

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Prevalência da infeção ativa por vírus da hepatite C em  
indivíduos integrados num programa de metadona da cidade  
de Lisboa**

Catarina Filipe Parreira Balsa

**Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:

Inv.<sup>a</sup> Doutora Elizabeth Pádua,

Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge

Prof.<sup>a</sup> Doutora Deodália Dias,

Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma me apoiaram, incentivaram e contribuíram para a realização deste estudo, sem o apoio das quais não teria sido possível:

À Doutora Elizabeth Pádua, pela possibilidade de realizar este trabalho, pela sua orientação, pelos conhecimentos científicos transmitidos, e principalmente pelo seu apoio, disponibilidade e motivação incondicionais durante todo o estágio.

À professora Doutora Deodália, por ter aceite ser minha orientadora através da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, pelo seus conselhos, pelo seu apoio e pela disponibilidade para esclarecer qualquer dúvida.

À Ivone Água Doce e à Catarina Almeida, por toda a ajuda no laboratório, pela disponibilidade e apoio constante.

À Doutora Helena Cortes Martins, pela ajuda na construção da base de dados para tratamento estatístico e pela disponibilidade em esclarecer qualquer dúvida.

À Sara pela amizade, entreajuda, bons momentos e companhia no laboratório.

À equipa do projeto em que o presente estudo se encontra integrado, nomeadamente aos elementos da Associação Ares do Pinhal, Drs. Rodrigo Coutinho, Cláudia Pereira, Elsa Belo e Paulo Lopes, ao Enfermeiro Rui Silva, e ainda, aos clínicos do Hospital Sto. António dos Capuchos, Drs. Mário Silva e Fernando Calinas.

Ao Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge, pela oportunidade que me foi concedida para desenvolver a minha tese de mestrado, por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da mesma e por permitir a minha integração num centro de investigação de elevada qualidade. Um especial agradecimento à Unidade de Tecnologia e Inovação pela ajuda no processo de sequenciação.

Ao Pedro, por todas as lamurias e dúvidas que teve de aturar da minha parte durante toda a escrita da tese, pelos bons momentos juntos e pelo seu apoio e carinho.

Aos meus amigos, em especial, à Margarida e ao Diogo, pelos momentos de descontração sem os quais este trabalho teria sido muito mais difícil de realizar e à Joana, não só pelos bons momentos mas também pela compreensão, ajuda e incentivo durante toda a escrita da tese.

A toda a minha família que contribuiu para me tornar a pessoa que sou hoje, pela sua paciência, amor e dedicação.

## **RESUMO**

O vírus da hepatite C (VHC) afeta cerca de 150 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a principal causa de doença hepática. A infecção está principalmente associada a populações com comportamentos de risco no consumo de drogas ilícitas.

O VHC apresenta uma elevada diversidade genética, representada pelos múltiplos genótipos e subtipos do VHC com diferentes padrões de distribuição epidemiológica no mundo. Os diferentes genótipos influenciam a progressão da doença e a resposta à terapêutica, tornando-se essencial a classificação do VHC antes de se iniciar o tratamento.

O presente estudo, englobado num projeto mais abrangente, teve como principais objetivos a caracterização da hepatite C num grupo de utilizadores de drogas ilícitas, quer através de dados recolhidos num questionário (demográficos, educacionais, socioeconómicos, epidemiológicos e clínicos), quer pela determinação da prevalência da infecção ativa com identificação dos subtipos do VHC.

Neste trabalho foram analisados 449 plasmas de indivíduos com anticorpos para o VHC. Realizou-se a extração de RNA viral, seguindo-se a síntese de cDNA, a amplificação e sequenciação da região NS5B. Nas amostras em que se verificou ser necessário esclarecer a classificação do VHC, foram também analisadas as regiões NS3 e C/E1. Efetuou-se uma análise das sequências por BLAST, de forma a identificar os subtipos de VHC na população. Em 87 amostras selecionadas foram construídas sequências de consenso para posterior análise filogenética.

A população apresentou idade média de 44 anos, a maioria homens portugueses de baixo nível de escolaridade (78,6% com frequência inferior ao 3º ciclo do ensino básico), estando 73,5% dos indivíduos desempregados. Os consumos de drogas ilícitas são na maioria por via endovenosa com comportamento de risco de partilha de material de injeção (apenas 18,7% consumia drogas exclusivamente por via inalada ou fumada). Dos indivíduos estudados, 68,4% apresentava infecção ativa pelo VHC, caracterizada por alteração dos níveis de ALT (mediana 42U/L). A frequência encontrada para os diversos subtipos na população foi a seguinte: 44,6% de subtipo 1a, 29,3% de subtipo 3a, 10,8% de subtipo 1b, 7,5% de pelo subtipo 4a, 7,2% de subtipo 4d, 0,3% de subtipo 2ª. Foi ainda identificado um caso de infecção pelo RF\_2k/1b. Verificou-se que, cerca de metade dos indivíduos conheceram a sua situação de serologia positiva para o VHC, entre 2001 e 2010, no entanto, 81,1% não fez tratamento para a hepatite C.

Os resultados obtidos neste estudo revelam a necessidade da implementar uma estratégia que proporcione aos indivíduos um acesso facilitado ao tratamento, que resultará na maior adesão e melhoria individual do estado clínico dos indivíduos, e deste modo, evitar a disseminação do vírus na comunidade. Reforçar os programas de educação para a saúde sobre hepatite C e prevenção da infecção são também cruciais nesta população com comportamentos de risco e que não adere aos serviços de saúde convencionais.

**Palavras-chave:** Vírus da Hepatite C (VHC); Subtipagem; Lisboa; Utilizadores de Drogas Ilícitas (UDI)

## **ABSTRACT**

The hepatitis C virus infection (HCV) is a worldwide disease that affects approximately 150 million people. The infection is mainly associated with populations with high risk behaviours through illicit drugs consumption.

This virus has a high genetic diversity, represented by the multiple genotypes and subtypes distributed worldwide. Additionally, the genotypes influence the disease progression and response to treatment, making it essential to identify the different subtypes prior to the beginning of the treatment.

This study, incorporated in a larger project, aimed to characterize a population of illicit drug users (IDU), through data collected from a questionnaire (demographic, educational, socio-economic, epidemiological and clinical), and by analysing the prevalence of active infection and determining the HCV subtypes.

In this study 449 plasma samples from individuals with presence of HCV antibodies were analysed. The samples were subjected to RNA extraction, cDNA syntheses, amplification of the NS5B region and sequencing. In the samples where the confirmation of the HCV classification was necessary the regions NS3 and C/E1 were also analysed. Afterwards, it was performed a BLAST sequence analysis, in order to identify the HCV subtypes in the population and, in 87 selected samples, were constructed consensus sequences for subsequent phylogenetic analysis.

The studied population had a mean age of 44 years old, most of the individuals were Portuguese men with a low educational level (78,6% with less than the 3<sup>rd</sup> cycle of basic education) and 73,5 % of them were unemployed. The consumption of illicit drugs was mostly intravenously, with risk behaviours associated with sharing the drug consumption material (only 18,7% consumed drugs exclusively by inhaled or smoked via). 68.4% of the studied patients had active HCV infection, characterized by changes in ALT levels (median 42U/L). The frequency of the several subtypes found in the population were as follow: 44,6% of subtype 1a, 29,3% of subtype 3a, 10,8% of subtype 1b, 7,5% of subtype 4a, 7,2% of subtype 4d, 0,3% of subtype 2a, and also a case of infection by RF\_2k / 1b. Between 2001 and 2010, about half of the individuals knew their positive serological situation towards the HCV, however, 81,1% did not find treatment to this disease.

The obtained results in this study show the need to implement a strategy that will provide individuals easier access to treatment, which will result in a greater adhesion and individual improvement of their clinical status, subsequently preventing the spread of the virus in the community. Strengthen education programs for health on hepatitis C and preventing the infection are also crucial steps in this population with risk behaviours and that does not seek conventional health services

**Key words:** Hepatitis C virus; Subtyping; Lisbon; Illicit Drug Users (IDU)

## **ÍNDICE GERAL**

Agradecimentos .....	I
Resumo .....	II
Abstract .....	III
Índice.....	IV
Índice de figuras .....	VI
Índice de tabelas .....	VIII
Lista de abreviaturas e siglas .....	IX
<b>1.Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Vírus da hepatite C.....	2
1.1.1 Classificação, morfologia e organização genómica .....	2
1.1.2 Ciclo de replicação .....	4
1.1.3 Modos de transmissão .....	5
1.1.4 Infecção e progressão para a doença crónica .....	6
1.2 Diversidade Genética do VHC .....	7
1.1.1 Genótipos, subtipos e recombinantes .....	7
1.1.2 Seroprevalência e perfil molecular de distribuição do VHC no mundo .....	8
1.3 Diagnóstico da infecção e genotipagem do VHC .....	10
1.3.1 Testes sorológicos .....	10
1.3.2 Testes moleculares para a deteção e/ou quantificação do RNA viral.....	11
1.3.3 Genotipagem do VHC .....	11
1.4 Tratamento da infecção crónica .....	11
1.4.1 A terapia padrão do passado.....	11
1.4.2 Os antivirais no presente .....	12
1.4.3 Mutações de resistência aos inibidores da polimerase NS5B.....	12
<b>2.Enquadramento e Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>3.Material e Métodos.....</b>	<b>16</b>
3.1 População alvo .....	17
3.2 Desenho do estudo.....	17
3.3 Extração do RNA viral .....	19
3.4 Síntese de cDNA .....	19
3.5 Amplificação de fragmentos genómicos do VHC .....	20
3.5.1 Caraterização dos primers para a região NS5B .....	21

3.5.2	Caraterização dos primers para as regiões NS3 e C/E1.....	21
3.5.3	Condições das reações de amplificação .....	22
3.6	Purificação dos produtos amplificados.....	24
3.7	Reação de sequenciação .....	25
3.8	Análise bioinformática das sequências.....	26
3.8.1	Construção das sequências de consenso.....	26
3.8.2	Estimativa filogenética.....	26
3.8.3	Análise de mutações de resistência .....	26
3.9	Análise estatística.....	26
<b>4.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>27</b>
4.1	Caracterização da População estudada.....	28
4.1.1	Análise demográfica, educacional e socioeconómica .....	28
4.1.2	Conhecimento do ano de diagnóstico e percepção dos indivíduos sobre a hepatite C....	29
4.1.3	Ano do início do consumo de drogas e tipos de comportamento de risco .....	29
4.1.4	Avaliação dos níveis do marcador hepático ALT .....	30
4.2	Amplificação das regiões NS5B, NS3 e C/E1 do VHC .....	30
4.3	Sequenciação das amostras e classificação das sequências NS5B por BLAST .....	31
4.4	Classificação filogenética de sequências NS5B .....	32
4.5	Identificação de mutações de resistência na região NS5B .....	40
4.6	Frequência dos subtipos do VHC na população estudada.....	40
4.7	Análise da relação entre os níveis de ALT e a presença ou ausência de RNA.....	41
4.8	Análise da relação entre os valores de ALT e os subtipos do VHC.....	42
4.9	Análise da relação entre o conhecimento dos indivíduos sobre a sua situação clínica e a presença ou ausência de RNA viral.....	42
4.10	Análise da relação entre tratamento e a presença de RNA do VHC .....	42
4.11	Análise da relação entre a via de consumo de drogas e a presença de RNA.....	43
4.12	Análise da relação entre a via de consumo de drogas e os subtipos de VHC.....	43
4.13	Análise da relação entre o nível de escolaridade e a percepção dos indivíduos sobre a gravidade da hepatite C.....	43
4.14	Análise da distribuição dos subtipos do VHC de acordo com o ano de diagnóstico.....	44
<b>5.</b>	<b>Discussão</b> .....	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>52</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>54</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>62</b>

## Índice de Figuras

### 1.INTRODUÇÃO

Figura 1.1	Representação esquemática da estrutura do vírus da hepatite C .....	2
Figura 1.2	Esquema representativo do genoma de RNA do VHC, tradução na proliproteína, processamento nas proteínas estruturais e não estruturais e suas principais funções.....	3
Figura 1.3	Ciclo de replicação do VHC.....	4
Figura 1.4	Distribuição mundial dos genótipos do VHC .....	9
Figura 1.5	Frequência dos genótipos do VHC diagnosticados no INSA entre 2009 e 2014.....	10

### 3.MATERIAL E MÉTODOS

Figura	3.1	Esquema representativo da metodologia seguida no desenvolvimento do estudo.....	18
--------	-----	---	----

### 4.RESULTADOS

Figura 4.1	Distribuição dos indivíduos por intervalos de tempo de acordo com o ano do início do consumo de drogas.....	30
Figura 4.2	Produtos de PCR amplificados da região NS5B, visualizados em gel de agarose.....	30
Figura 4.3	Produtos de PCR obtidos para a amostra TX178 correspondentes à amplificação da região NS3 (A) e região C/E1 (B), visualizados em gel de agarose.....	31
Figura 4.4	Distribuição dos resultados positivos e negativos de RNA do VHC na população estudada.....	31
Figura 4.5	Organigrama do trabalho seguido com a caracterização das amostras selecionadas para a filogenia.....	32
Figura 4.6	Árvore filogenética da região NS5B do VHC ilustrando as relações filogenéticas entre as sequências em estudo com as sequências de referência representativas dos diferentes subtipos do VHC.....	34
Figura 4.7	Árvore filogenética da região NS5B do VHC ilustrando as relações filogenéticas entre as sequências em estudo com as sequências de referência representativas dos diferentes subtipos do VHC.....	35
Figura 4.8	Árvore filogenética construída para a região NS3 do VHC mostrando as relações filogenéticas entre a sequência TX 178 e as sequências de referência RF 2k/1b .....	37
Figura 4.9	Árvore filogenética construída para a região C/E1 do VHC, mostrando as relações filogenéticas entre a sequência TX 178 e as sequências de referência 2k/1b.....	39

Figura 4.10	Alinhamento parcial de sequências aminoacídicas da região NS5B do VHC contendo as posições de interesse analisadas cuja alteração aminoacídica pode conduzir a resistência aos inibidores da polimerase.....	40
Figura 4.11	Frequência dos subtipos do VHC identificados na população com infecção ativa.....	41
Figura 4.12	Distribuição dos subtipos do VHC por intervalo de tempo, atendendo ao ano de diagnóstico da infecção.....	45
Figura 4.13	Distribuição dos genótipos por intervalo de tempo, atendendo ao ano de diagnóstico da infecção pelo VHC.....	45

## Índice de Tabelas

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Tabela 3.1	Condições de síntese do cDNA com o <i>kit "RT-plus"</i> .....	20
Tabela 3.2	Condições de síntese de cDNA com o <i>kit "High capacity cDNA"</i> .....	20
Tabela 3.3	Sequência dos primers utilizados na amplificação da região NS5B do VHC..	21
Tabela 3.4	Primers utilizados na amplificação das regiões NS3 e C/E1 do VHC. ....	21
Tabela 3.5	Programa de amplificação usado na primeira reação de amplificação da região NS5B do VHC.....	22
Tabela 3.6	Programa de amplificação utilizado na segunda reação de amplificação para a região NS5B do VHC.....	22
Tabela 3.7	Programa usado na primeira reação de amplificação das regiões NS3 e C/E1.....	23
Tabela 3.8	Mistura de reação utilizada na segunda reação de amplificação para a região NS3 (A) e para a região C/E1 (B) do VHC.....	23
Tabela 3.9	Programa de amplificação usado na segunda reação de amplificação para as regiões NS3 e C/E1.....	23
Tabela 3.10	Programa da reação de sequenciação.....	25

### 4. RESULTADOS

Tabela 4.1	Nível de escolaridade da população em estudo.....	28
Tabela 4.2	Distribuição dos indivíduos que referiram o ano de diagnóstico da infecção VHC por intervalos de tempo estabelecidos.....	29
Tabela 4.3	Resultados da análise por BLAST das sequências NS5B do VHC.....	32
Tabela 4.4	Comparação dos resultados de BLAST e Filogenia nas 87 amostras selecionadas.....	36
Tabela 4.5	Variação dos níveis de ALT na população total e agrupada (RNA positivo e RNA negativo).....	41
Tabela 4.6	Associação dos valores de ALT com os subtipos do VHC.....	42
Tabela 4.7	Relação entre a distribuição dos subtipos do VHC e a via de consumo das drogas ilícitas.....	43
Tabela 4.8	Análise do nível de escolaridade e a percepção dos indivíduos sobre a gravidade da hepatite C.....	44

## Lista de siglas e abreviaturas

AAD	Antivirais de ação direta
ALT	Alanina Aminotransferase
bDNA	Do inglês, <i>Branched DNA Assay</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	Desoxirribonucleico 5'-trifosfatados
EIA	Ensaio imunoenzimático, do inglês <i>Enzyme Immunoassays</i>
E1	Proteína do invólucro 1 do vírus da hepatite C
E2	Proteína do invólucro 2 do vírus da hepatite C
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IRES	Local interno de entrada do ribossoma, do inglês <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
KCL	Cloreto de Potássio
min	Minuto
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MEGA	Do inglês, <i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanómetro, equivalente a $1,0 \times 10^{-9}$ metros
ORF	Grelha de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de bases
PBMC	Célula mononuclear sanguínea periférica, do inglês <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	Reacção em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Peg-IFN $\alpha$	Interferão alfa-peguilado, do inglês <i>Pegylated Interferon Alpha</i>
PSBLE	Programa de substituição de baixo limiar exigência
RBV	Ribavirina

RdRp	Polimerase de RNA dependente de RNA, do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa, do inglês <i>Reverse Transcription</i>
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
seg	Segundo
TAE	Tampão Tris-acetato EDTA
Tris-HCL	Tris Hidrocloroeto
UDI	Utilizadores de Drogas Ilícitas
UTR	Região não traduzida, do inglês <i>Untranslated Region</i>
U/L	Unidades por Litro
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
VHC	Vírus da Hepatite C
VLDL/LDL	Do inglês, <i>very low density lipoprotein/low density lipoprotein</i>
°C	Graus Celsius
μl	Micro litro, equivalente a 10 <sup>-6</sup> litros
μM	Micromolar, equivalente a 10 <sup>-3</sup> mol/m <sup>3</sup>

# **1.Introdução**

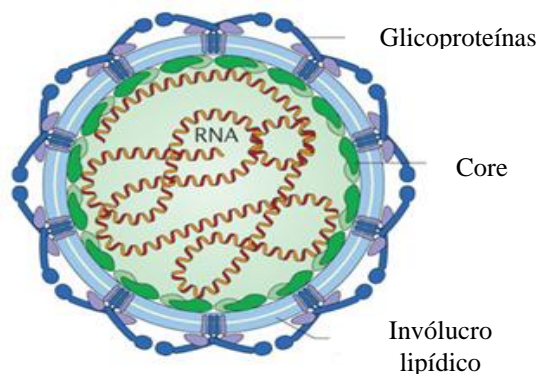
# 1. Introdução

## 1.1 Vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C foi descoberto em 1989 (Choo *et al*, 1989). Antes da sua identificação, a hepatite C era designada de não-A e não-B, verificando-se a sua ocorrência em transfusionados e utilizadores de drogas injetáveis (Westbrook e Dusheiko, 2014). Desde então, a infeção pelo VHC tem sido reconhecida como uma das principais causas de doença hepática, caracterizada por uma elevada taxa de propensão para a cronicidade, observada tanto no Homem como em chimpanzés (Kim e Kyong-Mi, 2013 e Wandeler *et al*, 2015).

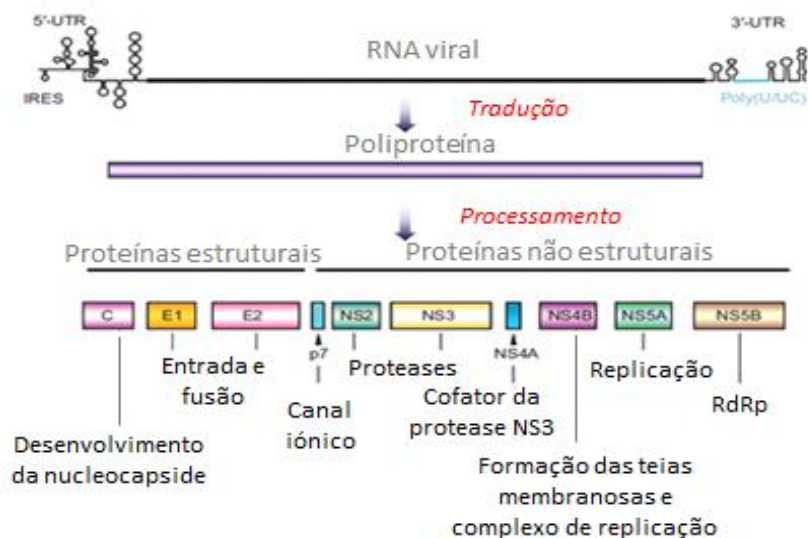
### 1.1.1 Classificação, morfologia e organização genómica

O VHC pertence à família *Flaviviridae* e encontra-se classificado no género hepacivirus (ICTV, 2015 - <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>). Morfologicamente, apresenta-se como uma partícula de cerca de 30-60nm, com uma nucleocapside proteica icosaédrica, contendo o genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva, com aproximadamente 9600 nucleótidos. Rodeando esta cápside, encontra-se um invólucro lipídico onde se localizam duas glicoproteínas estruturais, a E1 e a E2, as quais são altamente variáveis (fig. 1.1) (Echeverría *et al*, 2015 e Ghasemi *et al*, 2015).



