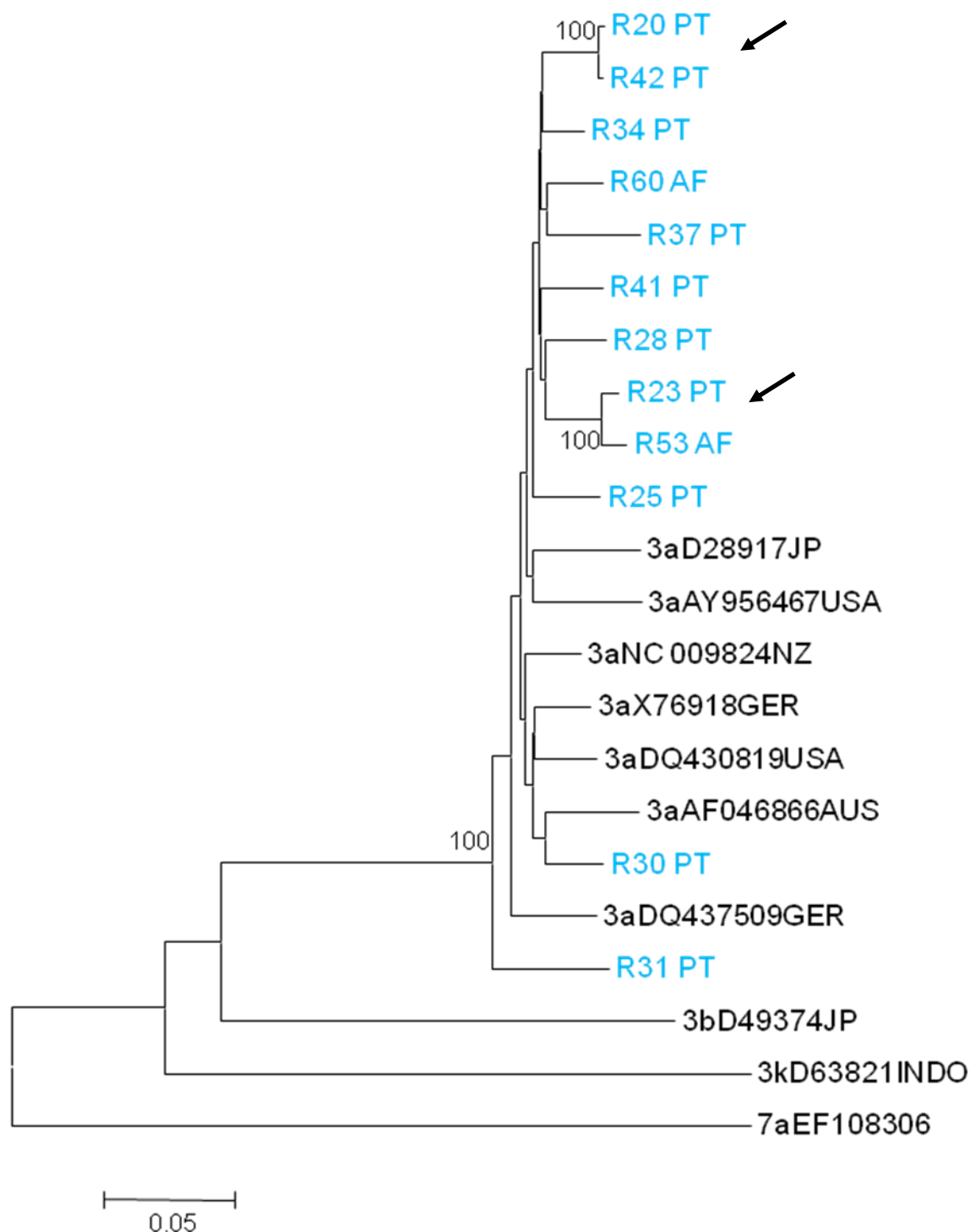


Figura 3.11 – Árvore filogenética baseada na concatenação das sequências das regiões C/E1 e NS5B do VHC (686 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 3 de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 3; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap*

≥75%, correspondentes a 1000 réplicas. As setas indicam as sequências que apresentam um elevado grau de similaridade.

Na Figura 3.12 está representada a árvore filogenética da região C/E1 para as sequências do genótipo 4. As sequências do estudo agrupam-se com as sequências de referência dos subtipos 4a (n=5) e 4d (n=10) com valores de *bootstrap* de 99%. Dentro do subtipo 4d, o par de sequências R15/R49 apresenta um elevado grau de similaridade (*bootstrap* de 99%), sugestivo de um relacionamento epidemiológico estreito (assinalado com uma seta na Figura 3.12). Pela análise da árvore filogenética da região NS5B (Figura 3.13), à semelhança da região C/E1, observa-se que as sequências analisadas se distribuem por dois grupos distintos correspondentes ao subtipo 4a e 4d. Para ambas as regiões, as sequências 4a e 4d apresentam-se dispersas no seio das sequências de referência de origem geográfica muito diversa.

Na análise filogenética das duas regiões do genoma viral para o genótipo 4 verifica-se que a sequência R49 (assinalada a verde nas Figuras 3.12 e 3.13) apresenta um posicionamento diferente nas árvores filogenéticas correspondentes a C/E1 e a NS5B ao nível dos subtipos do genótipo 4. Assim, na região C/E1 a sequência R49 surge agrupada com as sequências de referência do subtipo 4d, enquanto na região NS5B se apresenta agrupada com as sequências de referência do subtipo 4a. Desta forma, a análise filogenética de ambas as regiões (C/E1 e NS5B) sugere fortemente que a amostra R49 possa ser um potencial recombinante intragenótipo.

Relativamente à sequência R50 (assinalada a vermelho na Figura 3.13) o facto de surgir agrupada com as sequências de referência do subtipo 4a é discordante com o resultado da genotipagem por análise filogenética da região 5'UTR (Figura 3.7), a qual sugere ser presumivelmente do genótipo 2. Devido a resultados discordantes a nível de genótipos nas duas regiões analisadas, a amostra R50 foi novamente amplificada, assim como uma segunda colheita do mesmo indivíduo. Para ambas as amostras só se conseguiu a amplificação da região NS5B. A análise filogenética desta região mostrou um resultado diferente, evidenciando uma classificação como subtipo 1a (Figura 3.9), mas também com as duas sequências posicionadas de maneira distinta dentro deste subtipo. No conjunto das sequências do genótipo 4 para as quais se dispõe de amplicões C/E1 e NS5B, 5 são claramente classificadas como subtipo 4a para ambas as regiões enquanto 9 são do subtipo 4d. Uma amostra (R49) poderá corresponder a um putativo recombinante intragenótipos 4d4a.

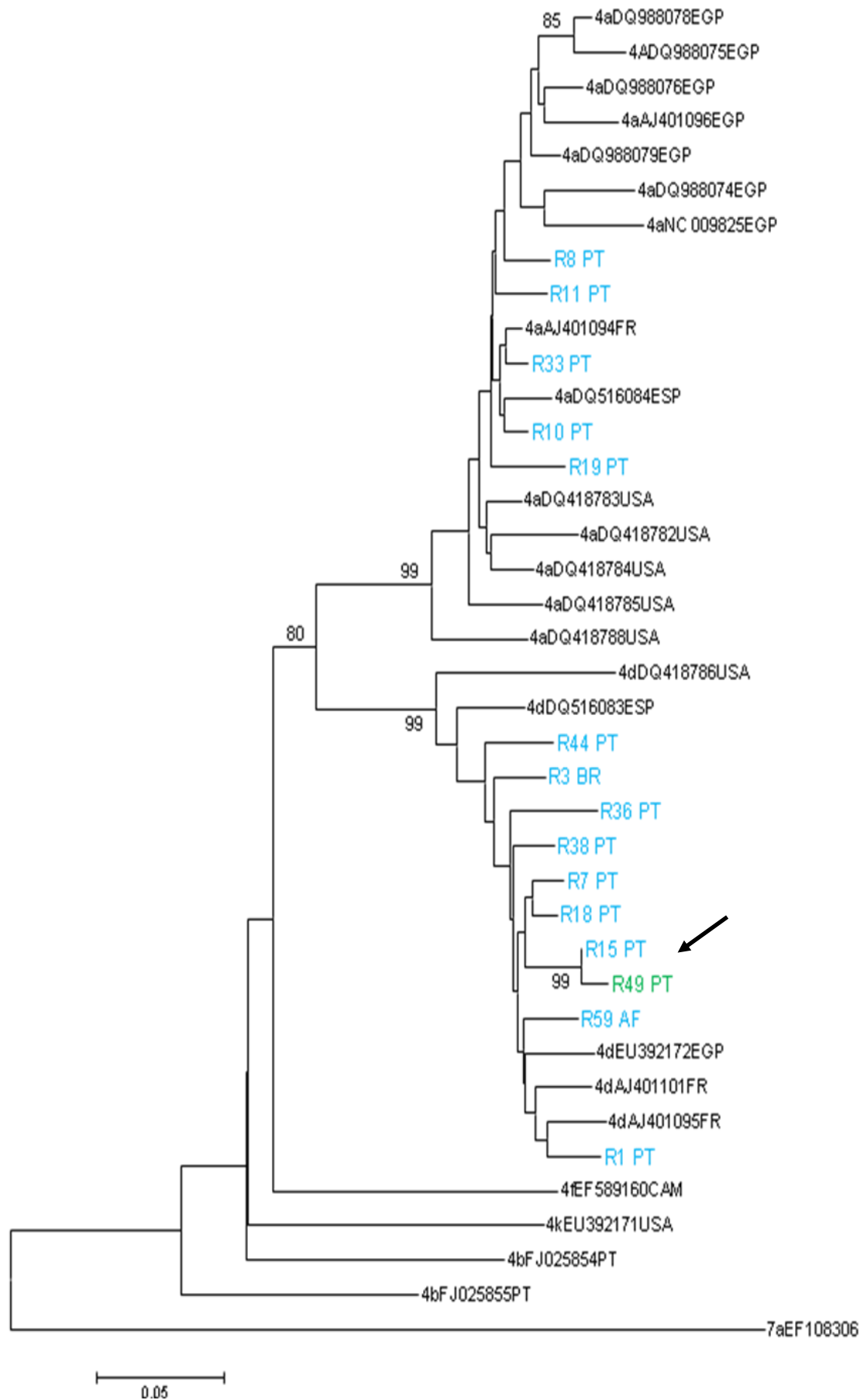


Figura 3.12 – Árvore filogenética baseada na região C/E1 do VHC (390 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 4 de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 4; Verde, sequência agrupada com sequências de referência do subtipo 4d nesta região, putativo recombinante; Preto, sequência de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África; BR, Brasil). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas. A seta indica sequências com elevado grau de similaridade.