**Figura 1.1** - Representação esquemática da estrutura do vírus da hepatite C (adaptado de Lindenbac e Rice, 2013)

O genoma do VHC contém uma única *Open Reading Frame* (ORF), que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos, a qual, depois de clivada pelas proteases virais e celulares do hospedeiro, origina dez proteínas virais (três estruturais e sete não-estruturais) (fig. 1.2). As extremidades 5'UTR e 3'UTR do genoma do VHC não são traduzidas. No entanto, afiguram-se como extremamente importantes no ciclo replicativo do VHC (Echeverría *et al*, 2015 e Gu e Rice, 2013).



**Figura 1. 2** Esquema representativo do genoma de RNA do VHC, tradução na poliproteína, processamento nas proteínas estruturais e não estruturais e suas principais funções (adaptado de Wong e Chen, 2016).

A região 5'UTR contém cerca de 341 nucleótidos, sendo a região mais conservada do genoma do VHC. Na verdade, funciona como um local de ligação interno ao ribossoma (IRES), permitindo que este último se ligue ao codão inicial da ORF e se inicie a tradução (Ghasemi *et al*, 2015 e Li e Lo, 2015). A extremidade 3'UTR é constituída por três elementos: uma pequena região variável, seguida de uma sequência polyU/UC e de uma região altamente conservada, com cerca de 98 nucleótidos (X-RNA). A região polyU/UC e o X-RNA são importantes para a formação do complexo de replicação e, conseqüentemente, para a replicação do VHC (Kalinina e Dmitrievc, 2015).

As proteínas estruturais (core, E1 e E2) são constituintes do virião (Bartenschlager *et al*, 2011). A proteína core participa na formação da nucleocapside e na construção do invólucro viral, tendo já sido implicada na patogenicidade, no progresso da infecção crônica e na regulação da resposta imunitária. As proteínas do invólucro E1 e E2 desempenham um papel importante na entrada do vírus nas células, interagindo com o receptor CD81 nos hepatócitos. A variabilidade destas proteínas permite a evasão do vírus ao sistema imunitário, facilitando o desenvolvimento da infecção crônica (Ashfaq *et al*, 2011; Kalinina e Dmitrievc, 2015 e Ghasemi *et al*, 2015).

As proteínas não-estruturais P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B interagem umas com as outras e contribuem para a replicação e patogenicidade do VHC (Bartenschlager *et al*, 2011). Estas proteínas apresentam múltiplas funções (Kalinina e Dmitrievc, 2015; Li e Lo, 2015 e Ghasemi *et al*, 2015), das quais se podem destacar as seguintes:

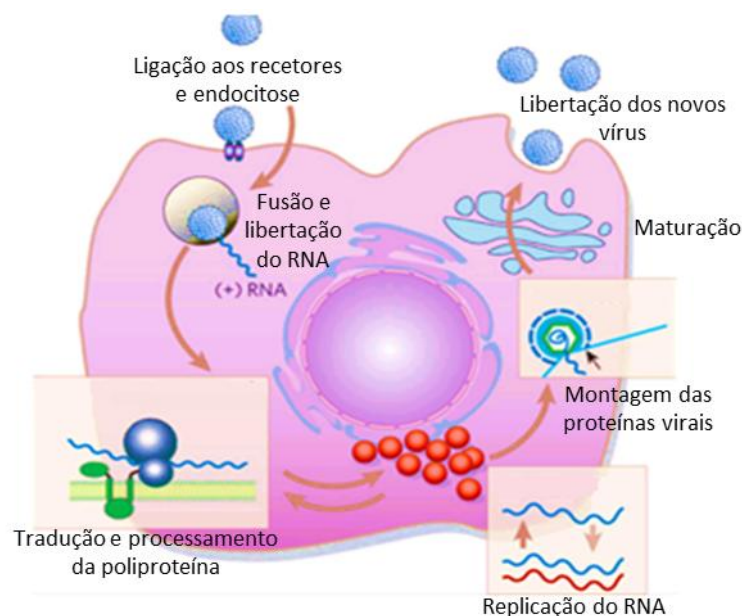
- P7 – forma os canais iônicos que são considerados essenciais na formação, libertação e produção de novos vírus;
- NS2 – é uma protease transmembranar que interage com proteínas estruturais e não-estruturais, regulando a montagem da partícula viral;
- NS3 – é uma proteína multifuncional, que opera tanto como protease como helicase e interage com a NS4A, sendo indispensável para a replicação do vírus;
- NS4A – interage na formação do complexo de replicação, na patogenicidade e na regulação da proteína NS3;

- NS4B – é responsável pela formação das teias membranosas essenciais para a replicação, com capacidade de recrutar outras proteínas não-estruturais para a formação do complexo de replicação;
- NS5A –liga-se à NS5B, regulando a sua atividade de RNA polimerase;
- NS5B - é a RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp), sendo responsável pela síntese de novos RNA.

### 1.1.2 Ciclo de replicação

O VHC é um vírus não lítico, que usa as moléculas e vários mecanismos da célula hospedeira para a realização do seu ciclo replicativo. O vírus entra e prolifera dentro das células que infeta, sendo depois libertado para o espaço extracelular sem que aparentemente cause qualquer dano na integridade das células do hospedeiro (Gerold e Pietschmann, 2014). O seu ciclo é inteiramente citoplasmático e o vírus possui especial tropismo para infetar os hepatócitos. No entanto, o VHC também pode infetar células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) e células do sistema nervoso central (Carcamo e Nguyen, 2012, Bain *et al*, 2001 e Kalinina e Dmitrievc,2015).

O ciclo replicativo do VHC pode ser dividido em cinco etapas: (1) a entrada, (2) o processamento da poliproteína, (3) a replicação, (4) a montagem da partícula viral e (5) a libertação de novos vírus (fig. 1.3). Cada um destes passos requer interações específicas com as células do hospedeiro, podendo levar ao estabelecimento da infeção crónica (Zeisel *et al*, 2015).



**Figura 1.3** - Ciclo de replicação do VHC (adaptado de Lindenbac e Rice, 2005)

Durante a infeção primária, as partículas virais são transportadas pela corrente sanguínea e conduzidas até aos hepatócitos, onde entram em contacto direto com a sua superfície (Dubuissom e Cosset, 2014). A entrada da partícula viral ocorre por endocitose, sendo mediada por recetores e envolvendo múltiplas moléculas da superfície celular, tais como o scavenger receptor class B type, CD81, as proteínas claudina-1, ocludina e LDR (Gerold e Pietschmann, 2014; Paul *et al*, 2014 e Grassi *et al*, 2016).

Após a ligação do vírus aos recetores celulares, ocorre a internalização por endocitose e fusão do seu invólucro com a membrana endossomal. De seguida, a nucleocapside liberta o RNA no citoplasma (Gerold e Pietschmann, 2014).

A tradução do RNA viral ocorre no retículo endoplasmático rugoso, sendo iniciada na região IRES da extremidade 5'UTR e dando origem à poliproteína viral. Esta última é depois clivada pelas proteases virais e da célula hospedeira, de forma a gerar todas as proteínas constituintes do VHC. Tal processo ocorre num complexo membranar associado ao RE e induzido pelo VHC com amplificação do RNA viral de cadeia negativa, a qual servirá de intermediário para a síntese de múltiplas cadeias de polaridade positiva (Bartenschlager *et al*, 2011; Kim e Kyong-Mi, 2013 e Gerold e Pietschmann, 2014).

Depois da síntese do RNA viral e das proteínas estruturais (E1 E2 e core) dá-se a formação e a montagem dos novos vírus. Inicialmente, o RNA é encapsulado perto de gotículas lipídicas (organelos lipídicos de armazenamento), fundindo-se com o RE de forma a adquirir um invólucro. De seguida, ocorre a maturação no complexo de Golgi, saindo o vírus da célula por exocitose e utilizando a via de síntese das lipoproteínas de baixa densidade VLDL/LDL (*very low density lipoprotein/low density lipoprotein*) (Gerold e Pietschmann, 2014 e Grassi *et al*, 2016). Deste modo, o VHC interage e usa os mecanismos e as vias de síntese da célula para estabelecer uma infeção crónica e produzir viriões infecciosos. O metabolismo dos lípidos da célula desempenha um papel importante no ciclo replicativo do VHC, que usa a produção das lipoproteínas com o intuito de tornar mais eficaz a sua replicação, propagação e persistência da infeção (Grassi *et al*, 2016).

### 1.1.3 Modos de transmissão

Antes de 1990, as principais vias de transmissão do VHC, eram as transfusões sanguíneas, os procedimentos de injeção inseguros e a partilha de material contaminado no consumo de drogas endovenosas. No entanto, a partir de 1992, o rastreio de anticorpos para o VHC em produtos derivados do sangue reduziram drasticamente a transmissão do VHC por via transfusional (El-Shabrawi e Kamal, 2013; Buchanan e Nash, 2015 e Pybus *et al*, 2007). Contudo, nos países em desenvolvimento, a continuação de práticas médicas inseguras, tais como o uso de material de injeção ou cirúrgico não descartável ou indevidamente esterilizado ou, ainda, a falta de obrigatoriedade no rastreio do VHC nas dádivas de sangue, são fatores responsáveis pelo elevado risco de transmissão do VHC (Tovo *et al*, 2016).

De acordo com dados recentes da literatura (Zaltron *et al*, 2012; El-Shabrawi e Kamal, 2013; Khaderi *et al*, 2014; Buchanan e Nash, 2015 e Tovo *et al*, 2016), as novas infeções por VHC ocorrem principalmente devido a:

- a) Partilha de material usado no consumo de drogas ilícitas, principalmente por via endovenosa, mas também inalada. Estas são as vias de transmissão do VHC mais comuns nos países desenvolvidos, correspondendo a cerca de 90% dos novos casos de infeção diagnosticados;
- b) Exposição acidental a seringas contaminadas, estimando-se que corresponda a cerca de 0,2 a 10% dos novos casos de infeção diagnosticados;
- c) Transmissão de mãe para filho, correspondendo a 5% dos novos casos de infeção (risco de transmissão estimado é de 4,3%) sendo a causa mais comum para a doença hepática em crianças;
- d) Transmissão sexual, embora com uma taxa relativamente baixa;

- e) Transmissão através de tatuagens ou acupuntura realizados com material não esterilizado, embora com taxa relativamente baixa.
- f) Acidentes na eficácia da desinfecção de equipamentos, por exemplo, em clínicas de hemodialise;

#### 1.1.4 Infeção e progressão para a doença crónica

A doença associada à infeção pelo VHC, pode variar desde ligeira e de curta duração (infeção resolvida) até grave de longa duração (infeção crónica) (Kim e Kyong-Mi, 2013 e Tsertsvadze *et al*, 2016). A infeção aguda, geralmente assintomática, pode ser resolvida espontaneamente, em 20% a 30% dos casos, ou progredir para uma infeção crónica em 70% a 80% dos casos. Se a infeção crónica não for tratada, os doentes podem desenvolver fibrose hepática, e parte deles evoluir, para cirrose ou para carcinoma hepatocelular (Lavanchy, 2009; Martinello e Matthews, 2015 e Matsuura e Tanaka, 2016). O facto de a infeção aguda não apresentar sintomatologia dificulta o diagnóstico precoce da infeção, adiando o seguimento clínico, e consequentemente, o início do tratamento dos doentes crónicos (Sharma, 2010 e Doyle *et al*, 2012).

Com a progressão da infeção crónica, os níveis de RNA aumentam rapidamente, sendo seguidos por um lento aumento dos marcadores hepáticos. Os valores de ALT (alanina aminotransferase) podem chegar a ser dez vezes superiores aos valores de referência. (Ascione *et al*, 2007 e Maasoumy e Wedemeyer, 2012). Assim, através da monitorização dos níveis de ALT e do seu aumento é possível verificar se existe o desenvolvimento da doença hepática (Mukherjee *et al*, 2015). No entanto, também é possível que em alguns casos de infeção crónica, os valores dos marcadores hepáticos permaneçam dentro dos limites normais (Ascione *et al*, 2007 e Maasoumy e Wedemeyer, 2012). Os valores de referência deste marcador hepático variam de acordo com o sexo, sendo considerados valores normais até 31 U/L para as mulheres e até 40 U/L para os homens (Clark *et al*, 2003).

Diferentes fatores e condições do hospedeiro – tais como o consumo de álcool, a obesidade, a diabetes, a coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) ou com o vírus da hepatite B – desempenham um papel importante na progressão da doença (Buchanan e Nash, 2015 e Matsuura e Tanaka, 2016).

A infeção crónica pelo VHC apresenta geralmente uma progressão lenta para doença, sendo caracterizada pela presença persistente de RNA viral com inflamação do fígado (Chen e Morgan, 2006 e Westbrook e Dusheiko, 2014). O VHC pode causar danos extra-hepáticos que podem envolver o sistema urinário, respiratório, nervoso, endócrino, ocular, muscular e cardiovascular (Gill *et al*, 2016).

Na verdade, o que pode influenciar naturalmente a eliminação do VHC do organismo é a resposta imunitária do hospedeiro, especialmente através da ação das células T CD8+ e TCD4+. A evasão do VHC às defesas do organismo pode ser conseguida através de mutações no vírus ou através da infeção direta das células dendríticas, que irá impedir a apresentação dos antígenos às células T e o subsequente desencadeamento de uma resposta imunitária eficaz contra o VHC (Kazmierczak *et al*, 2016).

## 1.2 Diversidade Genética do VHC

O vírus da hepatite C é caracterizado por uma elevada variabilidade genética (Simmonds, 2004). No processo de replicação do RNA, são introduzidos erros na síntese da cadeia pela enzima RNA polimerase, produzindo-se um elevado número de variantes virais denominadas quasispecies (Echeverría *et al*, 2015 e Di Lello *et al*, 2015). A população heterogénea de vírus geneticamente relacionados, evolui rapidamente, devido à combinação de diferentes fatores, tais como, o elevado número de viriões produzidos a cada ciclo replicativo (por dia, são produzidos cerca de  $10^{12}$ ), as elevadas taxas de mutação, a seleção e a deriva genética influenciada pela pressão imunitária ou terapêutica (González-Candelas *et al*, 2011 e Di Lello *et al*, 2015).

### 1.1.1 Genótipos, subtipos e recombinantes

O sistema de classificação do VHC, utilizado atualmente, foi proposto por Simmonds *et al*, em 2005. Este assenta na análise filogenética de sequências do genoma obtidas de indivíduos infetados de diferentes áreas geográficas, estando os vírus identificados distribuídos em seis génotipos. Segundo este sistema, pela primeira vez proposto em 1993, os génotipos são designados com números arábicos (1, 2, 3, 4, 5, 6) e os subtipos através de letras minúsculas (a, b, c, etc.) (Simmonds *et al*, 1993). Recentemente identificou-se ainda o génotipo 7 na África central (Chayama e Hayes, 2011).

Os génotipos e subtipos do VHC diferem ao nível das sequências de nucleótidos, respetivamente em 35% e 20%, quando as sequências são comparadas entre si. Observa-se uma maior variabilidade em sequências das regiões E1 e E2 sendo, em contraste, as sequências da região core e 5' UTR das mais conservadas. Apesar desta variabilidade genética, todos os vírus partilham um conjunto idêntico de genes e possuem tamanhos semelhantes (Simmonds, 2004; Messina *et al*, 2015 e Bull *et al*, 2016).

Outro mecanismo associado à variabilidade é a recombinação genética. Diferentes génotipos e subtipos do VHC coexistem em grupos populacionais com comportamentos de risco, existindo a possibilidade de ocorrer infeções mistas no mesmo indivíduo. Nas células infetadas, pode existir colonização por dois genomas diferentes que, aquando da replicação do vírus, pode levar à troca entre os moldes de RNA, e conseqüente formação de variantes com genoma recombinado (Galli e Bukh, 2014 e Simmonds, 2004).

Em 2002, a primeira forma recombinada do VHC, o RF 2k/1b, foi identificada num UDI em São Petersburgo (Kalinina *et al*, 2002). Desde então, outros recombinantes foram descritos na literatura, tanto intergenótipos (2k/1b, 2i/6p, 2b/1b, 2/5, 2b/6w, 3a/1b e 2a/1a) como intra-subtipos (1b/1a, 1a/1c e 4a/4d) (Ramière *et al*, 2014; Morel *et al*, 2010 e Shi *et al*, 2012). A infeção pelo RF 2k/1b parece ser a mais comum entre os recombinantes identificados. Foram já descritos casos de infeção em diversos países, tais como o Uzbequistão e a Geórgia, estando também em circulação na França, na Irlanda e no Chipre (Demetriou *et al*, 2011; González-Candelas *et al*, 2011 e Shi *et al*, 2012). A infeção pelo RF\_2k/1b também já foi identificada em Portugal (Avó *et al*, 2013; Pádua *et al*, 2015 e Silva *et al*, 2015).

Embora a identificação de recombinantes do VHC pareça constituir um evento raramente descrito na literatura, também é provável que a sua frequência esteja sobrestimada. De facto, a

genotipagem do VHC é efetuada com base na análise de regiões genómicas muito conservadas. No entanto, para a identificação de recombinantes torna-se essencial a sequenciação de diferentes regiões genómicas, ou uma análise mais alargada do genoma viral (Jackowiak *et al*, 2015 e Ramière *et al*, 2014).

### 1.1.2 Seroprevalência e perfil molecular de distribuição do VHC no mundo

A hepatite C revelou-se um problema crescente a nível económico, social e de saúde individual e pública (Umer e Iqbal, 2016). Estima-se que cerca de 3% da população mundial esteja infetada pelo VHC, o que significa que cerca de 130 a 150 milhões de pessoas possam estar em risco de desenvolver doença hepática crónica. Estima-se também que cerca de 700 mil doentes crónicos morrem anualmente devido a complicações relacionadas com a hepatite C (Lee *et al*, 2014 e WHO, 2016 - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>).

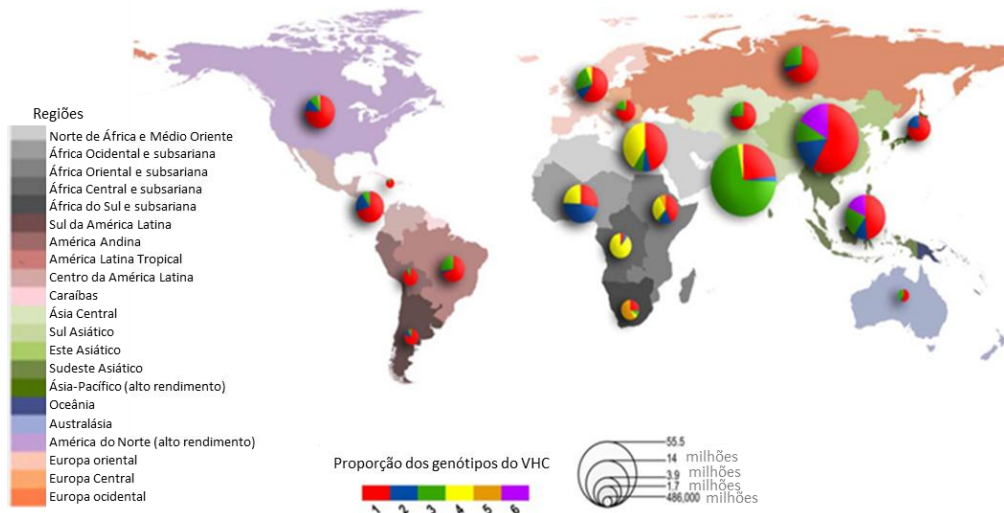
Contrariamente ao que sucede nos países em vias de desenvolvimento, a prevalência do VHC parece ter diminuído nos países desenvolvidos. Este facto está associado não só à maior segurança nas transfusões sanguíneas e procedimentos clínicos, mas também ao impacto das campanhas de sensibilização e prevenção dirigidas a grupos populacionais com comportamentos de risco (Umer e Iqbal, 2016). No entanto, importa realçar que a infeção aguda pelo VHC é assintomática e muitas vezes não diagnosticada podendo, conseqüentemente, ter impacto negativo no conhecimento real da prevalência do VHC. Além disto, na maioria dos estudos epidemiológicos são usadas populações selecionadas, tais como dadores de sangue, os quais, não sendo representativos da população geral, podem levar à subestimação da prevalência deste vírus na população (Kim, 2002).

A prevalência do VHC varia de região para região e entre grupos etários e populacionais. A maior prevalência do VHC é descrita em África e no Médio Oriente, onde pode variar entre 2% a 15%. Prevalências mais baixas são observados na América do Norte, Austrália, Japão e na Europa do Norte e Ocidental (Shepard, 2005 *et al* e Ansaldi *et al*, 2014). O Egipto é o país com prevalência do VHC mais elevada, podendo variar entre 19% em indivíduos com idade inferior a 18 anos e 50% nos de faixa etária superior aos 30 anos (Ansaldi *et al*, 2014).

As diferenças geográficas na distribuição mundial dos genótipos do VHC pode ser influenciada pela via de transmissão e pelos circuitos migratórios das populações infetadas. O genótipo 1 é a infeção mais comum mundialmente, com uma ampla distribuição geográfica e representando cerca de 46% das infeções pelo VHC. O genótipo 3 é a segunda infeção mais frequente a nível mundial e representa cerca de 30% dos casos globais, seguindo-se os genótipos 2, 4 e 6, respetivamente responsáveis por 9,1%, 8,3% e 5,4% dos casos de infeção pelo VHC (Messina *et al*, 2015 e Mohamed *et al*, 2015). No caso do genótipo 6, o subtipo 6e é frequentemente identificado em países asiáticos. Já o subtipo 5a, é a infeção prevalente na África do Sul, onde representa cerca de 40% das infeções por VHC no país (Naamani *et al*, 2013). Por fim, o genótipo 7 é considerado como uma infeção rara, sendo reportados casos esporádicos na África Central (Messina *et al*, 2015 e Bull *et al*, 2016).

A distribuição mundial dos genótipos encontra-se representada na figura 1.4, observando-se que o genótipo 1 predomina na América do Norte, na América Latina e na Europa, o genótipo 3 na Ásia e o genótipo 4 na África e Médio Oriente (Gower *et al*, 2014). O subtipo 1b é o mais comum mundialmente, estando associado a grupos etários mais velhos (Simmonds, 2004 e Gower *et al*, 2014).

O subtipo 2b é encontrado predominantemente em indivíduos de países Mediterrâneos ou no Médio Oriente com infecções pelo VHC mais antigas. A infecção pelo subtipo 4a, encontra-se amplamente distribuído no Médio Oriente (Simmonds, 2004).



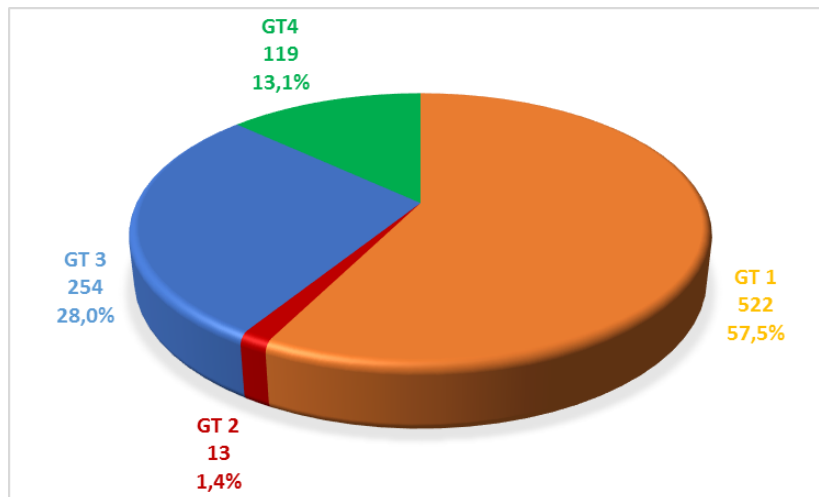
**Figura 1. 4 - Distribuição mundial dos genótipos do VHC (adaptado de Messina et al, 2015).**

A atual distribuição dos subtipos 1a, 1b e 3a pode ser entendida através da sua associação a grupos de utilizadores de drogas endovenosas e transfusionados (Simmonds, 2004).

Na Europa, estudos em utilizadores de drogas injetáveis, revelaram uma prevalência da infecção que variava entre 40 a 80%, sendo este grupo populacional mais afetado pela hepatite C (Giraudon *et al*, 2016).

Num estudo recente realizado à população portuguesa foi encontrada uma prevalência da infecção pelo vírus da Hepatite C de 0,54% (Carvalhana *et al*, 2016). Estima-se que 900 a 1200 doentes crónicos morrem anualmente devido a complicações clínicas decorrentes da infecção pela hepatite C, tais como cirrose, carcinoma hepatocelular ou coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (Leite, 2014). A infecção ativa pelo VHC na população de utilizadores de drogas ilícitas, co-infectada com VIH, pode chegar aos 70% (Silva *et al*, 2015) ou mesmo 80% (Calado *et al*, 2011).

De acordo com um estudo desenvolvido INSA verificou-se que a infecção pelo genótipo 1 foi a mais frequente (57,5%), seguida das infecções pelos genótipos 3 e 4 que representariam, respetivamente, 28,0% e 13,1% dos casos de infecção pelo VHC diagnosticados entre 2009 e 2014. A infecção pelo genótipo 2 foi rara, não sendo identificados casos de infecção pelos genótipos 5, 6 e 7. Neste estudo foi também detetada a presença dos subtipos 2a, 2b e 4c, além da forma recombinante 2k/1b (Pádua *et al*, 2015). Observou-se ainda que o subtipo mais comum foi o 1a, seguindo-se por frequência decrescente os subtipos 3a, 1b, 4d e 4a, situação muito semelhante à revelada em estudos realizados, na população de toxicodependentes de países do sul da Europa (van Asten *et al*, 2004 e Esteban *et al*, 2008).



**Figura 1. 5** - Frequência dos genótipos do VHC diagnosticados no INSA entre 2009 e 2014 (n=908) (adaptado de Padua *et al*, 2015)

### 1.3 Diagnóstico da infecção e genotipagem do VHC

No diagnóstico e na monitorização da infecção pelo vírus da hepatite C são frequentemente usados dois tipos de ensaios: os serológicos e os moleculares. Os serológicos detetam a presença de anticorpos contra o VHC e os moleculares detetam a presença de RNA viral e podem também identificar o genótipo e subtipo do VHC (Ghany *et al*, 2009). Os testes serológicos devem ser utilizados no rastreio da infecção pelo VHC. Caso o resultado seja positivo, deve confirmar-se a infecção ativa pelo VHC através dos testes de deteção/quantificação do RNA viral. A presença de RNA de VHC persistente (mais de 6 meses) conduz a um diagnóstico de infecção crónica, sendo recomendado a realização da genotipagem do VHC antes de se iniciar o tratamento (Wilkins *et al*, 2015).

#### 1.3.1 Testes sorológicos

Os anticorpos contra o VHC podem ser detetados no plasma ou soro humano por ensaios imunoenzimáticos (EIA) de terceira geração, cerca de seis a oito semanas após a exposição ao vírus da hepatite C (Strader *et al*, 2004 e Ghany *et al*, 2009). Estes ensaios têm a vantagem de apresentarem um baixo custo, serem de processamento rápido, altamente específicos e fáceis de automatizar (Villar *et al*, 2015).

Em pacientes imunodeprimidos ou com infecção pelo VIH é possível o desenvolvimento de uma infecção crónica pelo VHC sem que a concentração de anticorpos aumente significativamente. Deste modo, os anticorpos podem não ser detetáveis nos ensaios imunoenzimáticos (Boyer e Marcellin, 2000; Strader *et al*, 2004 e Shaheen e Idrees, 2015). Por outro lado, em doentes imunocompetentes, a deteção dos anticorpos contra o VHC não permite diferenciar uma infecção

recente de uma infecção resolvida, dado que, após a exposição ao vírus, os anticorpos permanecem no indivíduo para toda a vida (Villar *et al*, 2015).

### 1.3.2 Testes moleculares para a detecção e/ou quantificação do RNA viral

O RNA viral pode ser detetado 1 a 2 semanas após a exposição ao VHC. Os ensaios moleculares são os indicados para o diagnóstico da infecção aguda (Boyer e Marcellin, 2000 e Shaheen e Idrees, 2015). A detecção do RNA pode ser realizada qualitativamente (positivo ou negativo) ou quantitativamente (número de cópias do vírus num volume específico de plasma ou soro). Embora os testes quantitativos tenham uma elevada especificidade, os testes qualitativos apresentam uma maior sensibilidade na detecção do RNA do VHC (Ghany *et al*, 2009 e Gretch, 1997).

Os ensaios quantitativos permitem quantificar cópias de RNA viral através de técnicas como o PCR em tempo real, de RT-PCR e bDNA (Branched DNA Assay) (Strader *et al*, 2004, Chevaliez e Pawlotsky, 2007 e Villar *et al*, 2015). Devem ser efetuados antes, durante e após o tratamento da hepatite C, de forma a monitorizar a eficácia do tratamento (Wilkins *et al*, 2015 e Villar *et al*, 2015).

### 1.3.3 Genotipagem do VHC

O método “gold standard” para a genotipagem do VHC assenta na sequenciação direta dos produtos de PCR amplificados de determinadas regiões do genoma do vírus. As regiões genómicas mais utilizadas são a NS5B e a região core, por apresentarem algum nível de variabilidade que permite a diferenciar os subtipos do VHC, e simultaneamente, apresentarem a vantagem de possuírem zonas relativamente conservadas para o desenho de primers a utilizar nas reações de amplificação e de sequenciação (Villar *et al*, 2015).

## **1.4 Tratamento da infecção crónica**

O objetivo do tratamento da hepatite C é eliminação do vírus do hospedeiro e, deste modo, evitar as complicações crónicas da doença hepática. A eficácia do tratamento da hepatite C é avaliada através da Resposta Viroológica Sustentada (RVS), ou seja, a ausência de RNA viral seis meses após a conclusão do tratamento (Kim e Saab, 2005 e Asselah, 2011). Se a RVS for atingida durante esse período de tempo, espera-se a cura da infecção em 99% dos pacientes (Chevaliez, 2011).

### 1.4.1 A terapia padrão do passado

Entre 2001 e 2011, a terapia padrão para o tratamento da doença crónica da hepatite C consistia na administração de Interferão alfa-peguilado (Peg-IFN $\alpha$ ) e Ribavirina (RBV), obtendo-se uma RVS média de 50%, ou seja, a cura de apenas metade dos doentes tratados (Pearlman, 2004 e TenCate *et al*, 2010). A taxa de RVS depende de genótipo em causa, sendo mais baixa para as

infecções pelo genótipo 1 e também pelo genótipo 4. No que respeita aos indivíduos infetados com os genótipos 2 e 3, a taxa de RVS aumenta para os 80% (Chevaliez, 2011 e Lange e Zeuzem, 2014). No caso de infeção pelos genótipos 5 e 6, a taxa de RVS pode variar entre 60% a 85% (Antaki *et al*, 2009).

Para além da baixa eficácia da terapia padrão constatou-se que o interferão apresentava efeitos adversos graves, levando à interrupção do tratamento em muitos doentes (deLemos e Chung, 2014 e Mishra *et al*, 2015).

#### 1.4.2 Os antivirais no presente

Os Antivirais de Ação Direta (AAD) têm como alvo as proteínas envolvidas na replicação do VHC. A sua utilização no tratamento da hepatite C levou a uma melhoria acentuada na resposta virológica sustentada e na qualidade de vida dos doentes (Banerjee e Reddy, 2016).

Os AAD são classificados em classes de acordo com o seu mecanismo de ação e o seu alvo terapêutico específico: os inibidores da protease NS3/4A; os inibidores da proteína NS5A e os inibidores da polimerase NS5B (Banerjee e Reddy, 2016). Os inibidores da polimerase NS5B podem ligar-se diretamente à enzima, comprometendo a sua função (inibidores não-nucleosídicos) ou podem competir pelos locais de ligação dos nucleótidos (inibidores nucleosídicos) (Banerjee e Reddy, 2016; Majumdar, 2016 e Jakobsen *et al*, 2016).

Em 2011, os inibidores de protease, Telaprevir e Boceprevir, foram aprovados pelo Infarmed para o uso clínico. Estes antivirais eram adicionados à terapia padrão de Peg-IFN $\alpha$  e RBV (terapia tripla), sendo utilizados no tratamento de doentes infetados com o genótipo 1 (Lange e Zeuzem, 2014 e Chayama *et al*, 2016). Embora a terapia tripla tivesse aumentado a taxa de RVS para 70%, continuava a manter-se o problema dos efeitos adversos. Este facto, esteve na base do desenvolvimento de uma segunda geração de inibidores da protease (Simeprevir e Paritaprevir) e de outras novas classes de antivirais, nomeadamente, os inibidores da polimerase NS5B (Sofosbuvir e Dasabuvir) e os inibidores da proteína NS5A (Daclatasvir, Ledipasvir e Ombitasvir) (Chayama *et al*, 2016). Atualmente todas estas classes de inibidores são opções de escolha para os regimes terapêuticos da hepatite C (Asselah *et al*, 2016).

Nos regimes terapêuticos com os novos antivirais (livres de interferão) atingiram-se taxas de RVS de 90%, observando-se uma redução no tempo do tratamento e verificou-se a ausência de efeitos adversos (Asselah *et al*, 2016). Porém, apesar dos avanços relevantes no tratamento da hepatite C ainda não foi alcançada uma taxa de cura de 100%. Alguns casos de insucesso podem ser o resultado da seleção de variantes virais resistentes aos antivirais (Majumdar, 2016).

#### 1.4.3 Mutações de resistência aos inibidores da polimerase NS5B

A resistência aos AAD é estabelecida pela seleção de variantes virais com mutações em posições específicas nas proteínas NS3, NS5B e NS5A, sendo que existe um padrão de mutação específico que confere a resistência a cada classe de inibidores (Poveda *et al*, 2014).

A polimerase NS5B apresenta diversos domínios, sendo o centro ativo da enzima (aminoácidos na posições 188 a 227 e 287 a 370) a região mais conservada. As substituições aminoácidas fora do centro ativo da enzima (aminoácidos na posições 1 a 187; 228 a 286 e 371 a 563) são as mais toleradas, podendo existir nessas regiões uma maior variabilidade sem a perda da função da enzima (Di Maio *et al*, 2014).

O Sofosbuvir é o antiviral mais estudado entre todos os inibidores nucleosídicos. O tratamento com este fármaco apresenta elevada taxa de RVS, sendo por isso, extremamente importante em qualquer regime terapêutico pangênótico (Majumdar, 2016). A principal mutação de resistência a este fármaco é a S282T, que altera a conformação do centro catalítico da enzima, comprometendo o *fitness* do vírus. Desta forma, para que ocorra resistência ao Sofosbuvir, a mutação S282T tem de ser identificada conjuntamente com as mutações T179A, M289L e I293L, que por sua vez, restabelecem os níveis de *fitness* do vírus e levam à resistência ao fármaco (Lam *et al*, 2012; Di Maio *et al*, 2014 e Sarrazin, 2016).

No que diz respeito aos inibidores não-nucleosídicos, o fármaco mais utilizado desta classe no tratamento da hepatite C é o Dasabuvir, regra geral administrado em conjunto com inibidores da protease (Ritonavir, e Paritaprevir) e inibidores da polimerase NS5A (Ombitasvir) (Majumdar, 2016). Este fármaco foi desenvolvido de forma a contribuir para uma estratégia de alvos terapêuticos múltiplos no tratamento da infecção pelo genótipo 1 do VHC. Na infecção pelo subtipo 1a, as principais mutações de resistência são a C316Y e a S556G. Na infecção pelo subtipo 1b, as mutações C316N e a S556G que apenas conferem um nível de resistência intermédio ao Dasabuvir. Além destas, também se podem encontrar alterações nas posições 414 (M414T/I), 448 (Y448H) e 559 (D559G/N), que levam à resistência a este antiviral (Kati *et al*, 2015 e Sarrazin, 2016).

## **2.Enquadramento e Objetivos**

## 2 Enquadramento e objetivos

A infeção pelo vírus da hepatite C constitui um grave problema de saúde pública, afetando milhões de pessoas em todo mundo, em particular, a população de toxicodependentes, caracterizada por apresentar comportamentos de risco no consumo de drogas injetáveis e inaladas. Apesar dos avanços no tratamento da infeção crónica com a utilização de antivirais, ainda não foi alcançada uma eficácia de 100% na eliminação do vírus do hospedeiro. Casos de insucesso terapêutico para alguns genótipos/subtipos do VHC foram associados à seleção de variantes com mutações de resistência. Desta forma, continua a ser importante determinar o genótipo e o subtipo de VHC antes de se iniciar o tratamento, de modo a estabelecer possíveis relações virológicas com a clínica e a resposta ao tratamento.

O presente estudo constitui parte de um projeto mais abrangente que pretende analisar a infeção pelo VHC num grupo de indivíduos frequentadores de um Programa de substituição de baixo limiar exigência (PSBLE) da cidade de Lisboa. Os principais objetivos do projeto incluem a avaliação dos comportamentos de risco e dos conhecimentos que os indivíduos possuem sobre a hepatite C, determinar as barreiras ao diagnóstico bem como conhecer o estado clínico dos indivíduos quanto à infeção pelo VHC. Cerca de 900 indivíduos deram consentimento informado para a participação no projeto de forma voluntária e esclarecida. Para além da colheita de sangue, foi realizado um inquérito para a recolha de dados aos participantes.

No desenvolvimento do presente estudo, foram selecionados de entre a população participante no projeto, os indivíduos que apresentaram resultado de pesquisa de anticorpos VHC positivo, tendo como principais objetivos:

1. Caracterizar a população selecionada pela análise de dados: demográficos, educacionais, socioeconómicos, epidemiológicos e clínicos.
2. Determinar a prevalência da infeção ativa no grupo populacional estudado, através da deteção de RNA do VHC.
3. Identificar os genótipos e subtipos de VHC no grupo de indivíduos com infeção ativa (análise da região NS5B por *BLAST* e estimativa filogenética).
4. Caracterizar os recombinantes identificados (análise adicional das regiões NS3 e C/E1 por estimativa filogenética).
5. Identificar mutações de resistência a inibidores da polimerase NS5B;
6. Analisar as variáveis usadas na caracterização da população em associação com a infeção ativa, os subtipos do VHC identificados na população.
7. Avaliar a perceção dos indivíduos sobre a hepatite C e o conhecimento que possuem sobre a sua situação clínica.

## **3. Material e Métodos**

## 3 Material e Métodos

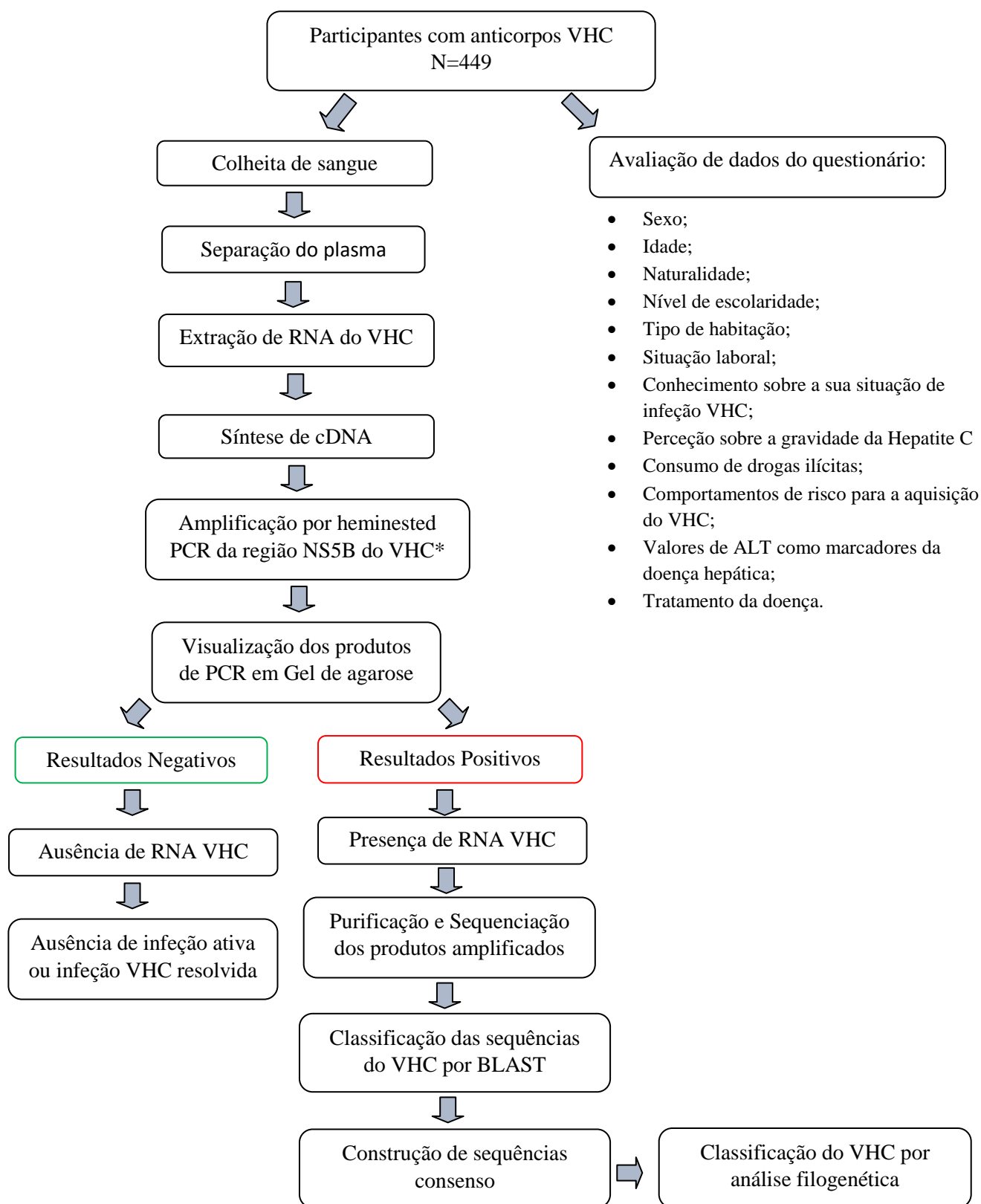
### 3.1 População alvo

A população alvo selecionada para este estudo foi constituída por utilizadores de drogas ilícitas (UDI), com resultado de pesquisa de anticorpos para o VHC positivo. Estes indivíduos frequentam um programa de substituição de metadona, na cidade de Lisboa, e possuem comportamentos de risco para a infeção pelo vírus da hepatite C, nomeadamente a partilha de material no consumo de drogas injetáveis ou inaladas.