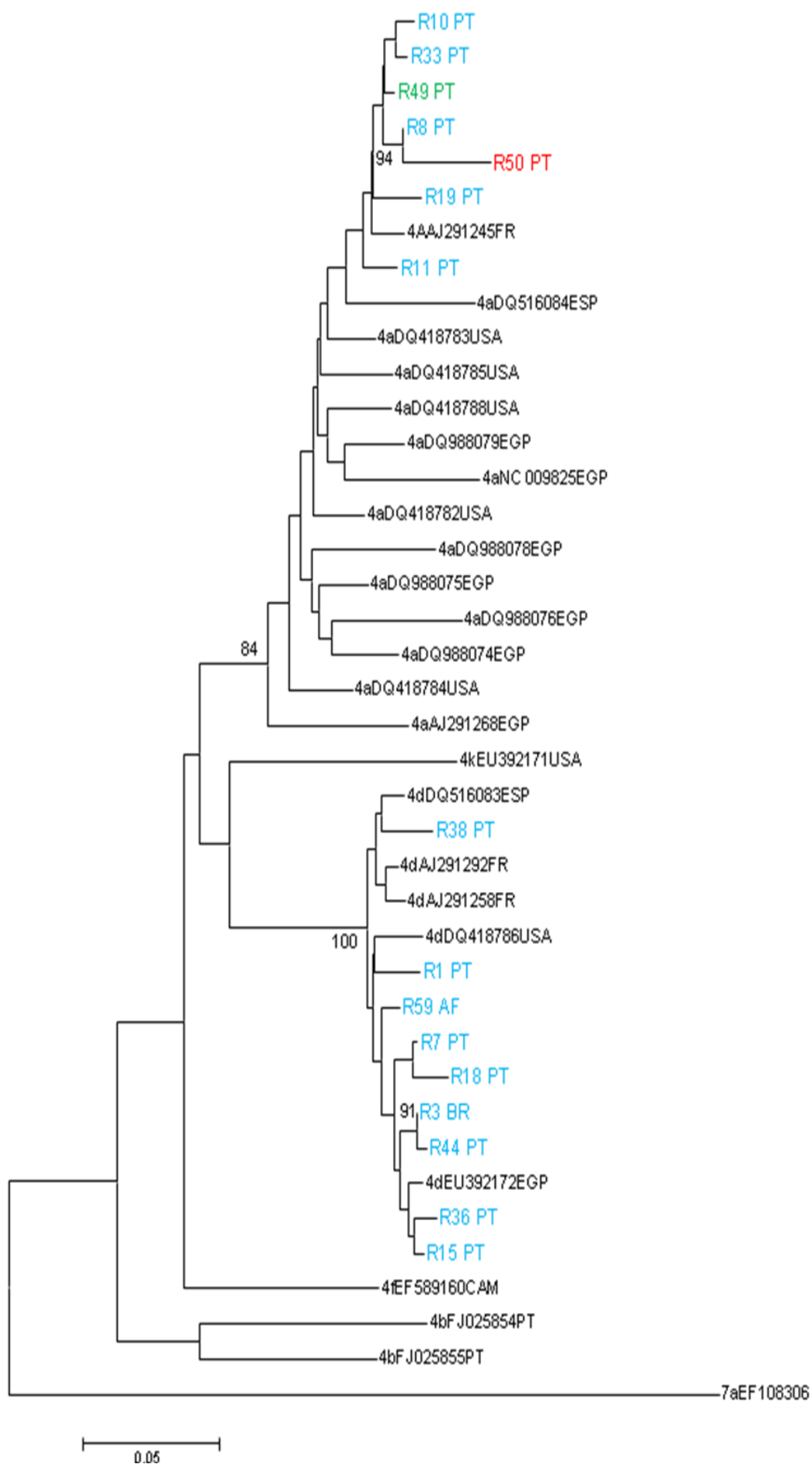


Figura 3.13 – Árvore filogenética baseada na região NS5B do VHC (296 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes de VHC do presente estudo e as estirpes de referência representativas do genótipo 4 de VHC. Azul, sequências agrupadas com sequências do genótipo 4; Verde, sequência agrupada com sequências de referência do subtipo 4a nesta região, putativo recombinante; Vermelho sequência com subtipo discordante; Preto, sequências de referência. A seguir à identificação da amostra encontra-se indicada a nacionalidade do indivíduo infectado (PT, Portugal; AF, África; BR, Brasil). Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. Estão apresentados os valores de *bootstrap* $\geq 75\%$, correspondentes a 1000 réplicas.

Em termos globais, a análise filogenética das sequências analisadas revela para a população estudada de UDIs co-infectados com VIH a seguinte distribuição de subtipos: 1a, 43,8% (n=25); 3a, 21,1% (n=12); 4d, 15,8% (n=9); 4a, 8,8% (n=5); 1b, 3,5% (n=2) e 2a, 1,7% (n=1). Foi também encontrada uma amostra com um putativo vírus recombinante e duas com resultado de subtipagem indeterminado, as três sendo descritas como subtipo indeterminado/recombinante, a que corresponde uma prevalência de 5,3% (n=3).

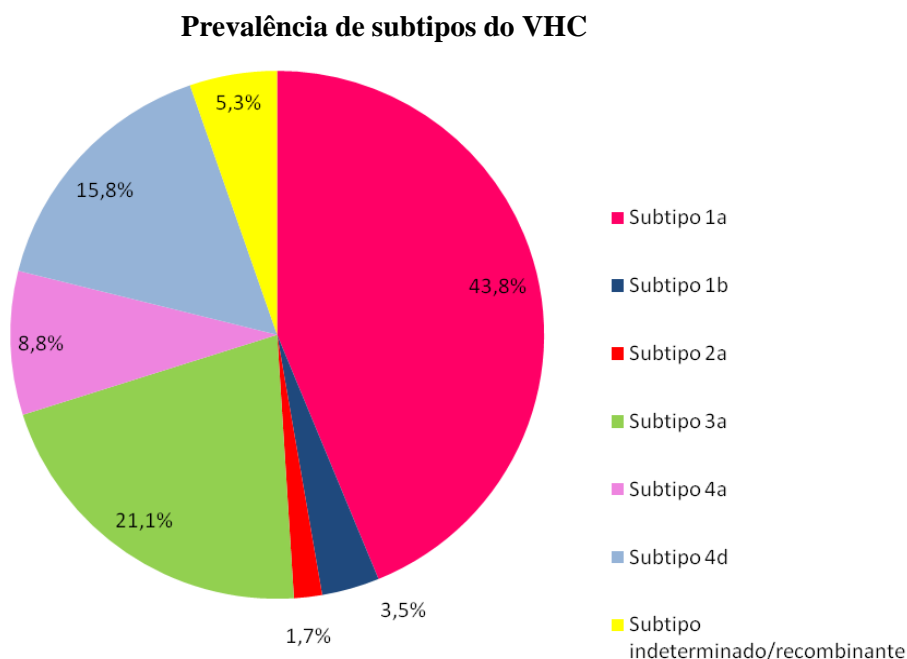


Figura 3.14- Representação gráfica da distribuição (%) de subtipos do VHC determinados na população de UDIs co-infectados com VIH.

A análise da associação entre as características demográficas dos indivíduos envolvidos no estudo (Tabela em Anexo I) e os genótipos/subtipos do VHC obtidos, recorrendo ao teste do χ^2 , não indicou a existência de qualquer associação entre as variáveis idade, sexo e origem geográfica e os diferentes genótipos e subtipos do VHC, valores de $P > 0,05$.

As árvores filogenéticas oferecem informações relativamente precisas sobre as relações evolutivas entre as diferentes sequências de VHC analisadas e o cálculo das distâncias genéticas entre as sequências de cada subtipo permite fazer uma avaliação relativa do seu tempo de circulação numa determinada região. A distância genética das estirpes de VHC na população de UDIs co-infectada com VH foi calculada com base nas sequências nucleotídicas de cada subtipo para as regiões C/E1 e NS5B. O cálculo das distâncias foi efectuado para as duas regiões em separado e dentro de cada subtipo (tabela 3.1). Nos subtipos 1b e 2a não foi calculada a distância genética devido ao número reduzido de sequências disponíveis. De um modo geral, observa-se que para a região C/E1 os valores das distâncias genéticas são mais elevados que para a região NS5B. Constatamos ainda, que o subtipo 1a é o subtipo que apresenta maiores distâncias genéticas seguido dos subtipos 3a, 4d e 4a. Este padrão é mantido para NS5B relativamente aos subtipos 1a e 3a, mas observa-se uma inversão em relação aos subtipos 4a e 4d. Este resultado poderá dever-se ao número relativamente reduzido de sequências analisadas para estes dois subtipos e ao facto de não ser o mesmo para as duas regiões.

Tabela 3.1 - Distâncias genéticas (%) das regiões C/E1 e NS5B para os subtipos analisados.

Região	Subtipo 1a	Subtipo 3a	Subtipo 4a	Subtipo 4d
C/E1	8,6 (n=25)	6,9 (n=12)	4,7 (n=5)	5,2 (n=10)
NS5B	5,3 (n=27)	5,1(n=12)	3,7 (n=7)	3,1 (n=9)

As distâncias genéticas estimadas sugerem um tempo de circulação mais prolongado do subtipo 1a relativamente aos outros subtipos identificados. As estirpes do genótipo 4 apresentam distâncias genéticas mais baixas que indicam uma introdução mais recente destes vírus.