Amostras sanguíneas foram colhidas aos participantes que apresentavam os critérios de inclusão supramencionados, entre julho de 2015 e janeiro de 2016, sendo enviadas para o laboratório juntamente com o respetivo questionário preenchido.

### 3.2 Desenho do estudo

As amostras obtidas de indivíduos com resultado de pesquisa de anticorpos para o VHC positivo foram analisadas para a deteção e classificação do VHC. O RNA viral foi extraído do plasma, tendo sido feita a síntese de cDNA e a amplificação da região NS5B do VHC para posterior sequenciação dos produtos amplificados. Apenas uma amostra foi submetida à amplificação adicional das regiões NS3 e C/E1 para confirmar a sua classificação genómica. Na figura 3.1 encontra-se o esquema representativo do desenho do estudo desenvolvido.



**Figura 3. 1** - Esquema representativo da metodologia seguida no desenvolvimento do estudo.

\* - Amostras em que não foi possível classificar o VHC na região NS5B foram submetidas à amplificação e análise das regiões NS3 e C/E1 do VHC.

### 3.3 Extração do RNA viral

A extração do RNA do VHC foi efetuada a partir do plasma, ou utilizando o kit comercial “QIAmp® Viral RNA Mini Kit” (QIAGEN, Hilden, Germany) ou o sistema automatizado de extração dos ácidos nucleicos denominado “NucliSENS® easyMAG” (bioMerieux, Lyon, France). Em ambos os procedimentos foram seguidas as instruções do fabricante e a escolha de cada um deles dependeu do volume da amostra disponível. Apenas nos casos de volume reduzido de plasma foi realizada a extração do RNA com reagentes “QIAmp® Viral RNA Mini Kit”.

#### a) Extração do RNA com o kit “QIAmp® Viral RNA Mini Kit”

Uma amostra de 140 µl de plasma foi submetida a uma lise através da adição 560 µl de tampão AVL e 5,6 µl de carrier de RNA. Após a homogeneização da mistura num vortex e incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, os tubos foram colocados no equipamento “QIAcube” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) para a extração do RNA viral. Os restantes reagentes (etanol, tampões de lavagem AW1 e AW2, tampão de eluição AVE) foram colocados no suporte do aparelho e o programa de extração iniciado. A amostra previamente lisada facilitou a fixação do RNA à coluna, sendo posteriormente lavado com dois tampões de lavagem (AW1 e AW2) e eluído com 60 µl de tampão AVE. Por último, transferiu-se o eluído final para tubos com rosca, que foram conservados a menos 80°C até a sua utilização.

#### b) Extração do RNA com o sistema “NucliSENS® easyMAG”

Este procedimento de extração, baseado na utilização de partículas magnéticas de sílica que capturam os ácidos nucleicos, foi realizado para a maioria das amostras estudadas. O equipamento foi carregado previamente com os diferentes reagentes necessários ao procedimento de extração, bem como as amostras a extrair. O procedimento foi iniciado com uma lise a partir de 200 µl de plasma com duração de 10 minutos, adicionando-se depois a cada amostra a sílica magnética para a ligação dos ácidos nucleicos. Nesta fase, os eventuais contaminantes da amostra foram eliminados através de lavagens sucessivas. Após a libertação dos ácidos nucleicos, as partículas de sílica foram removidas com a ajuda de um íman, resultando num produto final de 60 µl de RNA viral puro, o qual foi transferido para os tubos finais com rosca, que foram conservados a menos 80°C até à sua utilização.

### 3.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA extraído do plasma e através da utilização de dois kits comerciais diferentes mas com desempenho equivalente. Os 2 kits utilizados foram: o “RT – kit plus” (Nanogen Advanced Diagnostics S.r.L., Italy) e o “High capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Em ambos os procedimentos seguiram-se as instruções do fabricante e foram usados de acordo com a disponibilidade dos reagentes no laboratório.

a) Síntese de cDNA com o “RT – kit plus”

Na sala limpa, foi preparada uma mistura com 1 µl de transcriptase reversa (MMLV-RT), 0,5 µl de inibidor de RNase (RNasi STOP) e 3,5 µl de água ultrapura, perfazendo um volume total de 5 µl. Esta mistura foi transferida para um tubo contendo 10 µl de mistura de reação de RT (“RT-MIX monotest tubes”). Num outro espaço laboratorial (sala de adição de RNA), foram adicionados 10 µl do RNA previamente extraído. A síntese do cDNA foi realizada num termociclador com as condições descritas na tabela 3.1.

**Tabela 3. 1** - Condições de síntese do cDNA com o kit “RT-plus”

Ciclo	Temperatura (°C)	Tempo
Hibridação	25°C	10 min
Transcrição Reversa	37°C	45 min
Desnaturação	95°C	5 min

b) Síntese de cDNA com o kit “High capacity cDNA Reverse Transcription Kit”

Na sala limpa, preparou-se uma mistura com 2 µl de tampão de reação (10X RT Buffer), 0,8 µl de dNTPs (25X dNTP Mix), 2 µl de primers aleatórios (10X RT Random Primers), 2 µl de transcriptase reversa (MultiScribe Reverse Transcriptase) e 4,2 µl de água ultrapura, perfazendo um volume total de 10 µl. Posteriormente, na sala de adição de RNA, adicionou-se 10 µl do RNA previamente extraído. A síntese do cDNA foi realizada num termociclador com as condições descritas na tabela 3.2.

**Tabela 3. 2** - Condições de síntese de cDNA com o kit “High capacity cDNA”

Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
Hibridação	25°C	10min
Transcrição Reversa	37°C	120min
Desnaturação	85°C	5min

### 3.5 Amplificação de fragmentos genómicos do VHC

Todas as amostras foram submetidas à amplificação da região NS5B do VHC. No entanto, nas amostras em que não foi possível classificar o vírus nesta região genómica, ou que necessitaram de uma análise molecular mais abrangente foram submetidas a amplificação das regiões NS3 e C/E1 do VHC.

Os primers foram preparados a partir de um *stock* com uma concentração de 100 µM, sendo depois diluídos em alíquotas de 10 µM para as soluções de trabalho a utilizar na reação de amplificação e alíquotas de 1 µM a utilizar na reação de sequenciação.

De modo a evitar contaminações, a mistura de reagentes de amplificação foi realizada sempre na sala limpa, enquanto a adição de cDNA e dos produtos de PCR ocorreram em espaços laboratoriais

distintos. Foram também incluídos nos protocolos experimentais controlos negativos para verificar a eventual ocorrência de contaminações.

### 3.5.1 Caraterização dos primers para a região NS5B

A escolha dos primers para amplificação da região NS5B atendeu à experiência obtida a partir de estudos previamente desenvolvidos no laboratório. Esta região genómica do VHC é relativamente conservada, permitindo a identificação dos diversos genótipos e subtipos do VHC (Simmonds *et al*, 1993). Os primers utilizados para a amplificação da região NS5B foram utilizados em Calado *et al* (2011) e Avó *et al* (2014) e encontram-se descritos na tabela 3.3 sendo a sua localização no genoma do VHC realizada com base na sequência de referência H77 (NC\_004102).

**Tabela 3.3** - Sequência dos primers utilizados na amplificação da região NS5B do VHC.  
f=forward; r= reverse; o=outer; i=inner

Região genómica	Designação do Primer	Sequencia (5' – 3')	Localização no genoma	Fragmento (pb)
NS5B	NS5Bo_f	TGGGGTTYTCNTATGAYACCMGMTG	8245–8269	391
	NS5B_r	GGNGCNGARTACCTGGTCATAGCYTCCG TGAA	8616–8647	
	NS5Bi_f	TATGAYACCMGCTGYTTTGAGTC	8256–8278	

### 3.5.2 Caraterização dos primers para as regiões NS3 e C/E1

Para a amplificação da região NS3 foram usados os primers descritos em Besse *et al* (2012) e Silva *et al* (2015), e para a região C/E1 foram usados os primers descritos em Calado *et al* (2011) e Avó *et al* (2014) (tabela 3.4).

**Tabela 3.4** - Primers utilizados na amplificação das regiões NS3 e C/E1 do VHC.  
F=forward; R= reverse; o=outer; i=inner.

Região genómica do VHC	Designação do Primer	Sequencia (5' – 3')	Localização no genoma	Fragmento (pb)
NS3	NS3-1F	ATGGARAAGAARRTYATYRTITGGG	3276–3300	649
	NS3-2F	ATGGARAYYAAGVYATYACITGGG	3276–3300	
	NS3-1R	CTYTTICCRCTICCICTIGGIGCRTG	4026–4051	
	nestedNS3-1F	ATCTTICTIGGICIGCYGA	3369–3388	
	nestedNS3-2F	ATACTICTIGGICIGCIGA	3369–3388	
	nestedNS3-R	GCIACYTGRTAIGTITGIGG	3999–4018	
C/E1	CEo_F	GCAACAGGGAAYYTDCCYGGTTGCTC	834–859	472
	CE_R	TTCATCATCATRTCCCANGCCAT	1293–1315	
	CEi_F	AAYYTDCCCGGTGCTCYTTYTCTAT	843–868	

Na amplificação por nested PCR da região NS3, foram usados na primeira reação 3 primers externos: o primer NS3-1F (primer direto e específico para os genótipos 2,4 e 6), o primer NS3-2F (primer direto e específico para os genótipos 1, 3 e 5) e o primer NS3-1R (reverso). Na segunda reação de amplificação foram usados os primers internos nestedNS3-1F (primer direto e específico para os

genótipos 1 e 6), nestedNS3-2F (primer direto e específico para os genótipos 2, 3, 4 e 5) e nestedNS3-R (reverso). Na amplificação da região C/E1 realizada por heminested PCR, usaram-se os primers CEo\_F e CE\_R na primeira reação e o par de primers CEi\_F e CE\_R na segunda reação de amplificação.

### 3.5.3 Condições das reações de amplificação

#### a) Região NS5B

Na primeira reação de amplificação foi usado o sistema “illustra TM puReaq Ready-To-Go PCR Beads” (GE Healthcare, Buckinghamshire, England). Este sistema é composto por microtubos contendo uma pequena esfera de reagentes liofilizados. A sua reconstituição foi efetuada para um volume final de 25 µl, resultando numa mistura com a concentração de 200 µM de dNTPs, 10mM de Tris-HCL, 50mM de KCL, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5 unidades de puReTaqDNA polimerase. Nestes microtubos foi colocado 1 µl de cada um dos primers (NS5B\_of e NS5B\_r) com a concentração de 10µM e adicionado 17 µl de água ultrapura. Posteriormente foram adicionados 6 µl de cDNA e os tubos foram submetidos ao programa de amplificação descrito na tabela 3.5.

**Tabela 3. 5** - Programa de amplificação usado na primeira reação de amplificação da região NS5B do VHC.

Região NS5B do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 5 min	x 1
	Amplificação	95°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 1 min	x 10
		95°C, 30 seg; 60°C, 30 seg; 72°C, 1 min	x 30
Extensão final	72°C, 7 min	x 1	

Na segunda reação de amplificação utilizou-se a enzima “AmpliTaq® Gold DNA Polymerase” (Applied Biosystems, Foster City, USA), sendo preparada uma mistura com 5µl de tampão de PCR (10x), 3 µl de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 8 µl de dNTPs (1.25 mM), 2 µl de cada primer (NS5Bi\_f e NS5B\_r) com a concentração de 10µM. Foi adicionado 0,25 µl de enzima (5 U/µl), 28,75µl de água ultrapura e 1 µl do produto do PCR amplificado na primeira reação, perfazendo um volume total de 50 µl. Os tubos foram colocados no termociclador, sendo submetidos ao programa de amplificação descrito na tabela 3.6.

**Tabela 3. 6** - Programa de amplificação utilizado na segunda reação de amplificação para a região NS5B do VHC.

Região NS5B do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 5 min	x 1
	Amplificação	95°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C, 1 min	x 10
		95°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C, 1 min	x 10
		95°C, 30 seg; 60°C, 30 seg; 72°C, 1 min	x 20
Extensão final	72°C, 7 min	x 1	

b) Regiões NS3 e C/E1

Na primeira reação, usou-se o sistema “*illustra TM puReaq Ready-To-Go PCR Beads*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, England), mantendo as mesmas condições experimentais utilizadas para a região NS5B, alterando-se apenas o programa de amplificação que se encontra descrito na tabela 3.7.

**Tabela 3. 7 - Programa usado na primeira reação de amplificação das regiões NS3 e C/E1.**

Região NS3 do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 9 min	x 1
	Amplificação	95°C, 45 seg; 50°C, 1 min; 72°C, 1 min 30 seg	x 45
	Extensão final	72°C, 7 min	x 1
Região C/E1 do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 5 min	x 1
	Amplificação	95°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 72°C 1 min 95°C, 30 seg; 60°C, 30s seg; 72°C, 1 min	x 10 x 30
	Extensão final	72°C, 7 min	x 1

Na segunda reação de amplificação para as regiões NS3 e C/E1 foi usada a enzima “AmpliTaQ® Gold DNA Polymerase”, estando a mistura dos diversos reagentes descrita na tabela 3.8. A essa mistura foi adicionado 1 µl do produto de PCR amplificado na primeira reação perfazendo um volume final de 50 µl. Os programas de amplificação utilizados encontram-se descritos na tabela 3.9.

**Tabela 3. 8 - Mistura de reação utilizada na segunda reação de amplificação para a região NS3 (A) e para a região C/E1 (B) do VHC.**

A) 2ª Amplificação da região NS3		B) 2ª Amplificação da região C/E1	
Reagentes	Mistura de reação	Reagentes	Mistura de reação
10x PCR Buffer	5µl	10x PCR Buffer	5µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	3µl	25mM MgCl <sub>2</sub>	3µl
1,25mM dNTPs	8µl	1,25mM dNTPs	8µl
10µM primer nestedNS31F	3µl	10µM primer CEi_F	2µl
10µM primer nestedNS32F	3µl		
10µM primer nested NS3R	6µl	10µM primer CE_R	2µl
H <sub>2</sub> O(até 49µl)	20,5µl	H <sub>2</sub> O(até 49µl)	28,5µl
5U/µl Taq Gold	0,5µl	5U/µl Taq Gold	0,5µl

**Tabela 3. 9** - Programa de amplificação usado na segunda reação de amplificação para as regiões NS3 e C/E1.

Região NS3 do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 5 min	x 1
	Amplificação	95°C, 15 seg; 45°C, 30seg; 72°C, 1 min	x 10
		95°C, 15 seg; 50°C, 30seg; 72°C, 1min 30 seg	x 35
Extensão final	72°C, 7 min	x 1	
Região C/E1 do VHC	Desnaturação inicial	95°C, 5 min	x 1
	Amplificação	95°C, 30 seg; 50°C, 30 seg; 72°C 1 min	x 10
		95°C, 30 seg; 60°C, 30s seg; 72°C, 1 min	x 30
Extensão final	72°C, 7 min	x 1	

#### 3.5.4 Análise dos produtos de PCR

Os produtos resultantes da segunda reação de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.4% em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA). Para a visualização dos fragmentos sob a luz ultravioleta, o gel foi contrastado com 5 µl de *SyberSafe* (Invitrogen, California, USA). Em cada poço do gel colocou-se a mistura de 3 µl do corante azul de bromofenol juntamente com 5 µl de produto amplificado, previamente preparados e homogêneos num tubo de 1,5ml. De forma a estimar a massa molecular dos fragmentos de DNA obtidos aplicou-se num dos poços do gel um marcador “*1Kb Pus DNA Ladder*” (Invitrogen, California, USA). A corrida eletroforética decorreu durante cerca de 1 hora a 120 volts e a visualização do gel efetuou-se num transiluminador ultravioleta (*Gel Doc XR System, BioRad, USA*), sendo depois feita a comparação entre as bandas obtidas nas amostras e o perfil de bandas do marcador com massa molecular conhecida. Os fragmentos esperados para a região NS5B, NS3 e C/E1 foram, respetivamente, 391 pb, 649 pb e 472 pb.

### 3.6 Purificação dos produtos amplificados

Os produtos de PCR contendo os fragmentos de massa molecular semelhante à esperada foram purificados, por forma a remover o excesso de reagentes que não foram consumidos na reação de amplificação e evitar a sua interferência na qualidade da reação de sequenciação. Neste processo de purificação recorreu-se a dois procedimentos diferentes: o kit “*ExoSAP-IT Clean-up Kit*” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) e o kit “*QIAquick® PCR Purification Kit*” (QIAGEN, Valencia, USA). Em ambos os procedimentos seguiram-se as instruções do fabricante.

#### a) Purificação com o kit “*ExoSAP-IT Clean-up Kit*”

A purificação com ExoSAP-IT foi realizada em todas os produtos amplificados que apresentaram em gel de agarose a banda de massa molecular esperada e não se observaram outras bandas inespecíficas. Neste procedimento foram colocados num microtubo 2 µl da enzima ExoSAP-IT a que se adicionou 5 µl de produto amplificado, perfazendo um volume total de 7 µl. Os microtubos foram colocados no termociclador durante 15 minutos a 37°C seguidos de mais 15 minutos a 80°C.

b) Purificação com o kit “*QIAquick® PCR Purification Kit*”

A purificação “*QIAquick*” foi realizada num número reduzido de amostras amplificadas, por apresentarem uma segunda banda correspondente a amplificação inespecífica. Deste modo, a cada volume de produto amplificado juntou-se 5 volumes de tampão PBI. Esta mistura foi transferida para uma coluna, ocorrendo a fixação do DNA à sua membrana, através de uma centrifugação de 1 minuto. Posteriormente a coluna foi transferida para um novo tubo coletor, para se proceder a uma lavagem com 750 µl de tampão PE seguida de uma centrifugação de 1 minuto, repetindo-se este passo de centrifugação com descarte do sobrenadante. Após a lavagem, fez-se a eluição do DNA da coluna em 30 µl de tampão EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5), por centrifugação, depois de 1 minuto de incubação à temperatura ambiente. Todas as centrifugações realizadas neste procedimento foram a 10 000 rpm e à temperatura ambiente. A visualização do DNA purificado foi realizada num gel de agarose (como descrito no ponto 3.6), para verificar se não ocorreu qualquer perda do purificado durante as várias etapas do procedimento.

### 3.7 Reação de sequenciação

Os produtos purificados foram sequenciados usando o kit comercial “*BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*” (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra foi realizada uma mistura contendo 1 µl de Big Dye, 1 µl de primer a 1 µM e entre 2 e 5 µl de DNA purificado. Foi utilizada água ultrapura de forma a perfazer o volume final de 10 µl. A reação de sequenciação decorreu num termociclador com o programa descrito na tabela 3.10.

*Tabela 3. 10 - Programa da reação de sequenciação.*

Amplificação	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	96°C	30 seg	x 1
Desnaturação	96°C	30 seg	x 25
Hibridação	50°C	15 seg	
Síntese	60°C	4 min	

Dependendo da região a estudar, os primers utilizados na reação de sequenciação foram os mesmos aos usados na segunda reação de PCR.

As amostras sequenciadas foram entregues na Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA, onde foi realizada a precipitação e eletroforese capilar das amostras para a obtenção das sequências (cromatogramas), e seguir-se a continuação da análise no laboratório.

### **3.8 Análise bioinformática das sequências**

#### **3.8.1 Construção das sequências de consenso**

As sequências foram analisadas e corrigidas através do programa *Chromas* versão 2.4.4, e alinhadas no programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5, para a construção de sequências de consenso de cada amostra (e para cada região). Posteriormente, estes consensos foram submetidos a uma classificação por *BLAST*, disponível na base de dados do VHC Los Alamos ([http://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC\\_BLAST/basic\\_blast.html](http://hcv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html)). A análise por *BLAST* consistiu na pesquisa da sequência de maior similaridade entre sequências do VHC da base de dados com a sequência em estudo, permitindo a sua classificação.

#### **3.8.2 Estimativa filogenética**

A construção das árvores filogenéticas realizou-se através do programa *MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis)*. O método utilizado para a construção das árvores foi *Neighbor-Joining* a partir de múltiplos alinhamentos, sendo a matriz de distâncias calculada pelo modelo de *Kimura* a dois parâmetros. Para avaliar a robustez dos ramos da árvore foi utilizado o método de *bootstrapping* com base em 1000 réplicas, sendo os valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 70% considerados estatisticamente significativos.

As sequências de referência dos vários genótipos e subtipos do VHC, foram obtidas a partir da base de dados do VHC de Los Alamos, estando os números de acesso em anexo (Anexo 1).

#### **3.8.3 Análise de mutações de resistência**

A análise de mutações de resistência foi realizada através da submissão das sequências de consenso em estudo ao programa *Geno2phenoHCV*, disponível *online* (<http://hcv.geno2pheno.org/index.php>). As alterações aminoácidas descritas como reduzirem a suscetibilidade a inibidores da polimerase foram analisadas nas posições 282, 289, 293 e 316 da região NS5B.

### **3.9 Análise estatística**

A análise estatística dos resultados obtidos no presente estudo foi efetuada no programa *EpiInfo vs7*. Foi realizada uma análise de distribuição (n; %) para os dados disponíveis que caracterizam a população: sexo, idade, naturalidade, nível de escolaridade, tipo e habitação, situação laboral, via e tempo de consumo de drogas ilícitas, e ainda, percepção individual dos participantes quanto à gravidade da doença e a sua situação clínica quanto à hepatite C. Foi também efetuada a associação de algumas dessas variáveis com a presença ou ausência de RNA e os subtipos do VHC. Utilizou-se o teste de Fisher bilateral aplicado a tabelas de contingência 2x2 (anexo 2), considerando-se os resultados estatisticamente significativos quando o valor de  $p < 0,05$ .

## **4.Resultados**

## 4. Resultados

### 4.1 Caracterização da População estudada

#### 4.1.1 Análise demográfica, educacional e socioeconómica

A população de participantes no presente estudo foi composta por 449 indivíduos consumidores de drogas ilícitas. A grande maioria dos indivíduos era do sexo masculino, sendo 361 (80,4%) homens e 88 (19,6%) mulheres. A variação de idades estava compreendida entre os 24 e os 64 anos, sendo a idade média da população de 44 anos. Embora a esmagadora maioria dos indivíduos fosse de naturalidade portuguesa (92,9%; n=417), observou-se a adesão de participantes oriundos de diversos países fora de Portugal (7,1%; n=32). Embora residentes no nosso país, estes indivíduos provinham de Angola (n=8; 1,8%), Espanha (n=4; 0,9%), Moçambique (n=4; 0,9%), Ucrânia (n=4; 0,9%), França (n=3; 0,7%), Brasil (n=2; 0,5%), Cabo Verde (n=2; 0,5%), Rússia (n=2; 0,5%), Roménia (n=1; 0,2%), Arménia (n=1; 0,2%) e Uzbequistão (n=1; 0,2%).

Na análise do nível educacional da população estudada, verificou-se que a maioria dos indivíduos (226; 50,3%) concluiu o 2º ou o 3º ciclo do ensino básico. No entanto, observou-se que 127 (28,3%) indivíduos possuíam apenas a frequência do 1º ciclo de escolaridade e, em contraste, 28 (6,2%) referiram a frequência ou a conclusão de uma licenciatura do Ensino Superior (tabela 4.1).

*Tabela 4.1 - Nível de escolaridade da população em estudo*

<b>Níveis de Escolaridade</b>	≤ 1ºciclo	2º e 3ºciclos	Secundário	Ensino Superior	Não responde	TOTAL
<b>Número de indivíduos</b>	127	226	61	28	7	449
<b>Percentagem na população estudada</b>	28,3%	50,3%	13,6%	6,2%	1,6%	100,0%

Na população estudada, verificou-se uma elevada taxa de desemprego (73,5%; n=330) e uma proporção significativa de indivíduos com trabalho precário (9,3%; n=41). Apenas 68 (15,1%) indivíduos referiram emprego que garantia uma situação estável e 9 (2%) indivíduos declararam usufruir de rendimentos auferidos por pensão de reforma.

Na análise ao tipo de habitação dos indivíduos, verificou-se que uma proporção significativa dos indivíduos (n=46; 10,3%) não tinha abrigo, embora a maioria (n=402; 89,5%) referisse viver numa casa ou apartamento.

#### 4.1.2 Conhecimento do ano de diagnóstico e percepção dos indivíduos sobre a hepatite C

Na análise da percepção dos indivíduos sobre hepatite C, observou-se que 80,4% (n=361) a considerava uma infecção grave, 6,2% (n=28) desconheciam o grau de gravidade da doença, e ainda, 13,4% (n=60) dos indivíduos afirmaram que a hepatite C não era uma doença grave.

No conhecimento individual dos participantes sobre o seu estado serológico para o VHC, verificou-se que 42 (9,0%) indivíduos afirmaram não estar infetados e 57 (13,0%) disseram desconhecer a sua situação serológica. No entanto, 350 (78,0%) indivíduos afirmaram ter ou ter tido hepatite C no passado, dos quais 320 identificaram o ano do diagnóstico da infecção. A tabela 4.2 revela a distribuição dos indivíduos que referiram o ano de diagnóstico da hepatite C, por intervalos de tempo estabelecidos. Deste modo, verificou-se a existência de indivíduos conhecedores da sua situação serológica há mais de três décadas (n=3; 0,9%), observando-se que a maior proporção dos indivíduos (n=133; 41,6%) conheceu o diagnóstico da infecção entre os anos 2001 e 2010. Analisando os indivíduos que conheciam o ano de diagnóstico da infecção, verificou-se que 81,1% (n=284) afirmaram não ter feito qualquer tratamento para a hepatite C.

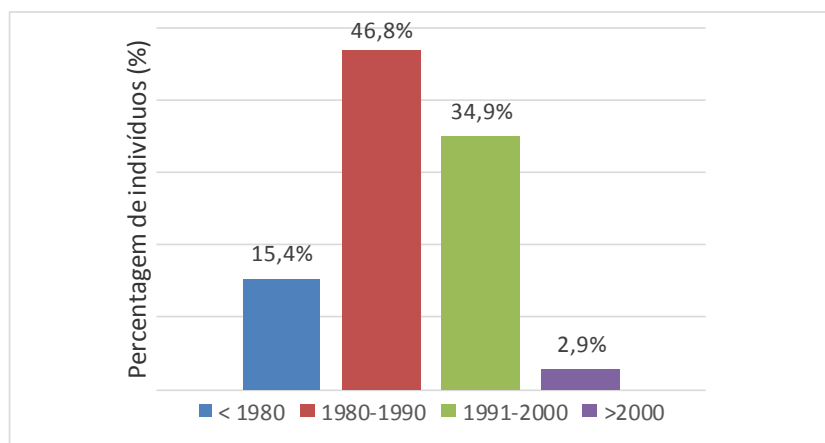
**Tabela 4. 2** - Distribuição dos indivíduos que referiram o ano de diagnóstico da infecção VHC por intervalos de tempo estabelecidos.

<b>Conhecimento do diagnóstico Hepatite C (intervalos de tempo)</b>	1970-1980	1981-1990	1991-2000	2001-2010	≥ 2011	TOTAL
<b>Frequência</b>	3	17	126	133	41	320
<b>Porcentagem</b>	0,9%	5,3%	39,4%	41,6%	12,8%	100%

#### 4.1.3 Ano do início do consumo de drogas e tipos de comportamento de risco

Na análise dos comportamentos de risco para aquisição da infecção por hepatite C, verificou-se que 80,9% (363/449) dos indivíduos consumiam drogas ilícitas por via endovenosa, independentemente de acumularem outro tipo de comportamento de risco ou via de consumo de drogas. Adicionalmente, cerca de metade (45,7%;166/363) destes indivíduos referiu ainda partilhar material de injeção aquando do consumo. O consumo de drogas por via inalada ou fumada (excluindo a via endovenosa) foi assumida em 18,7% (86/449) dos indivíduos da população estudada.

Analisando o tempo de consumo de drogas ilícitas dos 449 indivíduos estudados, observou-se que este variou entre 4 e 48 anos, sendo a média de consumo da população de 27 anos. A figura 4.1, apresenta a distribuição de indivíduos por intervalos de tempo de acordo com o ano de início do consumo de drogas ilícitas. O consumo de drogas nesta população foi iniciado nos anos 70 do século passado (69/449; 15,4%), embora a maioria dos indivíduos (210/449; 46,8%) iniciasse o consumo entre os anos 1980 e 1990. Observou-se ainda, que à data do preenchimento do inquérito, 23,0% (102/363) dos indivíduos mantinham o consumo de drogas ilícitas.



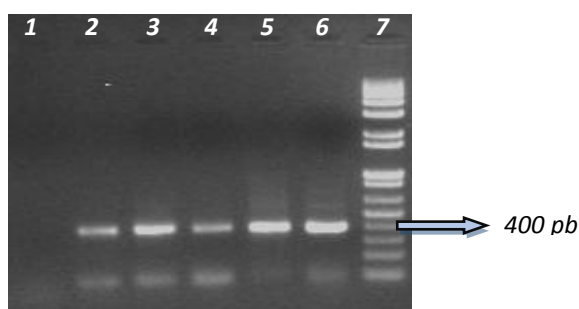
**Figura 4. 1** - Distribuição dos indivíduos por intervalos de tempo de acordo com o ano de início de consumo de drogas

#### 4.1.4 Avaliação dos níveis do marcador hepático ALT

A variação dos níveis de ALT foi analisada na população estudada. Observou-se que 41,0% (184/449) dos indivíduos apresentava alterações nos valores de ALT (superiores a 31 ou 40 U/L, respectivamente nas mulheres e nos homens). Neste grupo, 72,8% (134/184) dos indivíduos tinham valores de ALT até 100 U/L, 23,4% (43/184) dos indivíduos tinham valores entre as 100 U/L e as 200 U/L e em 3,8% (7/184) dos indivíduos foram encontrados valores superiores a 200 U/L.

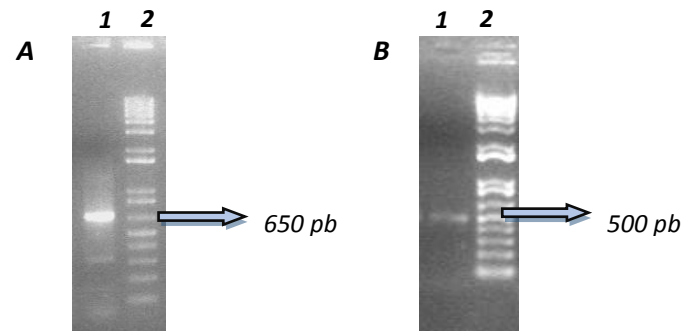
#### 4.2 Amplificação das regiões NS5B, NS3 e C/E1 do VHC

As 449 amostras de plasma foram processadas laboratorialmente para a amplificação da região NS5B do VHC. Apenas uma amostra (TX178) foi amplificada para as regiões NS3 e C/E1 do VHC. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose. A figura 4.2 é um exemplo ilustrativo dos resultados obtidos para algumas amostras amplificadas na região NS5B do VHC.



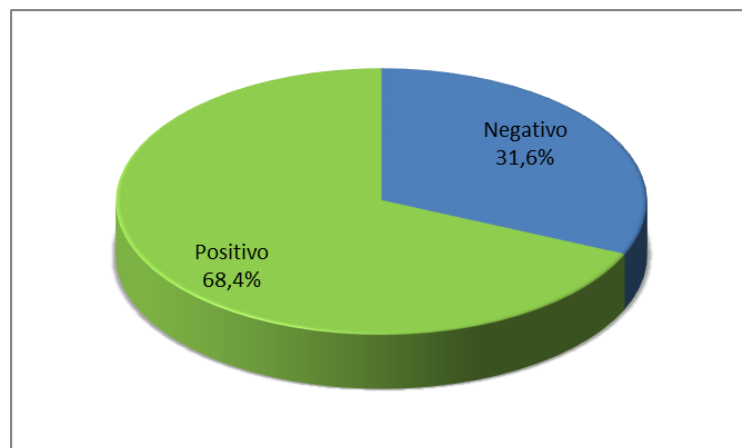
**Figura 4. 2** - Produtos de PCR amplificados da região NS5B, visualizados em gel de agarose. No poço 1 foi aplicado um controle negativo, nos poços 2 a 6 foram aplicadas amostras em estudo e no poço 7 foi aplicado o marcador "1 kb Plus DNA Ladder".

Os resultados da amplificação das regiões NS3 e C/E1 do VHC para a amostra TX178, encontram-se apresentados na figura 4.3.



**Figura 4. 3** - Produtos de PCR obtidos para a amostra TX178 correspondentes à amplificação da região NS3 (A) e região C/E1 (B), visualizados em gel de agarose. No poço 2 foi aplicado o marcador “1 kb Plus DNA Ladder”.

Nas 449 amostras analisadas foi detetada a presença de RNA do VHC em 307 amostras (resultado positivo) e ausência de RNA do VHC em 142 amostras (resultado negativo) (fig. 4.4). Assim, determinou-se uma infecção ativa pelo VHC em 68,4% dos indivíduos da população estudada.



**Figura 4. 4** - Distribuição dos resultados positivos e negativos de RNA do VHC na população estudada.

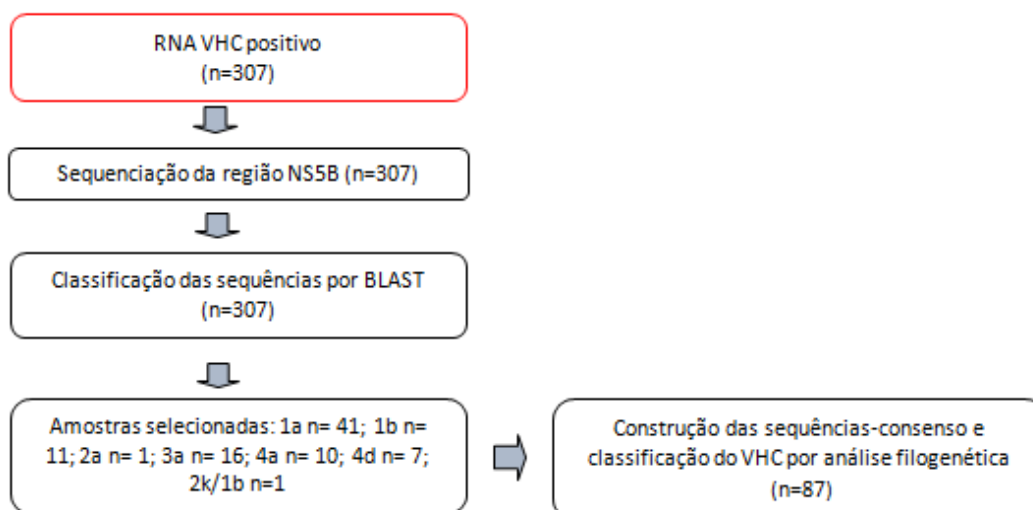
### 4.3 Sequenciação das amostras e classificação das sequências NS5B por BLAST

Todas as amostras amplificadas para a região NS5B do VHC (n=307) foram purificadas e sequenciadas. As sequências obtidas foram classificadas por BLAST, sendo identificadas infecções pelos genótipos 1, 2, 3 e 4 e a presença do recombinante 2k/1b na população estudada. Os resultados desta classificação encontram-se descritos na tabela 4.3

**Tabela 4. 3** - Resultados da análise por BLAST das sequências NS5B do VHC.

Classificação por BLAST das sequências NS5B (n=307)	1a	1b	2a	3a	4a	4d	2k/1b
Sequências classificadas (n)	137	33	1	90	23	22	1
Proporção na população total (%)	44,6	10,8	0,3	29,3	7,5	7,2	0,3

A limitação de tempo para o desenvolvimento do presente estudo, não permitiu obter um número de sequências suficiente para a construção de consensos para todas as amostras. Desta forma, optou-se por complementar o estudo da classificação do VHC através da seleção de um grupo de 87 amostras. Assim, nestas amostras foi efetuada a sequenciação de cadeias de DNA em ambos os sentidos (com os primers direto e reverso) e construção de sequências consenso a utilizar na análise filogenética para a classificação do VHC. A figura 4.5 apresenta o organigrama do trabalho seguido para a caracterização das 87 amostras selecionadas.



**Figura 4. 5** - Organigrama do trabalho seguido com a caracterização das amostras selecionadas para a filogenia.

#### 4.4 Classificação filogenética de sequências NS5B

Foram construídas as sequências de consenso da região NS5B do VHC para as 87 amostras selecionadas. A construção da árvore filogenética para a região NS5B do VHC foi realizada com base no alinhamento das 87 sequências consenso e 44 sequências de referência de diferentes subtipos e recombinantes do VHC. A topologia da árvore NS5B revelou que as sequências formaram agrupamentos robustos para os diferentes subtipos do VHC, suportados por elevados valores de *bootstrap* (91% a 100%) permitindo de uma forma clara a classificação da totalidade das sequências em estudo (figuras 4.6 e 4.7).

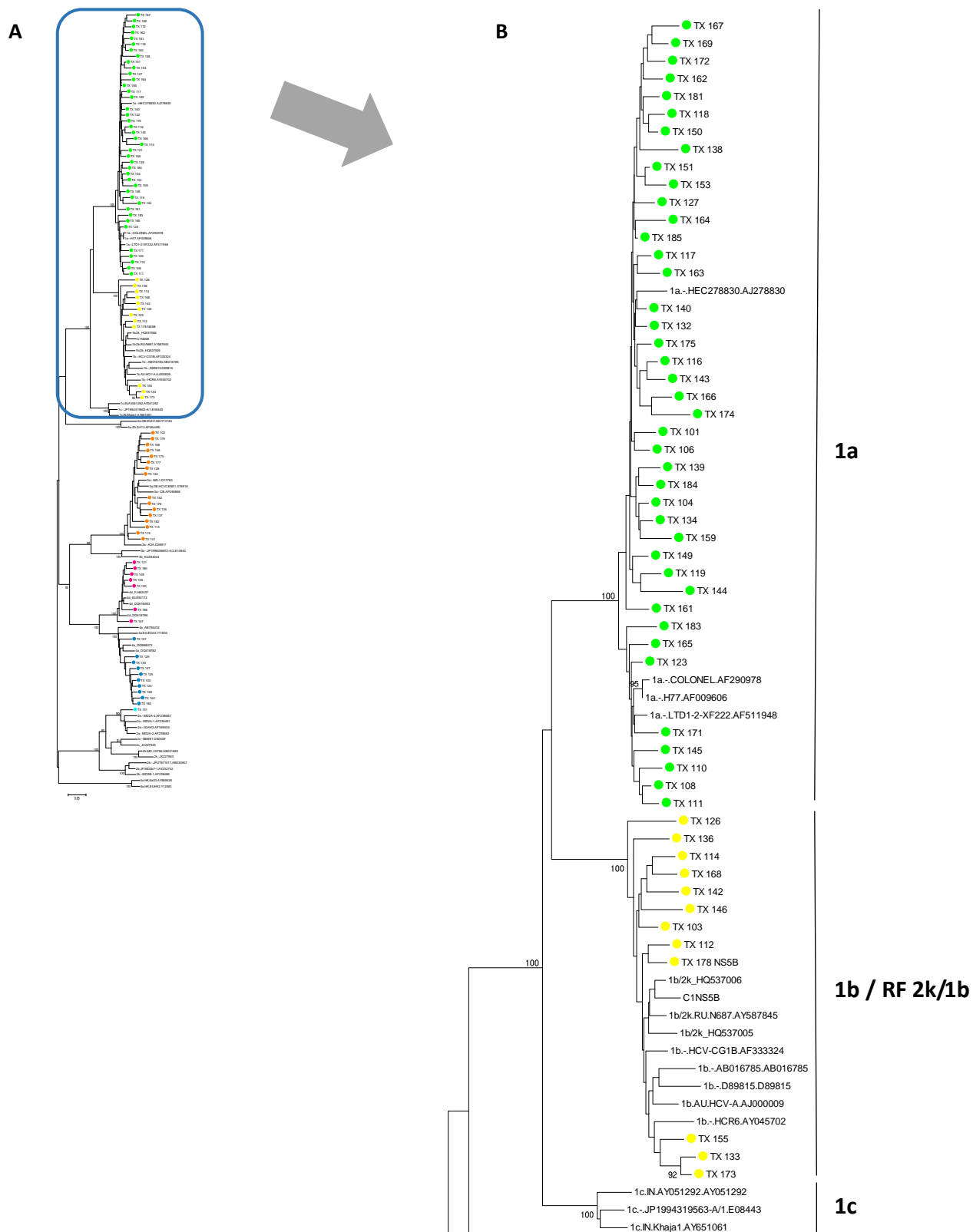
A maioria das sequências em estudo (53/87) agrupou com sequências de referência para o genótipo 1 (*bootstrap* de 100%), verificando-se que 41 sequências foram classificadas em subtipo 1a e

12 sequências em subtipo 1b. Os agrupamentos de sequências 1a e 1b do VHC foram suportados com um valor de *bootstrap* de 100%. De salientar que no *cluster* de referências do subtipo 1b se observou as sequências de referência RF 2k/1b, sem que fosse observada uma subestruturação dos respetivos agrupamentos (valor de *bootstrap* não significativo). De facto, o genoma do RF 2k/1b na região NS5B é subtipo 1b, sendo por isso esperado que as sequências deste recombinante agrupem com as sequências de referência do subtipo 1b.