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A co-infecção VHC/VIH tornou-se um grave problema de saúde pública devido ao efeito negativo do VIH na evolução da doença hepática, bem como na resposta ao tratamento da infecção pelo VHC. Devido à via de transmissão comum, na Europa, Estados Unidos e Austrália, os indivíduos utilizadores de drogas injectáveis são o grupo populacional com maior prevalência de co-infecção por estes dois vírus. Em Portugal, são escassos os estudos relativos à prevalência da infecção pelo VHC, assim como aos genótipos/subtipos circulantes, nos indivíduos que reportam a utilização de drogas injectáveis como o principal factor de risco para a infecção pelo VIH. Com este estudo pretendeu-se avaliar a prevalência de anticorpos anti-VHC e da infecção activa pelo VHC e fazer uma caracterização genética parcial das diferentes estirpes de VHC nos indivíduos com VIH e utilizadores de drogas injectáveis. O cálculo da seroprevalência foi efectuado com um teste rápido imunocromatográfico, enquanto a determinação da infecção activa se baseou na detecção de RNA viral por RT-PCR, tendo como alvo a região conservada 5'UTR. A caracterização genética das estirpes foi efectuada pela análise de duas regiões genómicas (C/E1 e NS5B) que foram amplificadas, sequenciadas e analisadas filogeneticamente para identificação dos subtipos do VHC, detecção de potenciais recombinantes e avaliação das relações filogenéticas das sequências de VHC estudadas entre si e com outras de origem geográfica diversa.

A população estudada, constituída por 66 UDIs infectados com VIH, apresentou uma prevalência elevada (86,4%) de anticorpos anti-VHC. Este valor é, no entanto, concordante com o estimado noutras populações de UDIs infectados com VIH em diversos países da Europa e EUA, com intervalos de 83-100% (van Asten *et al.*, 2004; Verucchi *et al.*, 2004; Greub *et al.*, 2000; Chamot *et al.*, 1990) e 81-90% (Sulkowski e Thomas, 2003; Weinstock *et al.*, 1999), respectivamente.

Como os testes serológicos não distinguem entre infecção resolvida e infecção activa e uma vez que nos indivíduos com imunossupressão grave (*e.g.* causada por VIH) se pode observar infecção activa na ausência de anticorpos, todas as amostras estudadas foram submetidas à amplificação da região 5'UTR. De entre as amostras seropositivas para VHC, 93% apresentaram virémia. Este valor é substancialmente mais elevado que o

observado nos indivíduos mono-infectados (70-80%) e deverá reflectir a menor probabilidade de resolução espontânea da infecção observada quando da co-infecção com VIH (Sulkowski, 2008; Luetkemeyer *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2000). Face ao número de anos (~10) de armazenamento das amostras a -80°C e aos ciclos sucessivos de congelação/descongelação a que foram sujeitas quando da sua utilização noutros estudos, devemos salientar a elevada taxa de amplificação positiva do RNA viral (53 de 57 plasmas seropositivos e 4 de 9 seronegativos). Nomeadamente, em 51 amostras foi observado produto de amplificação com apenas uma reacção de PCR, o que parece demonstrar a robustez dos protocolos usados na extracção e amplificação de RNA. Para esta taxa de sucesso de amplificação poderá também contribuir as cargas virais mais elevadas do VHC, normalmente encontradas nos indivíduos co-infectados com VIH (Badura *et al.*, 2008; Bonacini *et al.*, 1999; Beld *et al.*, 1998; Sherman *et al.*, 1993).

O RNA do VHC foi detectado em 44,4% (4/9) das amostras de indivíduos com serologia negativa para VHC. A presença de infecção activa nestes indivíduos pode ser explicada pela ocorrência de duas situações. A primeira devido à colheita do produto ter sido efectuada durante o “período janela”, *i.e.* o período que medeia entre a infecção e a seroconversão, durante o qual o vírus se replica activamente na ausência de anticorpos. Por outro lado, a população estudada está co-infectada com o VIH. A imunossupressão grave, *i.e.* contagem de células T CD4⁺ <200/μl, tem sido associada a resultados de serologia falsos negativos em infecções crónicas pelo VHC (Sulkowski, 2008; Verucchi *et al.*, 2004; Sulkowski e Thomas, 2003; Cooper *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 1993). Contudo, os indivíduos seronegativos com infecção activa deste estudo eram portadores assintomáticos e apresentavam uma contagem de células T CD4⁺ >200 células/μl, pelo que a disfunção imune poderá não ser a justificação mais provável deste resultado.

O conhecimento da distribuição dos genótipos em termos geográficos e de grupos de risco pode ajudar a compreender melhor a epidemiologia e a evolução do VHC, os vários genótipos e subtipos de VHC encontrando-se associados a padrões epidemiológicos e geográficos dinâmicos (Pybus *et al.*, 2009; Boulière *et al.*, 2002), assim como o impacto em termos de saúde pública, devido aos genótipos do VHC serem um dos principais factores independentes que influenciam a resposta à terapêutica. A distribuição de genótipos/subtipos do VHC nesta população foi feita com base na análise de sequências C/E1 e NS5B. Observou-se a amplificação da região NS5B para todas as

amostras com virémia detectável, enquanto para C/E1 não foi possível obter amplificação em duas amostras (R47 e R50). Este facto poderá estar relacionado com a maior diversidade genética observada nesta segunda região (Magiorkinis *et al.*, 2009; Hrabec *et al.*, 2006) e consequente incapacidade de hibridação dos *primers*, mesmo com redução da temperatura de emparelhamento. Esta incapacidade de obter amplificações para todas as amostras com amplificação da 5'UTR surge frequentemente na literatura (Pybus *et al.* 2009; Murphy *et al.*, 2007; Samimi-Rad *et al.*, 2004).

A análise filogenética das sequências C/E1 e NS5B do VHC revelou o predomínio do subtipo 1a (43,8%), seguido de 3a (21,1%), 4d (15,8%) e 4a (8,8%), enquanto os subtipos 1b e 2a são em número muito baixo e os genótipos 5 e 6 não foram identificados. Esta distribuição de subtipos, de um modo genérico, está de acordo com o padrão descrito para os UDIs nos países ocidentais, nomeadamente nos países do sul da Europa (van Asten *et al.*, 2004; Cochrane *et al.*, 2002). Porém, esta distribuição de genótipos/subtipos contrasta com a descrita para a população portuguesa em geral, em que o subtipo 1b surge com prevalências muito superiores e o genótipo 4 é pouco abundante ou mesmo não detectado (Caldeira *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2005; de Carvalho *et al.*, 2000; Ramalho *et al.*, 2000). Um estudo multicêntrico português recentemente divulgado e envolvendo cerca de 2000 indivíduos, 80% dos quais eram UDIs e 68% estavam co-infectados com VIH, descreveu uma distribuição global de genótipos (1, 54,0%; 3, 25,9%; 4, 18,4%; 2, 1,5%) muito semelhante à obtida neste trabalho mas sem discriminação de subtipos (Badura *et al.*, 2008).

O genótipo 1 na sua globalidade é endémico na África Ocidental, sendo sugerido que os subtipos 1a e 1b, epidémicos a nível mundial, possam ter aí a sua origem (Simmonds, *et al.*, 2005; Simmonds, 2004). Numa primeira fase, a disseminação destes dois subtipos terá sido iniciada por transmissão iatrogénica (*e.g.* transfusões sanguíneas, utilização de lotes de plasma contaminados, injeções com material não esterilizado e outras práticas médicas invasivas) durante e após a II Guerra Mundial. Estudos de filodinâmica e filogeografia sugerem que a expansão do subtipo 1b tenha precedido em cerca de 16 anos à do subtipo 1a, estando mais fortemente associada às práticas médicas não seguras, enquanto o aumento de utilização de drogas injectáveis, na década de 50 nos Estados Unidos e no final da década de 60 na Europa e Austrália, seria responsável pela difusão do subtipo 1a (Magiorkinis, *et al.*, 2009). De facto, cerca de metade da população

de UDIs estudada está infectada com o subtipo 1a em oposição aos vírus do subtipo 1b detectados em apenas 2 indivíduos. Por outro lado, nas árvores filogenéticas do genótipo 1 observa-se um agrupamento constituído por cerca de 70% das sequências 1a portuguesas bem separado de um segundo grupo que inclui sequências portuguesas e sequências com origem geográfica diversa provenientes das bases de dados. Apesar do número de sequências de referência ser limitado, esta segregação geográfica, suportada por um valor de *bootstrap* de 78% para C/E1, sugere um tempo de circulação longo e transmissão endémica de estirpes relacionadas. As distâncias genéticas estimadas para as estirpes do subtipo 1a são as mais elevadas para as duas regiões analisadas, o que apoia uma introdução mais antiga deste subtipo neste grupo de UDIs.

O subtipo 3a do VHC foi o segundo mais abundante no grupo de UDIs estudado. Um estudo multicêntrico europeu, realizado com amostras colhidas entre 1984 e 2001, demonstrou que os subtipos 1a e 3a eram igualmente os mais abundantes neste grupo de risco, mas que a proporção destes dois subtipos variava em termos geográficos. O subtipo 3a apresentava prevalências mais elevadas na Europa Central, enquanto no Norte e no Sul da Europa se observava predominância do subtipo 1a (van Asten, *et al.*, 2004). Curiosamente, as prevalências encontradas no presente trabalho (1a, 43,8% e 3a, 21,1%) são muito próximas das então estimadas para o Sul da Europa (1a, 41,5% e 3a, 19,5%). De acordo com a distância genética estimada para as sequências do subtipo 3a, este deverá ter sido introduzido posteriormente ao subtipo 1a. A elevada prevalência do subtipo 3a entre UDIs e o facto de ter emergido num passado relativamente recente, sugerem que a sua introdução e disseminação coincidam com a expansão da utilização de drogas injectáveis à semelhança do observado noutros países europeus e EUA (Martinot-Peignoux *et al.*, 1999; Naoumov *et al.*, 1999; Trépo *et al.*, 1999; Berg *et al.*, 1997; Pawlotsky *et al.*, 1995).

O genótipo 4 do VHC é responsável por uma percentagem relativamente elevada (~25%) das infecções analisadas. Este genótipo é predominantemente encontrado no Egipto, o país do mundo com a prevalência mais elevada de VHC (> 15%), onde representa 90% de todos os casos (Kamal e Nasser, 2008). Nos outros países do Norte de África é responsável por 5-11% das infecções, mas na África Sub-Sahariana e Médio Oriente varia entre 36% e 100% dos casos de VHC. Recentemente, o genótipo 4 do VHC tem vindo a disseminar-se por vários países europeus, especialmente os da bacia

mediterrânica, tais como Itália (Ansaldi *et al.*, 2005), França (Payan *et al.*, 2005), Grécia (Katsoulidou *et al.*, 2006) e Espanha (Ramos *et al.*, 2007; Sánchez-Quijano *et al.*, 1997), onde a prevalência de infecção por este genótipo varia entre 10% e 24%. Na Europa, as infecções pelo genótipo 4 são frequentes entre UDIs, muitos dos quais co-infectados com VIH (Chlabicz *et al.*, 2008; Franco *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2007; Nicot *et al.*, 2005; van Asten *et al.*, 2004; Cochrane *et al.*, 2002; Morice *et al.*, 2001), e imigrantes africanos (de Bruijne *et al.*, 2009; Cantaloube *et al.*, 2008; Morice *et al.*, 2001) colocando-se a hipótese de ter sido introduzido na Europa através da imigração activa de indivíduos originários de regiões onde o genótipo 4 é endémico e, subsequentemente, disseminado através do movimento de UDIs entre os diversos países europeus (Kamal e Nasser, 2008). Apenas um dos indivíduos infectados com o genótipo 4 deste estudo tem origem africana (R59).

O genótipo 4 do VHC é um genótipo muito heterogéneo, com grande diversidade genética e um grande número de subtipos descritos comparativamente com os outros genótipos (Kamal e Nasser, 2008; <http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/classification/genotable.html>). Dentro do genótipo 4 identificámos apenas os subtipos 4a e 4d. Estes são efectivamente os subtipos mais abundantes entre os UDIs de outros países europeus, enquanto os imigrantes africanos, exceptuando os egípcios maioritariamente infectados pelo subtipo 4a, apresentam uma grande diversidade de outros subtipos (de Bruijne *et al.*, 2009; Roulot *et al.*, 2007; de Vries *et al.*, 2006; Delwaide *et al.*, 2006). Comparativamente com os subtipos 1a e 3a, as distâncias genéticas para as estirpes dos vírus 4a e 4d são claramente inferiores. Uma vez que as sequências tendem a tornar-se mais heterogéneas ao longo do tempo, esta diferença faz supor a introdução mais recente das estirpes do genótipo 4 na população de UDIs portuguesas. Para além das distâncias genéticas, a proporção relativa dos diferentes subtipos identificados também poderá reflectir, em parte, o seu tempo de circulação, sendo mais frequentes os subtipos com mais tempo de transmissão dentro de um determinado grupo populacional. Ainda, de um modo geral, a topologia das árvores filogenéticas dos genótipos 1, 3 e 4, em que se observa dispersão das sequências portuguesas 1a, 3a, 4a e 4d no seio de sequências de subtipos correspondentes do VHC de diferente proveniência retiradas das bases de dados, ainda que em número reduzido, nomeadamente sequências de UDIs de França e Espanha, está em conformidade com várias introduções destas estirpes ou mesmo com a circulação alargada de vírus entre

UDIs dos países ocidentais, frequentemente proposto na literatura (Katsoulidou *et al.*, 2006; Morice *et al.*, 2006; Pybus *et al.*, 2005; van Asten *et al.*, 2004). Apenas para o subtipo 1a foi observada a segregação de um agrupamento geográfico português suportado por um valor de *bootstrap* elevado, provavelmente fruto de transmissão endêmica prolongada de estirpes deste subtipo. Para os subtipos mais frequentes, *i.e.* 1a e 3a, o aparecimento nas árvores filogenéticas de grupos de duas ou três sequências com ramos curtos e suportados por valores de *bootstrap* muito elevados apontam para a transmissão local de algumas estirpes virais, facilitada pelos comportamentos de risco deste grupo populacional.

Com excepção de uma (R49), para todas as amostras em que foi possível amplificar as sequências virais C/E1 e NS5B ambas as regiões apresentaram subtipos concordantes. A análise filogenética das sequências da amostra R49 revelou que a região C/E1 é classificada como subtipo 4d enquanto a região NS5B surge agrupada com sequências 4a. A hipótese desta discordância de subtipos ser resultante da contaminação com outras amostras ou produtos de RT-PCR levou-nos a repetir todo o processamento da amostra isoladamente, tendo-se obtido um resultado idêntico ao primeiro. Assim, este resultado é fortemente sugestivo de estarmos perante um vírus recombinante intragenótipo 4d4a. Uma vez que i) observámos a co-circulação destes dois subtipos na mesma região geográfica, ii) a infecção com um genótipo/subtipo do VHC não confere imunidade contra a super-infecção por outro genótipo/subtipo, iii) estes dois subtipos circulam no mesmo grupo de risco e iv) a exposição repetida a diferentes vírus, através da partilha de material de injeção contaminado, é altamente provável, não será de estranhar a geração desta forma recombinante. No entanto, este resultado carece de confirmação uma vez que poderemos estar perante uma infecção mista ou co-infecção com vírus diferentes, frequentemente observada entre UDIs (Lee *et al.*, 2010; Aitken *et al.*, 2008; Bowden *et al.*, 2005; Herring *et al.*, 2004; Giannini *et al.*, 1999). Uma vez que os cromatogramas provenientes de sequenciação directa dos produtos de PCR permitem detectar duas estirpes apenas quando estão em proporções superiores a cerca de 20%, uma estirpe menos abundante mas que emparelhe mais facilmente com uma das séries de *primers* poderá ser preferencialmente amplificada para a região correspondente. Assim, numa primeira fase a clonagem dos produtos de PCR e sequenciação de vários clones para cada região permitiria avaliar a presença de uma infecção mista. Numa segunda fase, caso não se confirmasse a infecção por vírus de dois subtipos diferentes, seria necessário

prosseguir com a sequenciação do genoma completo e identificação de possíveis pontos de recombinação. A recombinação parece ser um fenómeno raro no VHC, estando descrito na literatura um número limitado de recombinantes naturais, tanto intergenótipos como intragenótipos (revisto em Lee *et al.*, 2010 e secção 1.6.1 neste trabalho). Para este facto poderão contribuir i) o elevado grau de diversidade genética que poderá dificultar a recombinação homóloga, ii) a incompatibilidade funcional de proteínas de diferentes genótipos e mesmo de subtipos dentro de um mesmo genótipo e iii) a grande maioria dos estudos de epidemiologia molecular analisar apenas uma região do genoma e esta ser de tamanho relativamente curto. Uma vez que nunca foi descrita uma forma recombinante 4d4a, este vírus será alvo de análise posterior para confirmar o seu carácter recombinante.

Para as amostras R47 e R50, em que não se conseguiu a amplificação da região C/E1, optámos por sequenciar a região 5'UTR localizada no mesmo extremo do genoma e proceder à sua análise filogenética (Figura 3.7). No entanto constatámos a impossibilidade de atribuir inequivocamente um subtipo ou mesmo um genótipo às duas amostras. Para R50 o seu agrupamento com várias sequências do subtipo 2a leva-nos a sugerir a sua classificação neste. Porém, o valor de *bootstrap* <75% que sustenta o agrupamento não o permite fazer com elevado grau de certeza. A região NS5B desta amostra após uma primeira amplificação foi incluída no subtipo 4a (Fig. 3.13). Porém, face à discordância de subtipos, quando de uma segunda amplificação para confirmação do resultado e para eliminar a hipótese de contaminação, a nova sequência NS5B surgiu agrupada com sequências do subtipo 1a. Uma vez que dispúnhamos de uma segunda colheita do mesmo indivíduo (R62), procedeu-se a nova amplificação e análise filogenética tendo-se confirmado o subtipo 1a para a região NS5B mas, ao contrário do espectável, o posicionamento da sequência da segunda colheita na árvore filogenética é bem distinto do da primeira (Fig.3.9, sequências R50PT e R62PT). Uma vez que as duas amostras foram colhidas com 1 ano de intervalo, não podemos descartar a hipótese de este indivíduo ter sido infectado por uma nova estirpe viral do subtipo 1a ou ainda o facto de estar co-infectado com estirpes diferentes cuja abundância relativa se alterou ao longo do tempo. O facto de o subtipo da 5'UTR não ser aparentemente concordante com qualquer um dos subtipos obtidos para a região NS5B e ainda devido a estes serem discordantes para as três sequências analisadas, fazendo supor uma forma recombinante e/ou infecção mista, implica que esta amostra seja novamente analisada.

Quanto a R47, a sequência da 5'UTR surge inserida num grupo de sequências dos subtipos 1a, 1b, 6a e 6e. Curiosamente, exceptuando duas sequências 2b, as sequências dos genótipos 1 e 6 são as únicas que surgem agrupadas com um valor de *bootstrap* >75%, pelo que com alguma probabilidade a 5'UTR de R47 pertencerá a um destes genótipos. Considerando que i) a respectiva região NS5B é classificada como 1a (Fig.3.6 e 3.9), ii) a ocorrência de recombinantes é pouco frequente e iii) o genótipo 6 também raramente é detectado na Europa, sendo mais prevalente no Sudeste Asiático, esta estirpe viral deverá ser do genótipo 1 para a 5'UTR. As dificuldades de subtipagem ou mesmo de genotipagem do VHC com base na sequência 5'UTR têm sido descritas por vários autores. Hraber e colaboradores (2006) estimaram 66% de posições invariantes para esta região em oposição a 25% da sequência codificadora da poliproteína, o que originaria incapacidade de resolução inequívoca dos genótipos 1, 4, 5 ou 6. Estes autores sugerem inclusivamente a inadequação em termos clínicos dos testes genotípicos baseados na 5'UTR. Um sinal filogenético mais baixo, uma menor taxa evolutiva e um maior ruído filogenético para as sequências 5'UTR, relativamente às sequências codificadoras do VHC, foram igualmente descritos por Salemi e Vandamme (2002).

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A análise retrospectiva (1998-2001) da infecção pelo VHC num grupo de UDIs co-infectados pelo VIH da área metropolitana de Lisboa revelou:

- Prevalência elevada (86,4%) de anticorpos anti-VHC concordante com o estimado noutras populações de UDIs infectados com VIH em diversos países da Europa e EUA.

- Uma taxa de virémia elevada (93,0%) entre as amostras seropositivas para VHC, substancialmente superior ao observado nos indivíduos mono-infectados (70-80%), que deverá reflectir a menor probabilidade de resolução espontânea da infecção observada quando da co-infecção com VIH.