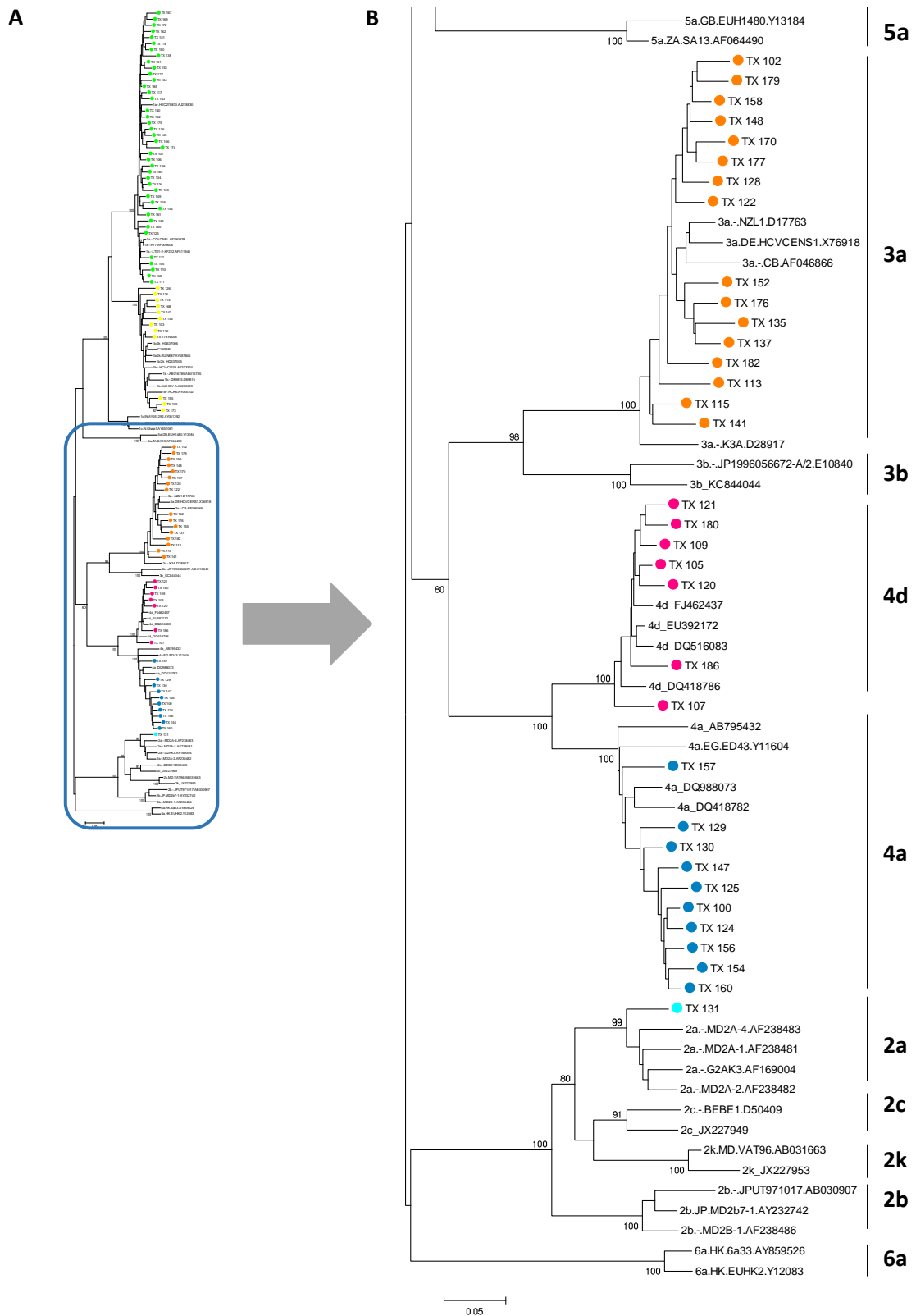
As 16 sequências em estudo observadas no agrupamento correspondente ao genótipo 3 (*bootstrap* de 98%) agruparam com sequências de referência do subtipo 3a com um *bootstrap* de 100%.

No agrupamento correspondente a sequências classificadas em genótipo 4 (*bootstrap* de 100%), verificou-se que 10 sequências em estudo agruparam com sequências de referência para o subtipo 4a e 7 sequências em estudo agruparam com sequências de referência para o subtipo 4d, ambos os *clusters* suportados com valores de *bootstrap* de 100%.

Apenas uma sequência em estudo (TX 131) foi observada no agrupamento de sequências do genótipo 2 (*bootstrap* de 100%), agrupando especificamente com sequências de referência do subtipo 2a com valor de *bootstrap* de 99%.



**Figura 4. 6 - A)** Árvore filogenética da região NS5B do VHC ilustrando as relações filogenéticas entre as seqüências em estudo com as seqüências de referência representativas dos diferentes subtipos do VHC. Em A, o retângulo delimita a zona da árvore ampliada que é apresentada em B; B) Os círculos a cores representam as seqüências em estudo com a respectiva classificação dos subtipos de VHC destacada lateralmente à direita. A seqüência TX178 (seta) foi classificada em subtipo 1b na região genômica em análise.



**Figura 4. 7** - A) Árvore filogenética da região NS5B do VHC ilustrando as relações filogenéticas entre as seqüências em estudo com as seqüências de referência representativas dos diferentes subtipos do VHC. Em A, o retângulo delimita a zona da árvore ampliada que é apresentada em B; B) Os círculos a cores representam as seqüências em estudo com a respectiva classificação dos subtipos de VHC destacada lateralmente à direita.

a) Comparação dos resultados Filogenia vs *BLAST*

Os resultados da classificação filogenética das 87 sequências consenso em estudo para a região NS5B do VHC foram comparados com os resultados previamente obtidos em *BLAST* (tabela 4.4). Constatou-se uma discordância de resultados para a sequência TX178. A análise por *BLAST* indicou que a sequência TX178 era semelhante a sequências RF 2k/1b, no entanto, essa sequência foi classificada na árvore filogenética em subtipo 1b. No sentido de investigar a hipótese de se estar perante um caso de uma forma recombinada de VHC, foram amplificadas as regiões NS3 e C/E1 e construídas as respectivas árvores filogenéticas para cada uma das regiões genômicas.

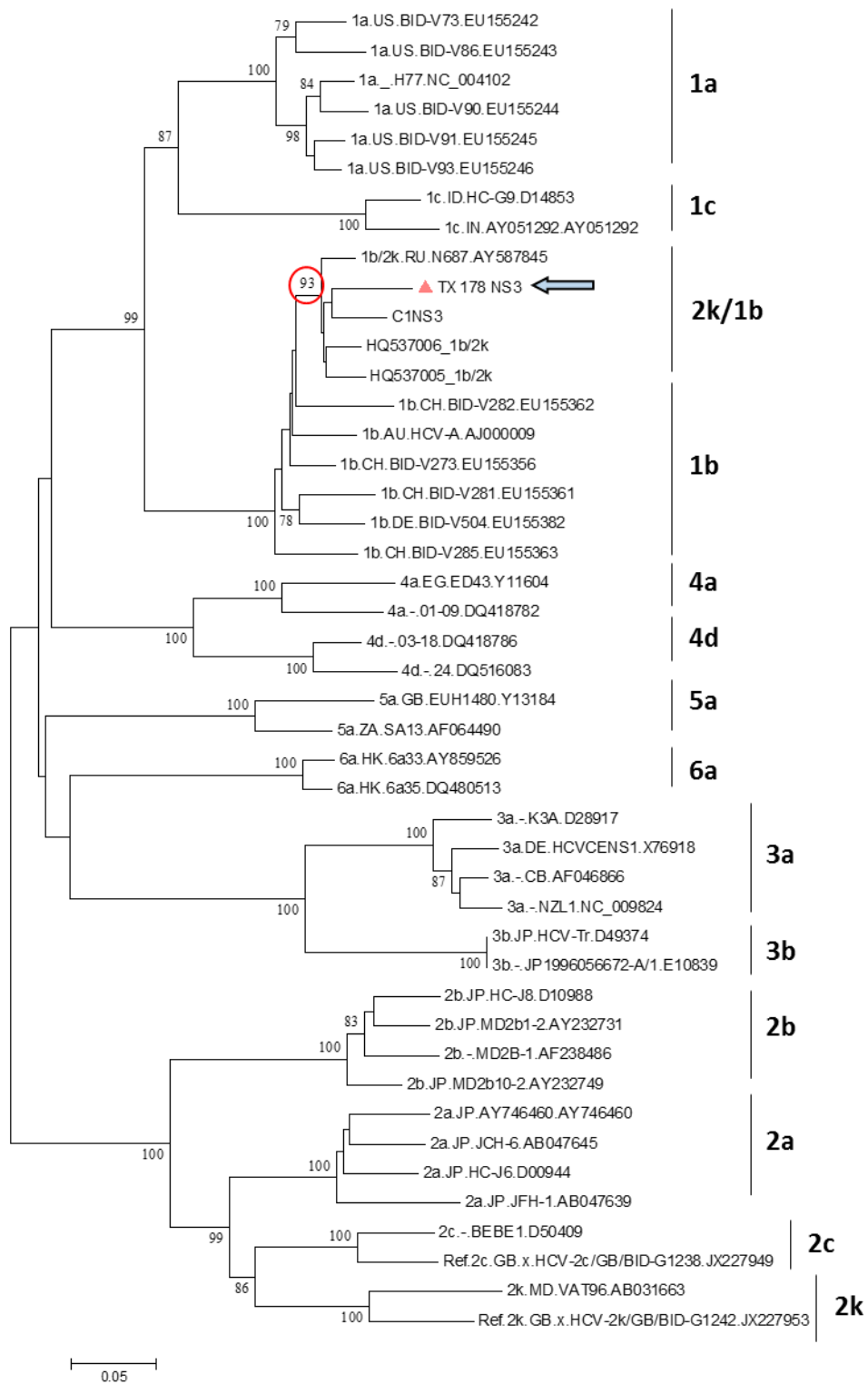
**Tabela 4. 4** - Comparação dos resultados de *BLAST* e Filogenia nas 87 amostras selecionadas

Amostras selecionadas (n=87)	Classificação das sequências NS5B do VHC						
	1a	1b	2a	3a	4a	4d	2k/1b
Classificação por <i>BLAST</i>	41	11	1	16	10	7	1
Classificação por filogenia	41	12	1	16	10	7	0

b) Análise filogenética da região NS3 do VHC

A árvore filogenética da região NS3 foi realizada a partir do alinhamento da sequência TX178 e 44 sequências de referência dos diferentes subtipos do VHC, incluindo um grupo de sequências de referência da RF 2K/1b.

A topologia da árvore da região NS3 revelou agrupamentos de sequências para os diferentes subtipos de VHC com valores de *bootstrap* de 100%. No grupo de sequências de referência do subtipo 1b (*bootstrap* 100%), observou-se uma subestruturação clara, contendo a sequência TX178 com sequências de referência do RF 2k/1b, agrupadas com um elevado valor de *bootstrap* (93%). O facto das sequências de referência deste recombinante agruparem com as sequências do subtipo 1b seria de esperar, atendendo a que o genoma da RF 2k/1b na região NS3 ser classificado como subtipo 1b (figura 4.8). Nesta análise observaram-se relações filogenéticas entre a sequência TX178 e as sequências de referência RF 2k/1b.

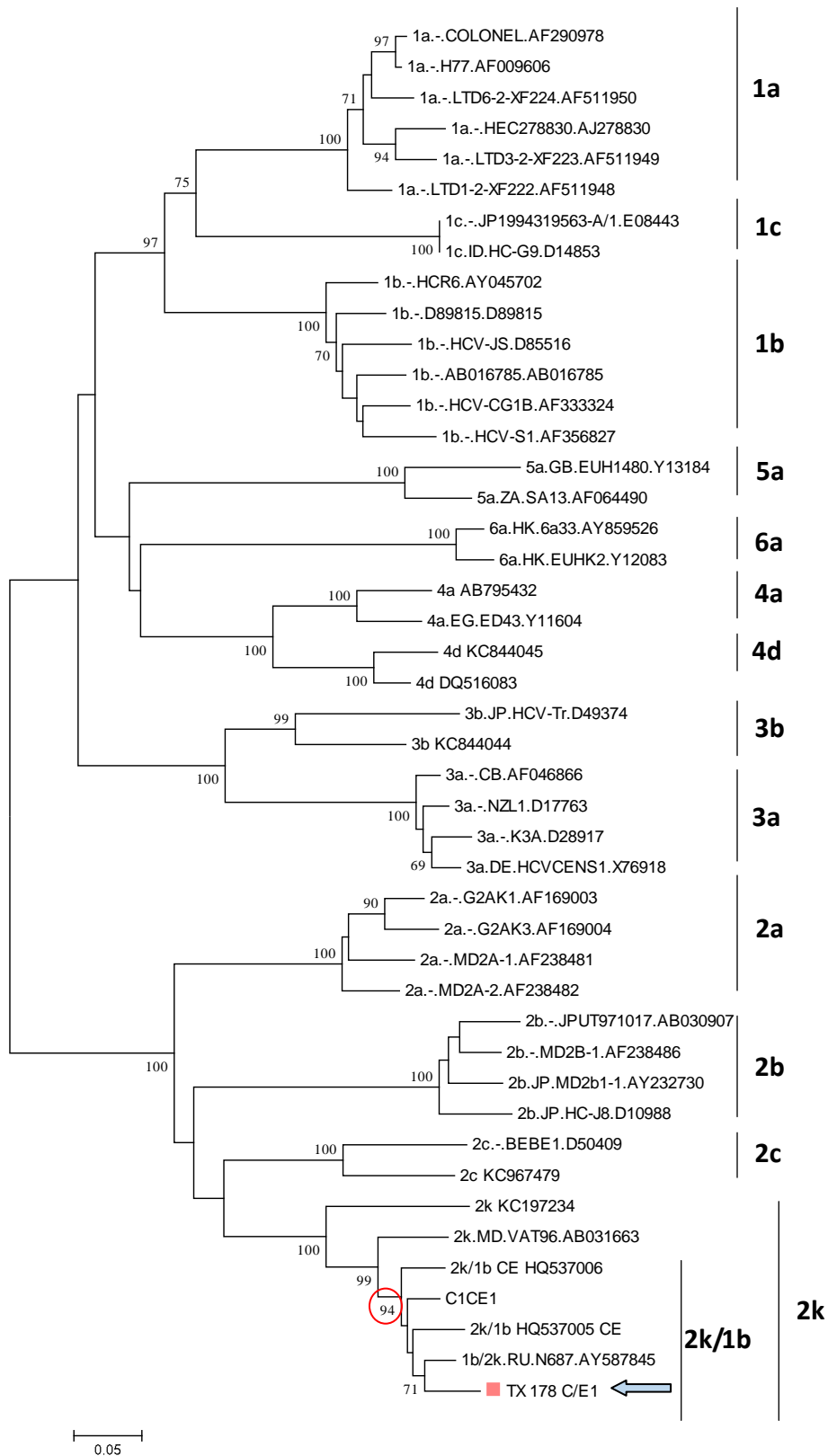


**Figura 4. 8** - Árvore filogenética construída para a região NS3 do VHC mostrando as relações filogenéticas entre a sequência TX 178 (seta) e as sequências de referência RF 2k/1b agrupadas com um valor de bootstrap de 93%.

c) Análise filogenética da região C/E1 do VHC

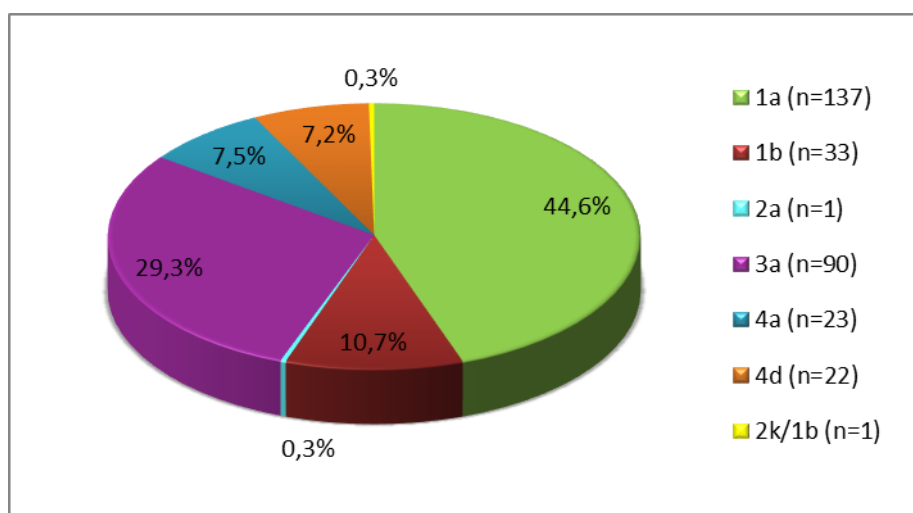
A construção da árvore filogenética da região C/E1 foi realizada através do alinhamento da sequência TX 178 em estudo com 41 sequências de referência de diferentes subtipos do VHC, incluindo as sequências de referência representativas da RF 2K/1b.

A topologia da árvore C/E1 revelou agrupamentos robustos para as sequências de referência representativas dos diferentes subtipos virais de VHC (*bootstrap* de 100%). A sequência consenso TX178 foi observada agrupada com sequências de referência 2k/1b com um valor de *bootstrap* de 94%. A topologia da árvore inferiu ainda que, este agrupamento de sequências 2k/1b corresponde a uma clara subestruturação do agrupamento de sequências de referência classificadas em 2k (*bootstrap* de 100%) (figura 4.9). De salientar que o genoma da RF 2k/1b na região C/E1 foi classificado como subtipo 2k, sendo por isso de esperar a existência de relações filogenéticas entre a sequência TX 178 e as sequências de referência do subtipo 2k (*bootstrap* de 100%).



**Figura 4. 9** - Árvore filogenética construída para a região C/E1 do VHC, mostrando as relações filogenéticas entre a sequência TX 178 (seta) e as sequências de referência 2k/1b agrupadas com um valor de bootstrap de 94%.





**Figura 4.11** - Frequência dos subtipos do VHC identificados na população com infecção ativa

#### 4.7 Análise da relação entre os níveis de ALT e a presença ou ausência de RNA

Nesta análise foram comparados os níveis de ALT obtidos no grupo de amostras negativas e no grupo de amostras positivas para RNA do VHC. Constatou-se que os valores de ALT no grupo de amostras com RNA do VHC (mediana 42 U/L) foram bastante superiores aos valores obtidos no grupo de amostras em que não foi detectada a presença de RNA (mediana 14 U/L) (tabela 4.5).

**Tabela 4.5** - Variação dos níveis de ALT na população total e agrupada (RNA positivo e RNA negativo)

Valores de ALT (U/L)	População total (n=449)	Grupo RNA VHC pos (n=307)	Grupo RNA VHC neg (n=142)
Mediana	32	42	14
Valor máximo	1216	1216	162
Valor mínimo	6	9	6

Adicionalmente, observou-se também que no grupo de amostras com resultado de RNA VHC positivo, 172 (56,0%) apresentaram alteração nos valores de ALT, das quais 125 (72,7%) amostras exibiam valores até 100 U/L, 40 (23,3%) tinham valores entre 100 e 200 U/L e 7 (4,1%) apresentavam valores superiores a 200 U/L. No entanto, nas amostras com resultados de RNA VHC negativo, apenas 12 (8,5%) apresentaram alteração nos valores de ALT, das quais 9 (75,0%) tinham valores até 100 U/L e 3 (25,0%) exibiam valores entre 100 e 200 U/L. Nenhuma amostra deste grupo apresentou valores superiores a 200 U/L. Verificou-se que a alteração dos níveis de ALT não é independente do resultado de RNA do VHC, ou seja, existe associação estatisticamente significativa entre os indivíduos com valores alterados do marcador hepático ALT e uma infecção ativa por VHC (RNA positivo) ( $P < 0,0001$ ).

#### 4.8 Análise da relação entre os valores de ALT e os subtipos do VHC

A variação dos valores de ALT (média e mediana) foi analisada para os diversos subtipos de VHC identificados na população estudada. Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 4.6, observando-se valores médios de ALT mais elevados para o grupo de infecções pelo subtipo 3a.

*Tabela 4.6 - Associação dos valores de ALT com os subtipos do VHC*

Valores de ALT	Subtipos do VHC				
	1a (n=137)	1b (n=33)	3a (n=90)	4a (n=23)	4d (n=22)
Média (U/L)	54	69	80	50	60
Mediana (U/L)	37	53	53	33	40

#### 4.9 Análise da relação entre o conhecimento dos indivíduos sobre a sua situação clínica e a presença ou ausência de RNA viral

Na análise das respostas dos indivíduos sobre a sua situação clínica, constatou-se que 350 afirmaram ter ou já ter tido hepatite C no passado. Neste grupo de indivíduos verificou-se que 71,0% (248/350) apresentava RNA VHC positivo e apenas 29,0% (102/350) tinha a infecção resolvida. No entanto, foi confirmada a presença de RNA do VHC em 63,2% (36/57) dos indivíduos que afirmaram desconhecer a sua situação clínica em relação à hepatite C e também em 55,0% (23/42) dos indivíduos que disseram nunca ter tido hepatite C.

#### 4.10 Análise da relação entre tratamento e a presença de RNA do VHC

Analisando o grupo de indivíduos que afirmou não ter feito tratamento para a hepatite C (n=284), constatou-se que 75,4% (214/284) apresentava infecção ativa por VHC. Neste grupo de indivíduos que não fez tratamento, estavam incluídos 10 indivíduos que afirmaram ter resolvido a infecção de forma espontânea, no entanto, 4 (40%) deles mantinha uma infecção ativa.