- A presença do RNA de VHC em 44,4% (4/9) das amostras de indivíduos com serologia negativa para VHC, justificada pela colheita do produto durante o “período janela” ou pela co-infecção com o VIH.

- O predomínio do subtipo 1a (43,8%), seguido de 3a (21,1%), 4d (15,8%) e 4a (8,8%), enquanto os subtipos 1b e 2a são em número muito baixo e os genótipos 5 e 6 não foram identificados. Esta distribuição de subtipos está, essencialmente, de acordo com o padrão descrito para os UDIs dos países industrializados, nomeadamente os do sul da Europa.

- A introdução temporalmente mais distante dos subtipos 1a e 3a relativamente aos subtipos 4a e 4d mais recentes, sugerida pelos cálculos das distâncias genéticas das sequências dos vários subtipos e, em parte, pela sua abundância relativa.

- Para os subtipos mais frequentes, a mistura de sequências das estirpes portuguesas de VHC com sequências de origem geográfica diversa retiradas das bases de dados, sugestiva da circulação aberta de VHC entre UDIs de diferentes países.

- A presença de potenciais vírus recombinantes ou de infecções mistas, relativamente frequentes neste grupo de risco, e que carece de confirmação posterior.

- Uma elevada prevalência combinada (72,0%) dos genótipos do VHC 1 e 4. Uma vez que estes genótipos por si sós apresentam baixas taxas de resposta virológica sustentada, sendo agravadas pela co-infecção com o VIH, e que existe a possibilidade da passagem destes vírus dos UDIs para a população em geral, torna-se urgente implementar

medidas adequadas de vigilância epidemiológica e prevenção para ambos os vírus, de forma a minorar este grave problema de saúde pública.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

AITKEN, C.K., LEWIS, J., TRACY, S.L., SPELMAN, T., BOWDEN, D.S., BHARADWAJ, M., DRUMMER, H. & HELLARD, M., 2008. High Incidence of Hepatitis C Virus Reinfection in a Cohort of Injecting Drug Users. *Hepatology*, **48**: 1746-1752.

ALTER, M.J., 2006. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *Journal of Hepatology*, **44**: S6-S9.

ALTER, M.J., 2007. Epidemiology of hepatitis c virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, **13**: 2436-2441.

ALTER, M.J., 2002. Prevention of Spread of Hepatitis C. *Hepatology*, **36**: S93-S98.

ANSALDI, F., BRUZZONE, B., SALMASO, S., ROTA, M.C., DURANDO, P., GASPARINI, R. & ICARDI, G., 2005. Different Seroprevalence and Molecular Epidemiology Patterns of Hepatitis C Virus Infection in Italy. *Journal of Medical Virology*, **76**: 327-332.

ANTAKI, N., CRAXI, A., KAMAL, S., MOUCARI, R., VAN DER MERWE, S., HAFFAR, S., GADANO, A., ZEIN, N., LAI, L.C., PAWLITSKY, J.M., HEATHCOTE, E.J., DUSHEIKO, G. & MARCELLIN, P., 2009. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver International*, **1478**: 342-354.

ARAÚJO, F., HENRIQUES, I., MONTEIRO, F., MEIRELES, E., CRUZ, A., TAVARES, G. & MOTA-MIRANDA, A., 2005. Evaluation of NucliSens-AmpliScreen methodology to detect subtypes G of HIV-1 and 4c/4d of HCV in the screening of blood donors. *Transfusion Clinique et Biologique*, **12**: 331-335.

BADURA, R., VALENTE, C., VALADAS, E., FAISCA, R., TAVARES, A., BORGES, F., ALVES, H., MACHADO, J., SERRÃO, R. & CASTRO, R.S., 2008. HCV and HCV/HIV in Portugal a multicentric cohort study. 4th International workshop in HIV and Hepatitis co-infected, 19-21 June, Madrid, Spain.

BELD, M., PENNING, M., LUKASHOV, V., MCMORROW, M., ROSS, M., PAKKER, N., VAN DEN HOEK, A. & GOUDSMIT, J., 1998. Evidence that both HIV and HIV-induce immunodeficiency enhance HCV replication among HCV seroconverters. *Virology*, **244**: 504-512.

BERG, T., HOPF, U., STARK, K., BAUMGARTEN, R., LOBECK, H. & SCHREIER, E., 1997. Distribution of hepatitis C virus genotypes in German patients with chronic hepatitis C: correlation with clinical and virological parameters. *Journal of Hepatology*, **26**: 484-491.

BLACKARD, J.T., SHATA, M.T., SHIRE, N.J. & SHERMAN, K. E., 2008. Acute Hepatitis C Virus: A Chronic Problem. *Hepatology*, **47**: 321-331.

BONACINI, M., GOVINDARAJAN, S., BLATT, L.M., SCHMID, P., CONRAD, A. & LINDSAY, K.L., 1999. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *Journal of Viral Hepatitis*, **6**: 203-208.

BOUCHARDEAU, F., CANTALOUBE, J.F., CHEVALIEZ, S., PORTAL, C., RAZER, A., LEFRÈRE, J.J., PAWLOTSKY, J.M., DE MICCO, P. & LAPERCHE, S., 2007. Improvement of Hepatitis C Virus (HCV) Genotype Determination with the New Version of the INNO-LiPA HCV Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 1140-1145.

BOURLIÈRE, M., BARBERIN, J.M., ROTILY, M., GUAGLIARDO, V., PORTAL, I., LECOMTE, L., BENALI, S., BOUSTIÈRE, C., PERRIER, H., JULLIEN, M., LAMBOT, G., LOYER, R., LEBARS, O., DANIEL, R., KHIRI, H. & HALFON P.,

2002. Epidemiological changes in hepatitis C virus genotypes in France: evidence in intravenous drug users. *Journal of Viral Hepatitis*, **9**: 62-70.

BOWDEN, S., MCCAWE, R., WHITE, P.A., CROFTS, N. & AITKEN, C.K., 2005. Detection of multiple hepatitis C virus genotypes in a cohort of injecting drug users. *Journal of Viral Hepatitis*, **12**: 322-324.

CALDEIRA, M.R., TEIXEIRA, M.J.N., HENGLER, F.J.F.C., MATEUS, N.F., DINIZ, R.C.A. & GONÇALVES, M.H., 2007. Hepatitis C Virus Genotype Prevalence Among Blood Donors From Central Portugal (P-185). *Poster Session: 6.2 Blood Safety – Transfusion Transmitted Disease (TTD) – Hepatitis*.

CANDOTTI, D., TEMPLE, J., SARKODIE, F. & ALLAIN, J.P., 2003. Frequent Recovery and Broad Genotype 2 Diversity Characterize Hepatitis C Virus Infection in Ghana, West Africa. *Journal of Virology*, **77**: 7914-7923.

CANTALOUBE, J.F., LAPERCHÉ, S., GALLIAN, P., BOUCHARDEAU, F., DE LAMBALLERIE, X. & DE MICCO, P., 2006. Analysis of the 5' Noncoding region versus the NS5b Region in Genotyping Hepatitis C Virus Isolates from Blood Donors in France. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**: 2051-2056.

CANTALOUBE, J.F., GALLIAN, P., LAPERCHÉ, S., ELGHOZZI, M.H., PIQUET, Y., BOUCHARDEAU, F., JORDIER, F., BIAGINI, P., ATTOUI, H. & DE MICCO, P., 2008. Molecular Characterization of Genotype 2 and 4 Hepatitis C Virus Isolates in French Blood Donors. *Journal of Medical Virology*, **80**: 1732-1739.

CHAMOT, E., HIRSCHL, B., WINTSCH, J., ROBERT, C.F., GABRIEL, V., DÉGLON, J.J., YERLY, S. & PERRIN, L., 1990. Loss of antibodies against hepatitis C virus in HIV-seropositive intravenous drug users. *AIDS*, **4**: 1275-1277.

CHEVALIEZ, S. & PAWLITSKY, J.M., 2006. Hepatitis C Virus Serologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *International Journal of Medical Sciences*, **3**: 35-40.

CHLABICZ, S., FLISIAK, R., KOWALCZUK, O., WIERCIŃSKA-DRAPALO, A., PYTEL-KROLCZUK, B., PROKOPOWICZ, D. & CHYCZEWSKI, L., 2008. High Prevalence of Genotype 4 Among Hepatitis C Virus-Infected Intravenous Drug Users in North-Eastern Poland. *Journal of Medical Virology*, **80**: 615-618.

CHOO, Q.L., KUO, G., WEINER, A.J., OVERBY, L.R., BRADLEY, D.W. & HOUGHTON, M., 1989. Isolation of cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-a, Non-B Viral Hepatitis Genome. *American Association for the Advancement of Science*, **244**: 359-362.

COCHRANE, A., SEARLE, B., HARDIE, A., ROBERTSON, R., DELAHOOKE, T., CAMERON, S., TEDDER, R.S., DUSHEIKO, G.M., DE LAMBALLERIE, X. & SIMMONDS, P., 2002. A Genetic Analysis of Hepatitis C Virus transmission between Injection Drug Users. *Journal of Infectious Diseases*, **186**: 1212-1221.

COLINA, R., CASANE, D., VASQUEZ, S., GARCÍA-AGUIRRE, L., CHUNGA, A., ROMERO, H., KHAN, B. & CRISTINA, J., 2004. Evidence of intratypic recombination in natural populations of hepatitis C virus. *Journal of General Virology*, **85**: 31-37.

COOPER, C.L., BADLEY, A.D. & ANGEL, J.B., 2001. Characteristics of hepatitis C virus infection in HIV-infected people. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, **12**: 157-163.

CORBET, S., BUKH, J., HEINSEN, A. & FOMSGAARD, A., 2003. Hepatitis C Virus Subtyping by a Core-Envelope 1-Based Reverse Transcriptase PCR Assay with Sequencing and Its Use in Determining Subtype Distribution among Danish Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, **41**: 1091-1100.

CRISTINA, J. & COLINA, R., 2006. Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus. *Virology Journal*, **3**: 53.

DANTA, M. & DUSHEIKO, G.M., 2008. Acute HCV in HIV-positive individuals. *Current Pharmaceutical design*, **14**: 1690-1697.

DE BRUIJNE, J., SCHINKEL, J., PRINS, M., KOEKKOEK, S.M., ARONSON, S.J., VAN BALLEGOIJEN, M.W., REESINK, H. W., MOLENKAMP, R. & VAN DE LAAR, T.J., 2009. Emergence of hepatitis C virus genotype 4: phylogenetic analysis reveals three distinct epidemiological profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, **47**: 3832-3838.

DE CARVALHO, A., MARTINHO, A., LEITÃO, J., CIPRIANO, M.A., COIMBRA, H. & PORTO, A., 2000. HCV genotypes. Liver histopathology and immunologic profile in four groups of patients. *Acta Médica Portuguesa*, **13**: 67-75.

DE VRIES, M.J., TE RIJDT, B. & VAN NIEUWKERK, C.M.J., 2006. Genotype distribution amongst hepatitis C patient in the Netherlands. *The Netherlands Journal of Medicine*, **64**: 109-113.

DELWALD, J., REENAERS, C., GERARD, C., VAIRA, D., BASTENS, B., SERVAIS, B., BEKHTI, A., BATAILLE, C., WAIN, E., DE LEEUW, P., DAENEN, G., MESUREUR, T., SENTE, J.M., BELAÏCHE, J. & GROUPE LIÉGEOIS D' ETUDE DES VIRUS HÉPATOTROPES, 2006. HCV genotype 4 in Belgium: three distinct patterns among patients from European and African origin. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **18**: 707-712.

DOMINGO, E., ESCARMÍS, C., SEVILLA, N., MOYA, A., ELENA, S.F., QUER, J., NOVELLA, I.S. & HOLLAND, J.J., 1996. Basic concepts in RNA virus evolution. *The FASEB Journal*, **10**: 859-864.

DRAKE, J.W., CHARLESWORTH, B., CHARLESWORTH, D. & CROW, J.F., 1998. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, **148**: 1667-1686.

EGGER, D., WÖLK, B., GOSERT, R., BIANCHI, L., BLUM, H.E., MORADPOUR, D. & BIENZ, K., 2002. Expression of Hepatitis C Virus Proteins Induces Distinct Membrane Alterations Including a Candidate Viral Replication Complex. *Journal of Virology*, **76**: 5974-5984.

EMCCDA (The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction). Statistical bulletin 2008. Drug – related infections diseases (INF) – Prevalence of HIV, HCV and HBV in IDUs. Disponível em [http:// www.wmcdda.europa.eu/stats08/inf](http://www.wmcdda.europa.eu/stats08/inf).

ESTEBAN, J.I., SAULEDA, S. & QUER, J., 2008. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*, **48**: 148-162.

FARNIK, H., MIHM, U. & ZEUZEM, S., 2009. Optimal therapy in genotype 1 patients. *Liver International*, **29**: 23-30.

FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**: 783-791.

FRANCO, S., TURAL, C., CLOTET, C. & MARTÍNEZ, M.A., 2007. Complete nucleotide sequence of genotype 4 hepatitis C viruses isolated from patients co-infected with immunodeficiency virus type 1. *Virus Research*, **123**: 161-169.

FRASER, C.S. & DOUDNA, J.A., 2007. Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation. *Nature Reviews*, **5**: 29-38.

FRIED, M.W., 2002. Side Effects of Therapy of Hepatitis C and Their Management. *Hepatology*, **36**: S237-S244.

GARCÍA-SAMANIEGO, J., RODRÍGUEZ M., BERENQUER, J., RODRÍGUEZ-ROSADO, R., CARBÓ, J., ASENSI, V. & SORIANO, V., 2001. Hepatocellular carcinoma in HIV-infected patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology*, **96**: 179-183.

GERBERDING, J.L., 1994. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *Journal of Infectious Disease*, **170**: 1410-1417.

GIANNINI, E., BOTTA, F., CAGLIERS, S., FASOLI, A., RISSO, D., CEPPA, P., CRESTA, E., VENTURINO, V., ICARDI, G., LANTIERI, P.B., CELLE, G. & TESTA, R., 1999. Chronic liver disease related to hepatitis C virus: age of patients seems to be a determinant of severity independently of viral genotype. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, **11**: 553-558.

GRAHAM, C.S., BADEN, L.R., YU, E., MRUS, J.M., CARNIE, J., HEEREN, T. & KOZIEL, M.J., 2001. Influence of Human Immunodeficiency Virus Infection on the Course of Hepatitis C Virus Infection: A Meta-Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, **33**: 562-569.

GREUB, G., LEDERGERBER, B., BATTEGAY, M., GROB, P., PERRIN, L., FURRER, H., BURGISSER, P., ERB, P., BOGGIAN, K., PIFFARETTI, J.C., HIRSCHHEL, B., JANIN, P., FRANCIOLI, P., FLEPP, M. & TELENTI, A., 2000. Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HVI-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*, **356**: 1800-1805.

GUILLOU-GUILLEMETTE, H.L., VALLET, S., GAUDY-GRAFFIN, C., PAYAN, C., PIVERT, A., GOUDEAU, A. & LUNEL-FABIANI, F., 2007. Genetic diversity of the

hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World Journal of Gastroenterology*, **13**: 2416-2426.

HADZIYANNIS, S.J. & KOSKINAS, J.S., 2004. Differences in epidemiology, liver disease and treatment response among HCV genotypes. *Hepatology Research*, **29**: 129-135.

HALL, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**: 95-98.

HAURI, A.M., ARMSTRONG, G.L. & HUTIN, Y.J., 2004. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *International Journal of STD and AIDS*, **15**: 7-16.

HERRING, B.L., PAGE-SHAFER, K., TOBLER, L.H. & DELWART, E.L., 2004. Frequent Hepatitis C Virus Superinfection in Injection Drug Users. *Journal of Infectious Diseases*, **190**: 1396-1403.

HRABER, P.T., FISCHER, W., BRUNO, W.J., LEITNER, T. & KUIKEN, C., 2006. Comparative analysis of hepatitis C virus phylogenies from coding and non-coding regions: the 5' untranslated region (UTR) fails to classify subtypes. *Virology Journal*, **3**: 103.

JEANNEL, D., FRETZ, C., TRAORE, Y., KOHDJO, N., BIGOT, A., GAMY, E.P., JOURDAN, G., KOUROUMA, K., MAERTENS, G., FUMOUX, F., FOURNEL, J.J. & STUYVER, L., 1998. Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *Journal of Medical Virology*, **55**: 92-97.

KAGEYAMA, S., AGDAMAG, D.M., ALESMA, E.T., LEAÑO, P.S., HEREDIA, A.M.L., ABELLANOSA-TAC-AN, I.P., JEREZA, L.D., TANIMOTO, T., YAMAMURA, J. & ICHIMURA, H., 2006. A natural Inter-Genotypic (2b/1b) Recombinant of Hepatitis C Virus in the Philippines. *Journal of Medical Virology*, **78**: 1423-1428.

KALININA, O., NORDER, H., MUKOMOLOV, S. & MAGNIUS, L.O., 2002. A Natural Intergenotypic Recombinant of Hepatitis C Virus Identified in St. Petersburg. *Journal of Virology*, **76**: 4034-4043.

KAMAL, S.A. & NASSER, I.A., 2008. Hepatitis C Genotype 4: What We Know and What We Don't Yet Know. *Hepatology*, **47**: 1371-1383.

KUIKEN, C., HRABER, P., THURMOND, J. & YUSIM, K., 2008. The hepatitis C sequence database in Los Alamos. *Nucleic Acids Research*, **36**: D512-D516.

KATSOULIDOU, A., SYPSA, V., TASSOPOULOS, N.C., BOLETIS, J., KARAFIOLIDOU, A., KETIKOGLOU, I., TSANTOULAS, D., VAFIADI, I., HATZIS, G., SKOUTELIS, A., AKRIVIADIS, E., VASILIAKIS, T., KITIS, G., MAGIORKINIS, G. & HATZAKIS, A., 2006. Molecular epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in Greece: temporal trends in HCV genotype-specific incidence and molecular characterization of genotype 4 isolates. *Journal of Viral Hepatitis*, **13**: 19-27.

LAVANCHY, D., 2009. The global burden of hepatitis C. *Liver International*, **29**: 74-81.

LAVANCHY, D., 2008. Chronic viral hepatitis as a public health issue in the world. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **22**: 991-1008.

LEE, Y.M., LIN, H.J., CHEN, Y.J., LEE, C.M., WANG, S.F., CHANG, K.Y., CHEN, T.L., LIU, H.F. & CHEN, Y.M., 2010. Molecular Epidemiology of HCV Genotypes

Among Injection Drug Users in Taiwan: Full-Length Sequences of Two New Subtype 6w Strains and a Recombinant form_2b6w. *Journal of Medical Virology*, **82**: 57-68.

LEGRAND-ABRAVANEL, F., NICOT, F., BOULESTIN, A., SANDRES-SAUNÉ, K., VINEL, J.P., ALRIC, L. & IZOPET, J., 2005. Pegylated interferon and ribavirina therapy for chronic hepatitis C virus genotype 4 infection. *Journal of Medical Virology*, **77**: 66-69.

LEGRAND-ABRAVANEL, F., CLAUDINON, J., NICOT, F., DUBOIS, M., CHAPUY-REGAUD, S., SANDRESS-SAUNE, K., PASQUIER, C. & IZOPET, J., 2007. New Natural Intergenotypic (2/5) Recombinant of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, **81**: 4357-4362.

LEMON, M., ALTER, M.J., WALKER, C. & YI, M., 2007. Fields – Virology (5^a Ed. Volume 1), Lippincott Williams & Wilkins, USA, 1253- 1291 pp.

LOHMANN, V., KÖRNER, F., KOCH, J.O., HERIAN, U., THEILMANN, L., BARTENSCHLAGER, R., 1999. Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line. **285**: 110-113.

LUETKEMEYER, A., HARE, C.B., STANSELL, J., TIEN, P.C., CHARLESBOIS, E., LUM, P., HAVLIR, D. & PETERS, M., 2006. Clinical Presentation and Course of Acute Hepatitis C Infection in HIV-Infected Patients. *Journal Acquire Immune Deficiency Syndrome*, **41**: 31-36.