Por outro lado, no grupo de 62 indivíduos que respondeu ter feito tratamento para a hepatite C, verificou-se que metade deles mantinha a infecção ativa. Adicionalmente, no subgrupo de 38 indivíduos que afirmou ter sido tratado com sucesso, 40% deles também mantinha uma infecção ativa por VHC. Na análise efetuada constatou-se que existe uma associação estatisticamente significativa entre a ausência de tratamento para a hepatite C e a presença de infecção ativa nos indivíduos ( $P = 0,0002$ ).

#### 4.11 Análise da relação entre a via de consumo de drogas e a presença de RNA

Os indivíduos da população estudada foram distribuídos por grupos tendo em conta a via de consumo de drogas ilícitas. Assim, foi formado um primeiro grupo de indivíduos caracterizado por consumir drogas por via endovenosa (363/449) e um segundo grupo de indivíduos caracterizado por consumir de drogas por via inalada e/ou fumada (86/449). Observou-se que no primeiro grupo, 69,0% (250/363) dos indivíduos apresentavam infecção ativa pelo VHC e no segundo grupo 66,3% (57/86) dos indivíduos apresentam infecção ativa por VHC. Constatou-se que não existia associação estatisticamente significativa entre a via de consumo de drogas ilícitas (injetáveis ou inaladas e/ou fumadas) e a presença ou ausência do RNA do VHC ( $p= 0,6990$ ).

#### 4.12 Análise da relação entre a via de consumo de drogas e os subtipos de VHC

O tipo de consumo de drogas ilícitas injetáveis e não injetáveis (inaladas e/ou fumadas) foi analisado em conjunto com a distribuição dos subtipos do VHC. Observou-se uma maior proporção de infecção pelo subtipo 1a em indivíduos que consumiam drogas por via injetável, e uma maior proporção de infecção pelo subtipo 3a em indivíduos que consumiam drogas por via fumada e/ou inalada (tabela 4.7).

*Tabela 4. 7 - Relação entre a distribuição dos subtipos do VHC e a via de consumo das drogas ilícitas.*

Grupos populacionais	Subtipos do VHC identificados na população estudada							Total
	1a	1b	3a	4a	4d	2a	2k/1b	
Drogas Injetáveis	46,0%	11,2%	26,4%	7,6%	8,0%	0,4%	0,4%	100%
Drogas Inaladas/Fumadas	38,6%	8,8%	42,1%	7,0%	3,5%	0,0%	0,0%	100%

#### 4.13 Análise da relação entre o nível de escolaridade e a percepção dos indivíduos sobre a gravidade da hepatite C

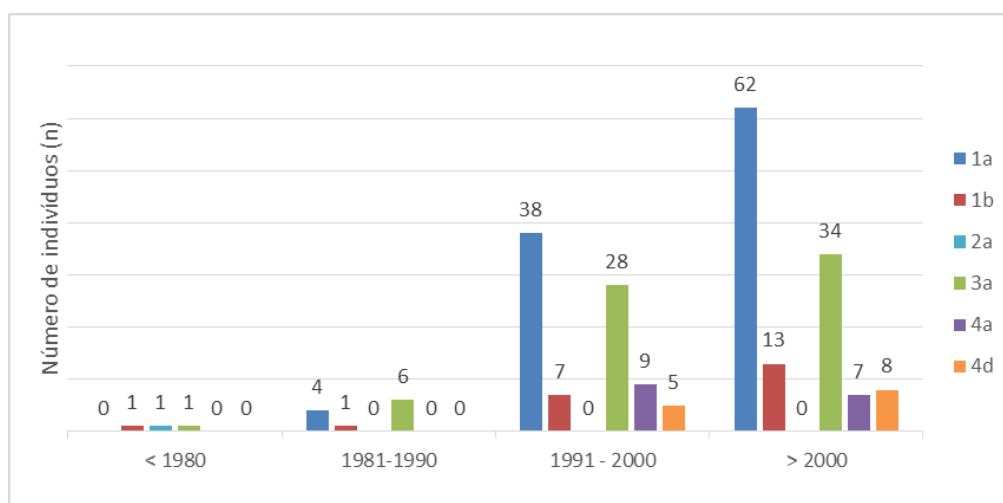
Independentemente do nível de escolaridade dos indivíduos, constatou-se que a maioria deles considerava a hepatite C como uma doença grave (80,4%; 361/449). No entanto, 21,5% (76/353) dos indivíduos com frequência do ensino básico (1º, 2º ou 3º ciclos) desconhecia ou não considerava a hepatite C uma doença grave. Adicionalmente, ainda se constatou que 10,1% (9/89) dos indivíduos com o ensino secundário ou superior desconhecia ou não considerava a hepatite C uma doença grave. No entanto, pela análise da tabela 4.8, verificou-se que a proporção de indivíduos que considerava a hepatite C grave vai crescendo com o aumento do nível de escolaridade dos indivíduos.

**Tabela 4. 8 - Análise do nível de escolaridade e a percepção dos indivíduos sobre a gravidade da hepatite C**

Considera a hepatite C uma doença grave?				
Nível de escolaridade dos indivíduos	Desconhece	Não	Sim	TOTAL
≤ 1º ciclo	n=13 10,2 %	n=23 18,1%	n=91 71,7%	n=127 100%
2º e/ou 3º ciclo	n=12 5,3%	n=28 12,4%	n=186 82,3%	n=226 100%
Ensino secundário	n=0 0,0%	n=7 11,5%	n=54 88,5%	n=61 100%
Ensino Superior	n=2 7,1%	n=0 0,0%	n=26 92,9%	n=28 100%
NR	n=1 14,3%	n=2 28,6%	n=4 57,1%	n=7 100%

#### 4.14 Análise da distribuição dos subtipos do VHC de acordo com o ano de diagnóstico

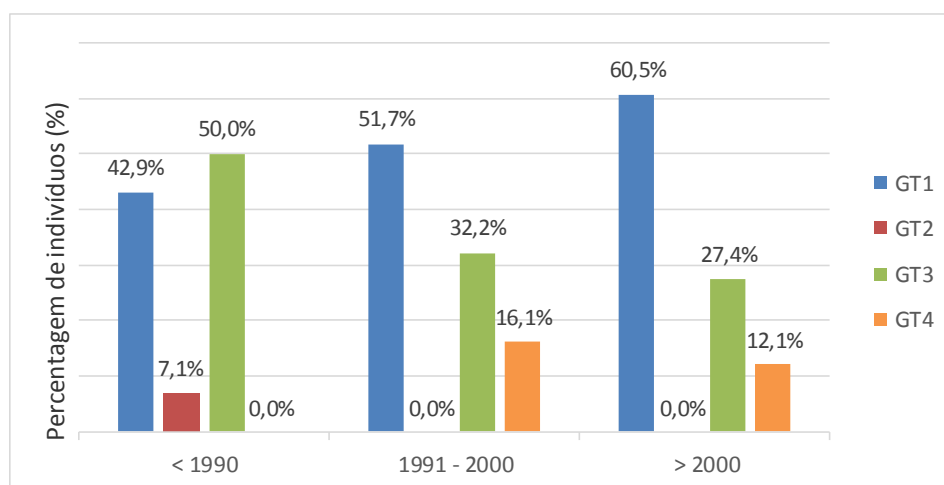
Na população estudada, a maioria das infecções por VHC foram diagnosticadas a partir de 1991. Independentemente dos intervalos de tempo estabelecidos, observou-se uma maior frequência de infecções pelos subtipos 1a e 3a. Por outro lado, foi identificado apenas um único caso de infecção pelo genótipo 2 (subtipo 2a) (fig. 4.12).



**Figura 4. 12 - Distribuição dos subtipos do VHC por intervalo de tempo, atendendo ao ano de diagnóstico da infecção.**

Os resultados obtidos sugerem que a infecção pelo genótipo 3 (subtipo 3a) foi mais frequente até 1990, e que posteriormente decresceu ao longo do tempo (50,0% > 32,2% > 27,4%). Contrariamente, os diagnósticos de infecção pelo genótipo 1 aumentaram de frequência ao longo do tempo (42,9% < 51,7% < 60,5%) (fig. 4.13). Relativamente à infecção pelo genótipo 4 (subtipos 4a e 4d), verificou-se que foram diagnósticos conhecidos na população estudada a partir de 1991 e numa percentagem significativa de casos (fig. 4.12 e 4.13). No entanto, é de salientar que apenas 14

indivíduos com infecção ativa por VHC foram distribuídos nos intervalos de tempo estabelecidos com data de diagnóstico até 1990.



**Figura 4. 13-** Distribuição dos genótipos do VHC por intervalo de tempo, atendendo ao ano de diagnóstico da infecção pelo VHC.

## **5. Discussão**

## 5. Discussão

A infecção pelo vírus da hepatite C representa um dos principais problemas de saúde pública, estimando-se que afete cerca de 150 milhões de pessoas, e que anualmente, possa conduzir à morte de 700 mil pessoas no mundo (WHO, 2016 e Negro, 2014). Nos países desenvolvidos, observa-se que a transmissão do VHC ocorre principalmente em grupos populacionais com comportamentos de risco, especialmente em utilizadores de drogas endovenosas que partilham material de injeção durante o consumo. Estudos realizados nestes grupos populacionais indicaram que a prevalência da infecção pode atingir os 90% (Ghany *et al*, 2009).

O vírus da hepatite C apresenta uma elevada diversidade genética que é representada pelos múltiplos genótipos e subtipos do VHC distribuídos nas diferentes regiões geográficas do mundo. A infecção é caracterizada pela presença de uma população relativamente heterogénea de *quasiespecies* virais que podem ser selecionadas no processo de adaptação, e que é imposto por pressão seletiva no hospedeiro. A seleção de variantes virais pode ser influenciada quer pelo sistema imunitário quer pelos fármacos utilizados no tratamento da doença crónica (Simmonds, 2004, Argentini *et al*, 2010 e Kim e Kyong-Mi, 2013).

Atualmente, com os novos antivirais de ação direta contra o VHC é possível curar cerca de 90% dos doentes crónicos. Este tratamento conduziu a uma melhoria acentuada na resposta virológica sustentada e na qualidade de vida dos doentes (WHO, 2016 e Banerjee e Reddy, 2016). No entanto, ainda não se conseguiu a eliminação do vírus para todos os doentes tratados.

O objetivo deste estudo foi conhecer a proporção de infecção ativa numa população de indivíduos com anticorpos para o VHC com comportamentos de risco no consumo de drogas ilícitas. A caracterização da população estudada foi realizada pela análise de dados demográficos, educacionais, socioeconómicos, epidemiológicos e clínicos, recolhidos através de um questionário no momento da colheita das amostras sanguíneas.

Neste contexto, analisou-se uma população constituída por 449 indivíduos, tendo as amostras sanguíneas sido colhidas entre julho de 2015 e janeiro de 2016. Verificou-se que 80,4% dos participantes era do sexo masculino, sendo a idade média da população de 44 anos. Observou-se ainda que 92,2% dos participantes era de nacionalidade Portuguesa e apenas 7,1% oriundos de outros países europeus, africanos e americanos.

O nível de escolaridade da população estudada era relativamente baixo, constatando-se que 28,3% dos indivíduos frequentou apenas o 1º ciclo de escolaridade. Em contraste, 6,2% dos indivíduos afirmaram ter frequentado o ensino superior. Os restantes participantes tinham uma frequência entre o 2º e/ou o 3º ciclo do ensino básico.

Dificuldades a nível socioeconómico são previsíveis na população estudada. A maioria dos participantes referiu encontrar-se numa situação de desemprego. Apenas 15,1% dos indivíduos referiu ter atividade laboral estável. Adicionalmente, constatou-se também que 10,3% dos indivíduos não tinha abrigo.

Na avaliação da perceção dos indivíduos sobre a hepatite C, observou-se que 13,4% não a considerava uma doença grave e 6,2% afirmou desconhecer o assunto. Analisando o conhecimento individual dos participantes relativamente ao seu estado serológico para a hepatite C, verificou-se que 9,0% afirmaram não estar infetados e 13,0% desconheciam a sua situação clínica. Por outro lado, os indivíduos que referiram o ano de diagnóstico da infecção por VHC, 41,6% afirmaram conhecê-lo há

mais de 15 anos. Apesar do tempo e da enorme proporção de indivíduos que sabiam estar infetados pelo VHC, 81,1% não fez qualquer tratamento.

Diferentes comportamentos de risco foram identificados na população estudada. Embora todos os indivíduos fossem consumidores de drogas ilícitas, 80,9% faziam-no por via injetável e 45,7% deles afirmaram partilhar material e agulhas durante os consumos. Nos restantes indivíduos que excluíram o consumo por via endovenosa, 19,2% referiram consumir por via inalada e/ou fumada. Observou-se ainda que, o tempo de consumo de drogas ilícitas variou entre os 4 e os 48 anos (média de 27 anos), existindo 46,8% de indivíduos que iniciaram o consumo entre os anos 80 e 90 do século passado. Apesar dos indivíduos frequentarem um programa de substituição por metadona, 23% ainda mantinha o consumo de drogas ilícitas à data do preenchimento do questionário.

A partir de plasma obtido dos 449 indivíduos em estudo foi realizada a extração de RNA, síntese de cDNA e amplificação por heminested\_PCR da região NS5B do VHC. Apenas em 31,6% das amostras analisadas foi obtido um resultado negativo, revelando que estes indivíduos apresentavam uma infeção por VHC resolvida (presença de anticorpos e ausência de RNA viral). Por outro lado, em 68,4% das amostras foi confirmado um resultado positivo, pelo que este grupo de indivíduos apresentava uma infeção ativa pelo VHC. A elevada prevalência da infeção ativa pelo VHC encontrada neste estudo está de acordo com outros estudos que descrevem entre 70 a 90% de infeção ativa neste tipo de população (Ghany *et al*, 2009 e Calado *et al* 2011). Num estudo português (Silva *et al*, 2015) realizado a uma população de utilizadores de drogas coinfetada com o VIH, foi obtida uma prevalência de infeção ativa de 70,5%, resultado bastante semelhante ao encontrado no presente estudo.

Os produtos purificados da região NS5B foram sequenciados, e as sequências editadas no programa *Chromas* seguindo-se a sua classificação. A análise revelou diferentes subtipos do VHC, nas seguintes proporções: 44,6% de subtipo 1a, 29,3% de subtipo 3a, 10,8% de subtipo 1b, 7,5% pelo subtipo 4a, 7,2% de subtipo 4d e 0,3% de subtipo 2a. Foi ainda detetado um caso de infeção pelo recombinante RF 2k/1b na população estudada.

Uma elevada prevalência de infeção pelos subtipos 1a e 3a e uma baixa frequência da infeção pelo subtipo 2a foi obtida na população estudada. Estes resultados estão de acordo com diversos estudos realizados (Calado *et al*, 2011; Pádua *et al*, 2015 e Silva *et al*, 2015) em utilizadores de drogas ilícitas em Portugal. De facto, estes estudos, para além de apresentarem prevalências de subtipos do VHC semelhantes, também descrevem a ausência da infeção pelos génotipos 5, 6 e 7.

No presente estudo foi confirmado um caso de infeção pelo recombinante RF 2k/1b num indivíduo do sexo masculino, de 36 anos de idade e natural do Uzebequistão. Contudo, a identificação do RF\_2k/1b neste trabalho não é descrita pela primeira vez em Portugal. Na verdade, a infeção por este recombinante foi descrita em estudos realizados em reclusos (Avó *et al*, 2013) e em toxicodependentes coinfetados com o VIH (Silva *et al*, 2015). O RF\_2k/1b, inicialmente identificado na Rússia e posteriormente em outros países europeus, tem revelado um elevado potencial de transmissão e disseminação na população. No entanto, ainda pouco se conhece sobre os aspetos clínicos desta infeção.

A infeção pelo génotipo 4, prevalente no Médio Oriente e em África, ter-se-á difundido recentemente na Europa através da migração de UDI (Antaki *et al*, 2009). No presente estudo, observou-se a presença da infeção pelos subtipos 4a e 4d apenas em diagnósticos conhecidos após 1991. De facto, este génotipo parece ter sido introduzido mais recentemente na população portuguesa. Verificou-se ainda que, na população estudada, os diagnósticos de infeção pelo génotipo 3 decrescem

ao longo do tempo, contrariamente aos diagnósticos de infecção pelo genótipo 1. Num estudo português realizado com amostras colhidas entre 1998 e 2009 a toxicodependentes, observou-se também o aumento da prevalência do genótipo 1. No entanto, a prevalência dos genótipos 3 e 4 manteve-se semelhante ao longo do período de tempo do estudo (Calado *et al*, 2011).

Por existir limite de tempo na realização deste trabalho, foram selecionadas 87 amostras para a construção de sequências de consenso e a respetiva avaliação por inferência filogenética, de forma a comparar os resultados de classificação de sequências obtidos na análise por *BLAST*.

A árvore filogenética da região NS5B permitiu a classificação da totalidade das sequências em estudo. Com a exceção da amostra TX178, os resultados foram concordantes com a classificação prévia por *BLAST*.

De um modo geral, é reconhecido que a análise de uma única região genómica pode ser limitativa para a deteção de recombinação genética. Desta forma, a amostra TX178 classificada em RF\_2k/1b por *BLAST* e subtipo 1b na árvore NS5B, foi amplificada para as regiões NS3 e C/E1. Na análise das árvores filogenéticas construídas para estas regiões genómicas, observou-se a formação de um *cluster* entre a sequência TX178 e as sequências de referência do RF\_2k/1b, suportado por valores de *bootstrap* elevados (superiores a 90%). No entanto, os *clusters* 2k/1b integravam o agrupamento das referências do subtipo 1b na árvore da região NS3 e do subtipo 2k na árvore da região C/E1. De facto o RF\_2k/1b apresenta um único ponto de recombinação na região genómica NS2, sendo a região 5' do genoma semelhante ao subtipo 2k e a região 3' do genoma semelhante ao subtipo 1b (Kalinina *et al*, 2002 e Raghwan *et al*, 2011). Desta forma, apesar de na árvore da região NS5B a sequência TX178 não formar um *cluster*, suportado por valores de *bootstrap* significativo com as sequências de referência 2k/1b, a classificação em subtipo 1b seria de esperar atendendo à região genómica em estudo.

A análise de mutações de resistência a inibidores da polimerase (ao Dasabuvir e ao Sofosbuvir) foi realizada para as 87 sequências consenso da região NS5B. Atendendo à dimensão do fragmento amplificado (codões 243 a 343) foram apenas analisadas as alterações nas posições: 282, 289, 293 e 316 da polimerase NS5B.

Observou-se a presença de substituições aminoácidas em posições que podem conferir resistência a inibidores da polimerase nas seguintes sequências: TX 131, TX 133, TX 155, TX 173 e TX183. No entanto, na sequência TX 131, a posição em que ocorre a substituição (289), é descrita na literatura por restabelecer o *fitness* do vírus quando ocorre a mutação S282T, não levando à resistência ao Sofosbuvir (Lam *et al*, 2012). Nas sequências TX 133, TX 155 e TX 173, correspondentes a infeções pelo subtipo 1b, detetou-se uma substituição C316N que está associada a uma redução de suscetibilidade ao Dasabuvir. Na sequência TX 183, correspondente à infecção pelo subtipo 1a, observou-se uma mutação C316Y que confere resistência ao Dasabuvir. Assim, identificou-se a presença de mutações C316N/Y em 4 indivíduos que nunca foram expostos a antivirais. Relativamente ao Sofosbuvir, não foram encontradas mutações de resistência nas sequências analisadas. No entanto, é importante realçar que devido ao facto de a análise de mutações de resistência se ter efetuado apenas em algumas posições da NS5B, não se pode excluir a possibilidade de existirem mutações de resistência em outras posições ou regiões do genoma (NS3/4A e NS5A) e que não foram estudadas.

Na avaliação dos marcadores hepáticos, verificou-se que 41,0% dos indivíduos apresentavam alterações de ALT, particularmente o grupo de indivíduos com infecção ativa pelo VHC. Neste grupo foi obtida uma mediana de 42 U/L, significativamente superior aos 14U/L obtidos no grupo de indivíduos com infecção VHC resolvida. De facto, 56,0% dos casos com RNA positivo, apresentavam

níveis elevados deste marcador hepático, alguns com valores de ALT 10x superiores ao valor de referência, sugerindo nestes casos a possível existência de danos no fígado para estes indivíduos. Em contraste, 91,5% das amostras correspondentes a indivíduos com infeção resolvida foram observados níveis de ALT normais ( $p < 0,0001$ ).

No sentido de averiguar se a alteração dos valores de ALT poderia ser associada a um determinado subtipo do VHC, analisou-se a sua distribuição, verificando-se que no subtipo 3a, os valores de ALT, em média, eram superiores aos valores obtidos para os restantes subtipos. De facto, estudos indicam que a infeção pelo genótipo 3, quando comparada com os restantes genótipos, está associada a uma progressão mais rápida para a fibrose hepática (Bochud *et al*, 2009), sendo espectável um aumento dos valores de ALT em casos de infeção por este genótipo.

No grupo de indivíduos que afirmou não ter hepatite C, verificou-se que 55% tinha infeção ativa e nos indivíduos que desconheciam a sua situação clínica em relação á hepatite C, 63% também apresentavam RNA do VHC. Estes resultados sugerem que os indivíduos possuíam um fraco conhecimento sobre a sua situação clínica em relação à hepatite C. Este desconhecimento pode colocar problemas de Saúde Pública no contexto da transmissão e disseminação do VHC. Na verdade, constatou-se que 40,0% dos indivíduos que afirmaram ter resolvido a infeção por hepatite C ainda mantinham uma infeção ativa.