MAGIORKINIS, G., MAGIORKINIS, E., PARASKEVIS, D., HO, S.Y.W., SHAPIRO, B., PYBUS, O.G., ALLAIN, J.P. & HATZAKIS, A., 2009. The Global Spread of Hepatitis C Virus 1a and 1b: A Phylodynamic and Phylogeographic Analysis. *PLoS Medicine*, **6**: e1000198.

MANNS, M.P., CORNBERG, M. & WEDMEYER, H., 2001. Current and future treatment of hepatitis C. *Indian Journal of Gastroenterology*, **20**: C47-C51.

MARINHO, R.T., MOURA, M.C., GIRIA, J.A. & FERRINHO, P., 2001. Epidemiological Aspects of Hepatitis C in Portugal. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **16**: 1076-1077.

MARTÍN-CARBONERO, L., PUOTI, M., GARCÍA-SAMANJEGO, J., DE LUCA, A., LOSADA, E., QUINZAN, G., BRUNO, R., MARIÑO, A., GONZÁLEZ, M., NÚÑEZ, M. & SORIANO, V., 2008. Response to pegylated interferon plus ribavirin in HIV-infected patients with chronic hepatitis C due to genotype 4. *Journal of Viral Hepatitis*, **15**: 710-715.

MARTINOT-PEIGNOUX, M., ROUDOT-THORAVAL, F., MENDEL, I., COSTE, J., IZOPET, J., DUVERLIE, G., PAYAN, C., PAWLOTSKY, J.M., DEFER, C., BOGARD, M., GEROLAMI, V., HALFON, P., BUISSON, Y., FOUQUERAY, B., LOISEAU, P., LAMORIL, P., LEFRERE, J.J. & MARCELLIN, P., 1999. Hepatitis C virus genotypes in France: relationship with epidemiology, pathogenicity and response to interferon therapy. The GEMHEP. *Journal of Viral Hepatitis*, **6**: 435-443.

MELLOR, J., HOLMES, E.C., JARVIS, L.M., YAP, P.L., SIMMONDS, P. & THE INTERNATIONAL HCV COLLABORATIVE STUDY GROUP, 1995. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implication for virus classification. *Journal of General Virology*, **76**: 2493-2507.

MORADPOUR, D., PENIN, F. & RICE, C.M., 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews*, **5**: 453-463.

MORENO, M.P., CASANE, D., LÓPEZ, L. & CRISTINA, J., 2006. Evidence of recombination in quasispecies populations of a Hepatitis C Virus patient undergoing anti-viral therapy. *Virology Journal*, **3**: 87.

MORICE, Y., ROULOT, D., GRANDO, V., STIRNEMANN, J., GAULT, E., JEANTILS, V., BENTATA, M., JARROUSSE, B., LORTHOLARY, O., PALLIER, C. & DÉNY, P., 2001. Phylogenetic analysis confirm the high prevalence of hepatitis C virus (HCV) type 4 in the Seine-Saint-Denis district (France) and indicate seven different HCV-4 subtypes linked to two different epidemiological patterns. *Journal of General Virology*, **82**: 1001-1012.

MORICE, Y., CANTALOUBE, J.F., BEAUCOURT, S., BARBOTTE, L., DE GENDT, S., GONCALES, F.L., BUTTERWORTH, L., COOKSLEY, G., GISH, R.G., BEAUGRAND, M., FAY, F., FAY, O., GONZALEZ, J.E., MARTINS, R.M.B., DHUMEAUX, D., VANDERBORGHT, B., STUYVER, L., SABLON, E., DE LAMBALLERIE, X. & PAWLOTSKY, J.M., 2006. Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus Subtype 3a in Injecting Drug Users. *Journal of Medical Virology*, **78**: 1296-1303.

MÜHLBERGER, N., SCHWARZER, R., LETTMEIER, B., SROCZYNSKI, G., ZEUZEM, S., SIEBERT, U., 2009. HCV-related burden of disease in Europe: a systematic assessment of incidence, prevalence, morbidity and mortality. *BMC Public Health*, **9**: 34.

MURPHY, D.G., WILLEMS, B., DESCHÊNES, M., HILZENRAT, N., MOUSSEAU, R. & SABBAH S., 2007. Use of Sequence Analysis of NS5B Region for Routine Genotyping of Hepatitis C Virus with Reference to C/E1 and 5' Untranslated Region Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**: 1102-1112.

MYRMEL, H., ULVESTAD, E. & ÅSJØ B., 2009. The hepatitis C virus enigma. *Journal Compilation*, **117**: 427-439.

NAOUMOV, N.V., 1999. Hepatitis C virus infections in Eastern Europe. *Journal of Hepatology*, **31**: 84-87.

NDJOMOU, J., PYBUS, O.G. & MATZ, B., 2003. Phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates indicates a unique pattern of endemic infection in Cameroon. *Journal of General Virology*, **84**: 2333-2341.

NEUMANN, A.U., LAM, N.P., DAHARI, H., GRETCH, D.R., WILEY, T.E., LAYDEN, T.J. & PERELSON, A.S., 1998. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficiency of interferon-alpha therapy. *Science*, **282**: 103-107.

NGUYEN, M.H. & KEEFFE, E.B., 2005. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **3**: S97-S101.

NICOT, F., LEGRAND-ABRAVANEL, F., SANDRES-SAUNE, K., BOULESTIN, A., DUBOIS, M., ALRIC, L., VINEL, J.P., PASQUIER, C. & IZOPT, J., 2005. Heterogeneity of hepatitis C virus genotype 4 strains circulating in south-western France. *Journal of General Virology*, **86**: 107-114.

NOPPORNPANTH, S., LIEN, T.X., POOVORAWAN, Y., SMITS, S.L., OSTERHAUS, A.D.M.E. & HAAGMANS, B.L., 2006. Identification of a Naturally Occurring recombinant Genotype 2/6 Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, **80**: 7569-7577.

PAGE-SHAFER, K., PAPPALARDO, B.L., TOBLER, L.H., PHELPS, B.H., EDLIN, B.R., MOSS, A.R., WRIGHT, T.L., WRIGHT, D.J., O'BRIEN, T.R, CAGLIOTI, S. & BUSCH, M.P., 2008. Testing Strategy To Identify Cases of Acute Hepatitis C Virus (HCV) Infection and To Project HCV Incidence Rates. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**: 499-506.

PAWLOTSKY, J.M., 2003. Mechanisms of antiviral treatment efficacy and failure in chronic hepatitis C. *Antiviral research*, **59**: 1-11.

PAWLOTSKY, J.M., PRESCOTT, L., SIMMONDS, P., PELLET, C., LAURENT.PUIG, P., LABONNE, C., DARTHUY, F., REMIRE, J., DUVAL, J., BUFFET, C., ETIENNE, J.P., DHUMEAUX, D. & DUSSAIX, E., 1997. Serological Determination of Hepatitis C Virus Genotype: Comparison with a Standardized Genotyping Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**: 1734-1739.

PAWLOTSKY, J.M, TSAKIRIS, L., ROUDOT-THORAVAL, F., PELLET, C., STUYVER, L., DUVAL, J. & DHUMEAUX, D., 1995. Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Infectious Diseases*, **171**: 1607-1610.

PAYAN, C., ROUDOT-THORAVAL, F., MARCELLIN, P., BLED, N., DUVERLIE, G., FOUCHARD-HUBERT, I., TRIMOULET, P., COUZIGOU, P., COINTE, D., CHAPUT, C., HENQUELL, C., ABERGEL, A., PAWLOTSKY, J.M., HEZODE, C., COUDÉ, M., BLANCHI, A., ALAIN, S., LOUSTAUD-RATTI, V., CHEVALLIER, P., TREPO, C., GEROLAMI, V., PORTAL, I., HALFON, P., BOURLIÈRE, M., BOGARD, M., PLOUVIER, E., LAFFONT, C., AGIUS, G., SILVAIN, C., BRODARD, V., THIEFIN, G., BUFFET-JANVRESSE, C., RIACHI, G., GRATTARD, F., BOURLET, T., STOLL-KELLER, F., DOFFOEL, M., IZOTEP, J., BARANGE, K., MARTINOT-PEIGNOUX, M., BRANGER, M., ROSENBERG, A., SOGNI, P., CHAIX, M.L., POL, S., THIBAUT, V., OPOLON, P., CHARROIS, A., SERFATY, L., FOUQUERAY, B., GRANGE, J.D., LEFRÈRE, J.J. & LUNEL-FABIANI, 2005. Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millennium: The GEMHEP GenoCII Study. *Journal of Viral Hepatitis*, **12**: 405-413.

POYNARD, T., YUEN, M.F., RATZIU, V. & LAI, C.L., 2003. Viral hepatitis C. *The Lancet*, **362**: 2095-2100.

PYBUS, O.G., COCHRANE, A., HOLMES, E.C., SIMMONDS, P., 2005. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infection, Genetics and Evolution*, **5**: 131-139.

PYBUS, O.G., BARNES, E., TAGGART, R., LEMEY, P., MARKOV, P.V., RASACHAK, B., SYHAVONG, B., PHETSOUVANAH, R., SHERIDAN, I., HUMPHREYS, I.S., LU, L., NEWTON, P.N. & KLENERMAN, P., 2009. Genetic History of Hepatitis C Virus in East Asia. *Journal of Virology*, **83**: 1071-1082.

QUAN, C.M., KRAJDEN, M., GRIGORIEW, G.A. & SALIT, I.E., 1993. Hepatitis C virus infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases*, **17**: 117-119.

RAMALHO, F., COSTA, A., PIRES, A., CABRITA, P., SEREJO, F., CORREIA, A.P., FATELA, N., CLÓRIA, H., LOPES, J., PINTO, H.C., MARINHO, R., RAIMUNDO, M., VELOSA, J., BATISTA, A. & DE MOURA, M.C., 2000. Correlation of Genotypes and Route of Transmission with Histologic Activity and Disease Stage in Chronic Hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences*, **45**: 182-187.

RAMOS, B., NÚÑEZ, M., TORO, C., SHELDON, J., GARCÍA-SAMANIEGO, J., RÍOS, P. & SORIANO, V., 2007. Changes in the distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes over time in Spain according to HIV serostatus: Implications for HCV therapy in HCV/HIV-coinfected patients. *Journal of Infection*, **54**: 173-179.

RANTALA, M. & DE LAAR, M.J.W.V., 2008. Surveillance and Epidemiology of Hepatitis B and C in Europe – a review. *Eurosurveillance*, **13**: 4-6.

ROSS, R.S., VERBEECK, J., VIAZOV, S., LEMEY, P., VAN RANST, M. & ROGGENDORF, M., 2008. Evidence for a Complex Mosaic Genome Pattern in a Full-Length Hepatitis C Virus Sequence. *Evolutionary Bioinformatics online*, **4**: 249-254.

ROULOT, D., BOURCIER, V., GRANDO, V., DENY, P., BAAZIA, Y., FONTAINE, H., BAILLY, F., CASTERA, L., DE LEDINGHEN, V., MARCELLIN, P., POUPON, R., BOURLIÈRE, M., ZARSKI, J.P., ROUDOT-THORAVALL, F. & THE OBSERVATIONAL VHC4 STUDY GROUP, 2007. Epidemiological characteristics and response to peginterferon plus ribavirina treatment of hepatitis C virus genotype 4 infection. *Journal of Viral Hepatitis*, **14**: 460-467.

SABAHI, A., 2009. Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle. *Virology Journal*, **6**: 117.

SALEMI, M. & VANDAMME, A.M., 2002. Hepatitis C Virus Evolutionary Patterns Studied Through Analysis of Full-Genome Sequences. *Journal of Molecular evolution*, **54**: 62-70.

SAMINI-RAD, K., NATEGH, R., MALEKZADEH, R., NORDER, H. & MAGNIUS, L., 2004. Molecular Epidemiology of Hepatitis C Virus in Iran as Reflected by Phylogenetic Analysis of the NS5B Region. *Journal of Medical Virology*, **74**: 246-252.

SÁNCHEZ-QUIJANO, A., ABAD, M.A., TORRONTERAS, R., REY, C., PINEDA, J.A., LEAL, M., MACIAS, J. & LISSEN, E., 1997. Unexpected high prevalence of hepatitis C virus genotype 4 in Southern Spain. *Journal of Hepatology*, **27**: 25-29.

SANDRES-SAUNÉ, K., DENY, P., PASQUIER, C., THIBAUT, V., DUVERLIE, G. & IZOPET, J., 2003. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *Journal of Virological Methods*, **109**: 187-193.

SENTANDREU, V., JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ, N., TORRES-PUENTE, M., BRACHO, M.A., VALERO, A., GOSALBES, M.J., ORTEGA, E., MOYA, A. & GONZÁLEZ-CANDELAS, F., 2008. Evidence of Recombination in Inpatient Populations of Hepatitis C Virus. *PLoS ONE*, **3**: e3239.

SHEPARD, C.W., FINELLI, L. & ALTER, M.J., 2005. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Infection Disease*, **5**: 558-567.

SHERMAN, K.E., O'BRIEN, J., GUTIERREZ, A.G., HARRISON, S., URDEA, M., NEUWALD, P. & WILBER, J., 1993. Quantitative Evaluation of Hepatitis C Virus RNA in Patients with Concurrent Human Immunodeficiency Virus Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**: 2679-2682.

SIMMONDS, P., 2004. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *Journal of General Virology*, **85**: 3173-3188.

SIMMONDS, P., BUKH, J., COMBET, C., DELÉAGE, G., ENOMOTO, N., FEINSTONE, S., HALFON, P., INCHAUSPÉ, G., KUIKEN, C., MAERTENS, G., MIZOKAMI, M., MURPHY, D.G., OKAMOTO, H., PAWLOTSKY, J.M., PENIN, F., SABLON, E., SHIN-I, T, STUYVER, L.J., THIEL, H.J., VIAZOV, S., WEINER, A.J. & WIDELL, A., 2005. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*, **42**: 962-973.

SIMMONDS, P., 2001. The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *Journal of General Virology*, **82**: 693-712.

SINGAL, A.K. & ANAND, B.S., 2009. Management of Hepatitis C virus infection in HIV/HCV co-infected patients: Clinical review. *World Journal of Gastroenterology*, **15**: 3713-3724.

SORIANO, V., RAMOS, B., NUNEZ, M., BARREIRO, P., MAIDA, I., GARCIA-SAMANIEGO, J. & GONZALEZ-LAHOZ, J., 2005. Failure of hepatitis C therapy in HIV-coinfected drug users is not due to a shift in hepatitis C virus genotype. *Journal of Infectious Diseases*, **192**: 1245- 1248.

SULKOWSKI, M.S., 2008. Viral hepatitis and HIV coinfection. *Journal of Hepatology*, **48**: 353-367.

SULKOWSKI, M.S. & THOMAS, D.L., 2003. Hepatitis C in the HIV-Infected Person. *Annals of Internal Medicine*, **138**: 197-207.

SUZUKI, T., ISHII, K., AIZAKI, H. & WAKITA, T., 2007. Hepatitis C viral life cycle. *Advance Drug Delivery Reviews*, **59**: 1200-1212.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, **24**: 1596-1599.

THOMAS, D.L., 2008. The Challenge of Hepatitis C in the HIV-Infected Person. *Annual Review of Medicine*, **59**: 473-485.

THOMAS, D.L., ASTEMBORSKI, J., VLAHOV, D., STRATHDEE, S.A., RAY, S.C., NELSON, K.E., GALAI, N., NOLT, K.R., LAEYENDECKER, O. & TODD, J.A., 2000. Determinants of the Quantity of Hepatitis C Virus RNA. *Journal of Infectious Diseases*, **181**: 844-851.

TIMM, J. & ROGGENDORF, M., 2007. Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy. *World Journal of Gastroenterology*, **13**: 4808-4817.

TRÉPO, C., ZOULIM, F. & PRADAT, P., 1999. Viral hepatitis. *Current Opinion in Infectious diseases*, **12**: 481-490.

VAN ASTEN, L., VERHAEST, I., LAMZIRA, S., HERNANDEZ-AGUADO, I., ZANGERLE, R., BOUFASSA, F., REZZA, G., BROES, B., ROBERTSON, J.R., BRETTLE, R.P., MCMENAMIN, J., PRINS, M., COCHRANE, A., SIMMONDS, P.,

COUTINHO, R.A. & BRUISTEN, S., 2004. Spread of Hepatitis C Virus among European Injection Drug Users Infected with HIV: A Phylogenetic Analysis. *The Journal of Infectious Diseases*, **189**: 292-302.

VERBEECK, J., MAES, P., LEMEY, P., PYBUS, O.G., WOLLANTS, E., SONG, E., NEVENS, F., FEVERY, J., DELPORT, W., DER MERWE, S.V. & RANST, M.V., 2006. Investigating the Origin and Spread of Hepatitis C Virus Genotype 5a. *Journal of Virology*, **80**: 4220-4226.

VERUCCHI, G., MANFREDI, R. & CHIODO, F., 2004. Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Coinfection: Epidemiology, Natural History, Therapeutic Options and Clinical Management. *Infection*, **33**: 33-46.

VIEIRA, A.M., FREIRE, R., MANGUALDE, J., PINHO, C., FERNANDES, V., ALVES, A.L., AUGUSTO, F., LOBATO, C. & OLIVEIRA, A.P., 2007. Hepatite C – Casuística da Consulta de Hepatologia de um Hospital Distrital. *Jornal Português de Gastroenterologia*, **14**: 134-140.

WASLEY, A. & ALTER, M.J., 2000. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Seminars in Liver Disease*, **20**: 1-16.

WEINSTOCK, D.M., MERRICK, S., MALAK, S.A., JACOBS, J. & SEPKOWITZ, K.A., 1999. Hepatitis C in a urban population infected with human immunodeficiency virus. *AIDS*, **13**: 2593-2595.

ANEXOS

Anexo I – Dados epidemiológicos das amostras analisadas, encontrando-se indicado o número de identificação da amostra, após o prefixo R, bem como a nacionalidade, o sexo e a idade. PT cauc – Portuguesa caucasiana; BR cauc – Brasileiro caucasiano; CV negra – Cabo verdiana negra; MZ negra – Moçambicana negra; AG cauc – Angolana caucasiano; AG negro – Angolano negro; AG misto – Angolano misto; ST misto – São Tomé misto; G negro – Guineense negro; M – masculino; F – feminino.

Nº amostra	Nacionalidade	Sexo	Idade
R1	P Tcauc	F	30
R2	PT cauc	M	40
R3	BR cauc	F	37
R4	PT cauc	M	38
R5	PT cauc	F	27
R6	CV negra	M	31
R7	PT cauc	M	37
R8	PT cauc	M	27
R9	PT cauc	F	23
R10	PT cauc	F	36
R11	PT cauc	M	30
R12	PT cauc	F	37
R13	PT cauc	M	34
R14	PT cauc	F	20
R15	PT cauc	M	34
R16	PT cauc	M	25
R17	PT cauc	M	21
R18	PT cauc	M	25
R19	PT cauc	M	31
R20	PT cauc	M	40
R21	PT cauc	F	28
R22	PT cauc	F	30
R23	PT cauc	M	35
R24	PT cauc	M	26
R25	PT cauc	M	32
R26	PT cauc	F	27
R27	PT cauc	M	36
R28	PT cauc	M	25
R29	PT cauc	F	26
R30	PT cauc	M	30
R31	PT cauc	M	30
R32	PT cauc	M	24
R33	PT cauc	M	29
R34	PT cauc	M	35
R35	PT cauc	M	42

Nº amostra	Nacionalidade	Sexo	Idade
R36	PT cauc	M	23
R37	PT cauc	F	23
R38	PT cauc	M	46
R40	PT cauc	M	29
R41	PT cauc	M	45
R42	PT cauc	M	33
R43	PT cauc	F	27
R44	PT cauc	M	26
R46	PT cauc	M	27
R47	PT cauc	F	34
R49	PT cauc	F	26
R50	PT cauc	F	37
R53	CV cauc	M	21
R54	MZ negra	M	30
R55	MZ negra	M	32
R56	AG cauc	M	30
R57	AG misto	M	31
R58	AG negro	M	32
R59	CV negra	F	39
R60	AG mista	F	25
R61	ST mista	F	34
R63	PT cauc	M	49
R64	PT cauc	M	33
R65	PT cauc	M	22
R66	PT cauc	F	22
R67	PT cauc	M	43
R68	PT cauc	M	31
R69	PT cauc	F	29
R70	G negra	M	35
R71	PT cauc	M	33
R72	PT cauc	F	32