A eficácia do tratamento da hepatite C evoluiu significativamente nos últimos anos. Passou-se de uma terapia padrão que incluía interferão e cujos efeitos adversos levavam à interrupção do tratamento em muitos doentes (deLemos e Chung, 2014 e Mishra *et al*, 2015) para uma terapia com antivirais (livre de interferão) e com taxas de RVS próximas dos 90%. Na população estudada, observou-se que 284 indivíduos afirmaram nunca ter efetuado qualquer tratamento para a hepatite C, dos quais 75% apresentavam uma infeção ativa por VHC. Várias razões podem estar associadas à baixa taxa de tratamento. Por um lado, os indivíduos parecem não conhecer a sua situação clínica real em relação à hepatite C (infeção ativa ou resolvida), e por outro lado, sendo uma população de toxicod dependentes, o acesso ao tratamento poder estar condicionado à sua adesão às instituições de saúde convencionais a que estes indivíduos raramente recorrem. Também, o baixo rendimento económico (taxa de desemprego elevada) e os custos associados à deslocação a consultas hospitalares podem ser motivos que dificultam a adesão destes indivíduos ao tratamento. Outra razão a considerar, seria eventual receio dos indivíduos relativamente aos efeitos adversos do tratamento.

Em 38 indivíduos que responderam ter feito um tratamento com sucesso para a hepatite C, verificou-se que 39,5% mantinha a presença do RNA do VHC. Este facto sugere que os indivíduos não têm conhecimento correto da sua situação. No entanto, atendendo aos comportamentos de risco continuados destes indivíduos, também não se pode descartar a hipótese de ter ocorrido uma nova infeção após o tratamento.

A maioria dos indivíduos da população estudada considera a hepatite C uma doença grave (361/449; 80,4%). No entanto, 19,6% ( $n=88$ ) dos indivíduos não reconhece a gravidade desta doença. Este facto é preocupante, dado que a transmissão percutânea é uma via eficaz na transmissão do VHC (Zaltron *et al*, 2012) tornando o risco de transmissão do vírus agravado neste grupo populacional. Verificou-se ainda que a proporção de indivíduos que não considera a hepatite C grave vai decrescendo com o aumento do nível de escolaridade. Uma proporção de 21,0% de indivíduos com frequência do ensino básico, comparativamente a 10% de indivíduos com o ensino secundário ou superior, desconhece ou considera que a hepatite C não é uma doença grave ( $p=0.0825$ ).

Na análise dos subtipos foi observada uma maior proporção de indivíduos com infeção pelo subtipo 1a e o consumo de drogas injetáveis e entre indivíduos com infeção pelo subtipo 3a e o consumo de drogas exclusivamente inaladas ou fumadas, embora a associação das variáveis analisadas não tenha sido estatisticamente significativa ( $p= 0,0634$ ). Em contraste, na literatura encontra-se descrita uma associação dos subtipos 1a e 3a ao consumo de drogas injetáveis (Esteban et al, 2008 e Jackowiak et al, 2014).

Na análise dos grupos de indivíduos caracterizados pela via de consumo de drogas ilícitas (injetáveis, inaladas e/ou fumadas) e a infeção por VHC (ativa ou resolvida), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,6990$ ).

Assim, resumidamente, no presente estudo realizado a uma população de indivíduos integrados num Programa de Substituição de Baixo Limiar Exigência da cidade de Lisboa, constatou-se que:

1. A população é maioritariamente masculina, portuguesa, com idade média de 44 anos, tempo médio de consumo de drogas ilícitas de 27 anos, iniciado nos anos 80 do século passado; apresenta elevada taxa de desemprego e baixo nível de escolaridade;
2. Elevada prevalência de infeção ativa pelo VHC, caracterizada por elevados níveis de ALT sugerindo a existência de indivíduos com eventuais danos no fígado;
3. Elevada prevalência dos subtipos 1a e 3a, presença dos subtipos 1b, 4a e 4d, reduzida frequência do genótipo 2 (subtipo 2a), e ainda, identificação de um caso de infeção RF 2k/1b;
4. Identificação de mutações que reduzem a suscetibilidade ao Dasabuvir em 4 indivíduos não expostos a tratamento por antivirais;
5. Elevado desconhecimento da situação real de infeção ativa por VHC nos indivíduos estudados;
6. A maioria dos indivíduos conhece o seu diagnóstico (serológico) e reconhece a gravidade da hepatite C, e não procura o acesso ao tratamento (reduzida taxa de tratamento na população estudada).

## **6. Conclusão**

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a necessidade de implementar uma estratégia que proporcione aos indivíduos desta população um acesso mais adequado e facilitado ao tratamento da hepatite C. De um modo geral, é reconhecido que estes indivíduos (toxicodependentes) são marginalizados socialmente e não recorrem a instituições de saúde convencionais. O desenvolvimento de um programa para o tratamento da hepatite C semelhante ao programa de metadona (PSBLE) em unidades de saúde móveis, aos quais estes indivíduos aderem voluntariamente, poderá conduzir a um enorme benefício para a saúde individual e pública e resultar num maior sucesso ao combate da infeção pelo VHC.

Por outro lado, seria fundamental manter e reforçar os programas de educação para a saúde nesta população, no sentido de reduzir o risco de transmissão do VHC, melhorando o conhecimento individual e a perceção sobre a infeção e gravidade da doença.

## **7. Bibliografia**

## 7. Bibliografia

Ansaldi, F.; Orsi, A.; Sticchi, L.; Bruzzone, B.; Icardi, G. (2014). Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. *World Journal of Gastroenterology*; 20(29): 9633-9652

Antaki, N.; Craxi, Antonio; K., Sanaa; Moucari, R.; Van der Merwe, S.; Haffar, S. et al (2009). The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver International*; ISSN 1478-3223

Argentini, C.; Genovese, D.; Catone, S. (2010). Resistance patterns and genetic variations in patients with hepatitis C virus: emerging role of telaprevir. *Virus Adaptation and Treatment*; 2, 59–62

Ascione, A.; Tartaglione, M.; Di Costanzo, G. (2007). Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Digestive and Liver Disease*; 39, Suppl. 1, S4-S7

Ashfaq, U.; Javed, T.; Rehman, S.; Nawaz, Z.; Riazuddin, S. (2011). An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*, 8:161

Asselah, T. (2011). Daclatasvir plus sofosbuvir for HCV infection: An oral combination therapy with high antiviral efficacy. *Journal of Hepatology*; Vol. 61, 435–438

Asselah, T.; Boyer, N.; Saadoun, D.; Martinot-Peignoux, M.; Marcellin, P. (2016). Direct-acting antivirals for the treatment of hepatitis C virus infection: optimizing current IFN-free treatment and future perspectives. *Liver International*; 36 (Suppl. S1): 47–57

Avó, Ana P.; Água-Doce, I.; Andrade, A.; Pádua, E. (2013). Hepatitis C Virus subtyping based on sequencing of the C/E1 and NS5B genomic regions in comparison to a commercially available line probe assay. *Journal of Medical Virology*; 85:815–822

Bain, C.; Fatmi, A.; Zoulim, F.; Zarski, J.; TréPo, C.; Inchauspe, G. (2001). Impaired Allostimulatory Function of Dendritic Cells in Chronic Hepatitis C Infection. *Gastroenterology*; 120:512–524

Banerjee, D. and Reddy, K. R. (2016). Review article: safety and tolerability of direct-acting anti-viral agents in the new era of hepatitis C therapy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*; 43: 674–696

Bartenschlager, R.; Cosset, F.; Lohmann, V. (2011). Hepatitis C virus replication cycle. *Journal of Hepatology*; Vol. 53, 583–585

Besse, B.; Coste-Burela, M.; Bourgeois, N.; Feray, C.; Imbert-Marcillea, B.; André-Garnier, E. (2012). Genotyping and resistance profile of hepatitis C (HCV) genotypes 1–6 by sequencing the NS3 protease region using a single optimized sensitive method. *Journal of Virological Methods*; Vol. 185, Issue 1, p. 94–100

Bochud, P.; Cai, T.; Overbeck, K.; Bochud, M.; Dufour, J.; Mullhaupt, B. et al (2009). Genotype 3 is associated with accelerated fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*; 51, 655-666

Boyer, N. and Marcellin, P. (2000). Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *Journal of Hepatology*; 32 (suppl. 1): 98-112

Bruggmann, P.; Berg, T.; A. Øvrehus, L. H.; Moreno, C.; Mello, C. E. Brandão; Roudot-Thoraval, F. et al (2014). Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. *Journal of Viral Hepatitis*; 21, (Suppl. 1), 5–33

Buchanan, R. and Nash, K. (2015). *Hepatitis C. Medicine* 43:10

Bull, R.; Eltahla, A.; Rodrigo, C.; Koekkoek, S.; Walker, M.; Pirozyan, M. et al (2016). A method for near full-length amplification and sequencing for six hepatitis C virus genotypes. *Bio Med Central Genomics*; 17:247

Calado, R.; Rocha, M.; Parreira, R.; Piedade, V., João T.; Esteves, A. (2011). Hepatitis C virus subtypes circulating among intravenous drug users in Lisbon, Portugal. *Journal of Medical Virology*; 83:608–615

Carcamo, W. C. and Nguyen, C. Q. (2012). Advancement in the Development of Models for Hepatitis C Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; Vol 2012; Article ID 346761

Carvalhana, SC; Leitão, J; Alves, AC; Bourbon, M; Cortez, Pinho, H (2016). Hepatitis B and C prevalence in Portugal: Disparaty between the general populations and high-risk groups. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*; (6):640-4

Chayama, K. and Hayes, C. N. (2011). Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*; 26, Suppl. 1; 83–95

Chayama, K.; Imamura, M.; Hayes, N. (2016). Hepatitis C virus treatment update d A new era of all-oral HCV treatment. *Advances in Digestive Medicine*; xx, 1-8

Chen, Stephen L. and Morgan, Timothy R. (2006). The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *International Journal of Medical Sciences*; 3(2):47-52

Chevaliez, S. and Pawlotsky, J. M. (2006). HCV Genome and Life Cycle, Horizon Bioscience, Norfolk (UK); Cap. 1, pp. 5-27

Chevaliez, S. and Pawlotsky, J. (2007). Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World Journal of Gastroenteroly*; 13(17): 2461-2466

Chevaliez, S. (2011). Antiviral activity of the new DAAs for the treatment of hepatitis C Virus infection: Virology and resistance. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*; 35, S46—S51

Choo, QL; Kuo, G; Weiner AJ; Overby, LR; Bradley, DW; Houghton, M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*; 244:359–362

Clark, J.; Brancati, F.; Diehl, A. (2003). *The American JOURNAL of Gastroenterology*; Vol. 98, No. 5

deLemos, A.. and Chung, R. (2014). Hepatitis C treatment: an incipient therapeutic revolution. *Trends in Molecular Medicine*; Vol. 20, No. 6

Demetriou, V.; Kyriakou, E.; Kostrikis, L. (2011). Near-full genome characterisation of two natural intergenotypic 2k/1b recombinant Hepatitis C Virus isolates. *Advances in Virology*; Vol. 2011, 7 pages

Di Lello, F.; Culasso, Andrés A.; Campos, R. (2015). Inter and inpatient evolution of hepatitis C virus. *Annals of Hepatology*; Vol 14, No 4: 442-449

Di Maio, V. C.; Cento, V.; Mirabelli, C.; Artese, A.; Costa, G.; Alcaro, S. et al (2014). Hepatitis C virus genetic variability and the presence of NS5B resistance-associated mutations as natural polymorphisms in selected genotypes could affect the response to NS5B inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Vol. 58, No. 5, p. 2781–2797

Doyle, J.; Hellard, M.; Thompson, A. (2012). The role of viral and host genetics in natural history and treatment of chronic HCV infection. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 26, 413–427

Echeverría, N.; Moratorio, G.; Cristina, J.; Moreno, P. (2015). Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World Journal of Hepatology*; 7(6): 831-845.

El-Shabrawi, M. H. and Kamal, N. M. (2013). Burden of pediatric hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology*; 19(44): 7880-7888.

Esteban, J.; Sauleda, S.; Quer, J. (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*; 48, 148–162

Galli, A. and Bukh, J. (2014). Comparative analysis of the molecular mechanisms of recombination in hepatitis C virus. *Trends in Microbiology*; Vol. 22, No. 6

Ghany, M.; Strader, D.; Thomas, D.; Seeff, L. (2009). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology*; Vol. 49, No. 4

Gerold, G. and Pietschmann, T. (2014). The HCV Life Cycle: In vitro Tissue Culture Systems and Therapeutic Targets. *Digestive Diseases*; 32:525–537.

Ghasemi, F.; Rostami, S.; Meshkat, Z. (2015). Progress in the development of vaccines for hepatitis C virus infection. *World Journal of Hepatology*; 21(42): 11984-12002

Gill, K.; Ghazinian, H.; Manch, R.; Gish, R. (2016). Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. *Hepatology International*; 10:415–423

Giraudon, I.; Hedrich, D.; Duffell, E.; Kalamara, E.; Wiessing, L. (2016). Hepatitis C virus infection among people who inject drugs: epidemiology and coverage of prevention measures in Europe. *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*.

González-Candelas, F.; López-Labrador, F.; Bracho, M. (2011). Recombination in Hepatitis C Virus. *Viruses*; 3, 2006-2024

Gower, E.; Estes, C.; Blach, S.; Razavi-Shearer, K.; Razavi, H. (2014). Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*; vol. 61, S45–S57

Grassi, G.; Di Caprio, G.; Fimia, G.; Ippolito, G.; Tripodi, M.; Alonzi, T. (2016). *World Journal of Hepatology*; 22(6): 1953-1965

Gretch, D. (1997). Diagnostic Tests for Hepatitis C. *Hepatology*; Vol. 26, No. 3, Suppl. 1

Gu, M. and Rice, C. (2013). Structures of hepatitis C virus nonstructural proteins required for replicase assembly and function. *Current Opinion in Virology*; 3:129–136

ICTV, 2015 - <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>, acedido a 21 de Dezembro de 2016

Jackowiak, P.; Kuls, K.; Budzko, L.; Mania, A.; Figlerowicz, M. (2015). Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus. *Infection, Genetics and Evolution*; 21, 67–82

Jakobsen, J.; Nielsen, E.; Feinberg, J.; Fobian, K.; Katakam, K.; Hauser, G. et al (2016). Direct-acting antivirals for chronic hepatitis C. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Issue 4. Art. No.: CD012143

Kalinina, O.; Norder, H.; Mukomolov, S.; Magnius, L. (2002). A natural intergenotypic recombinant of Hepatitis C Virus identified in St. Petersburg. *Journal of Virology*, p. 4034–4043

Kalinina, O. V. and Dmitriev, A. V. (2015). Structural and Functional Genome Organization and Life Cycle of Hepatitis C Virus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*; Vol. 30, No. 2, pp. 64–70

Kati, W.; Koev, G.; Irvin, M.; Beyer, J.; Liu, Y.; Krishnan, P. et al (2015). In vitro activity and resistance profile of Dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Vol. 59, No. 3

Kazmierczak, J.; Cortes, K.; Bukowska-Osko, I.; Radkowski, M. (2016). Virus-Specific Cellular Response in Hepatitis C Virus Infection. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*; 64:101–110

Khaderi, S.; Shepherd, R.; Goss, J.; Leung, D. (2014). Hepatitis C in the pediatric population: Transmission, natural history, treatment and liver transplantation. *Journal of Gastroenterology*; 20(32): 11281-11286

Kim, R. (2002). Global epidemiology and burden of hepatitis C. *Microbes and Infection*; 4, 1219–1225

Kim, A. and Saab, S. (2005). Treatment of hepatitis C. *The American Journal of Medicine*; 118, 808-815

Kim, C. and Chang, K. (2013). Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and Molecular Hepatology*; 19:17-25

Lam, A.; Espiritu, C.; Bansal, S.; Steuer, H.; Niu, C.; Zennou, V. et al (2012). Genotype and Subtype Profiling of PSI-7977 as a Nucleotide Inhibitor of Hepatitis C Virus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Vol. 56 No. 6, p. 3359–3368

Lange, C. and Zeuzem, S. (2014). Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*; Vol. 58, 583–592

Lavanchy, D. (2009). The global burden of hepatitis C. *Liver International*; 29(s1): 74–81

Lee, M.; Yang, H.; Yuan, Y.; L'Italien, G.; Chen, C. (2014). Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*; 20(28): 9270-9280

Leite, R. (2014). Consensus for the integrated management of hepatitis C in Portugal. *Bio Med Central Infectious Diseases*; 14(Suppl 6):S9

Li, H. and Lo, S. (2015). Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World Journal of Hepatology*; 7(10): 1377-1389

Lindenbac, B. D.; and Rice, C. M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*; Vol 436

Lindenbac, B. D.; and Rice, C. M (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nature Reviews Microbiology*; 11, 688–700

Maasoumy, B. and Wedemeyer, H. (2012). Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*; 26, 401–412

Majumdar, A.; Kitson, M. T.; Roberts, S. K. (2016). Systematic review: current concepts and challenges for the direct-acting antiviral era in hepatitis C cirrhosis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*; 43: 1276–1292

Matsuura, K. and Tanaka, Y. (2016). Host Genetic Variants Influencing the Clinical Course of Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Medical Virology*; 88:185–195

Martinello, M. and Matthews, G. V. (2015). Enhancing the detection and management of acute hepatitis C virus infection. *International Journal of Drug Policy*; 26, 899–910

Messina, J. P; Humphreys, I.; Flaxman, A.; Brown, A.; Cooke, G. S.; Pybus, O. G. et al (2015). Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*; Vol. 61, No. 1

Mishra, P.; Murray, J.; Birnkrant, D. (2015). Direct-acting antiviral drug approvals for treatment of chronic hepatitis C virus infection: Scientific and regulatory approaches to clinical trial designs. *Hepatology*; Vol. 62, No. 4

Mohamed, A. A.; Elbedewy, T. A.; El-Serafy, M.; El-Toukhy, N.; Ahmed, W.; El Din, Z. A. (2015). Hepatitis C virus: A global view. *World Journal of Hepatology*; 7(26): 2676-2680

Morel, V.; Descamps, V.; François, C.; Fournier, C.; Brochet, E.; Capron, D. et al (2010). Emergence of a genomic variant of the recombinant 2k/1b strain during a mixed Hepatitis C infection: A case report. *Journal of Clinical Virology*; 47, 382–386

Mukherjee, R.; Burns, Andrew; Rodden, D.; Chang, F.; Chaum, M.; Garcia, N. (2015). Diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *Journal of Laboratory Automation*; Vol. 20(5) 519–538

Naamani, K. A.; Sinani, S. A.; Deschênes, M. (2013). Epidemiology and treatment of hepatitis C genotypes 5 and 6. *Canadian Journal of Gastroenterology*; Vol. 27, No. 1

Pádua, E.; Avó, A. P., Almeida, C.; Água Doce, I.; Martins, H. C. (2015). Conhecer a Diversidade do Vírus da Hepatite C para além da Frequência dos Genótipos em Amostras Analisadas entre 2009 e 2014 no Laboratório de Referência do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. *Revista Científica da Ordem dos Médicos*; 28(6): 695-701

Paul, D.; Madan, V.; Bartenschlager, R. (2014). Hepatitis C Virus RNA Replication and Assembly: Living on the Fat of the Land. *Cell Host & Microbe* 16.

Pearlman, Brian L. (2004). Hepatitis C Treatment Update. *The American Journal of Medicine*; Vol. 117, 344-352

- Poveda, E.; Wyles, D. L.; Mena, ÁI; Pedreira, J. D.; Castro-Iglesias, A.; Cachay, E. (2014). Update on hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral agents. *Antiviral Research*; 108, 181–191
- Pybus, O. G.; Markov, P. V.; Wu, A.; Tatem, A. J. (2007). Investigating the endemic transmission of the hepatitis C virus. *International Journal for Parasitology*; 37, 839–849
- Raghwani, J.; Thomas, X. V.; Koekkoek, S. M.; Schinkel, J.; Molenkamp, R.; van de Laar, Thijs J. et al (2011). Origin and evolution of the unique hepatitis C virus circulating recombinant form 2k/1b. *Journal of Virology*; Vol. 86, No. 4, p. 2212–2220
- Ramière, C; Tremeaux, P; Caporossi, A; Trabaud, M A; Lebossé, F; Bailly, F et al (2014). Recent evidence of underestimated circulation of hepatitis C virus intergenotypic recombinant strain RF2k/1b in the Rhône-Alpes region, France, January to August 2014: implications for antiviral treatment. *Europe's journal on infectious disease epidemiology, prevention and control*; Vol. 19, Weekly issue 43
- Sarrazin, C. (2016). The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *Journal of Hepatology*; Vol. 64, 486–504
- Shaheen, M. A. and Idrees, M. (2015). Evidence-based consensus on the diagnosis, prevention and management of hepatitis C virus disease. *World Journal of Hepatology*; 7(3): 616-627
- Sharma, S. D. (2010). Hepatitis C virus: Molecular biology and current therapeutic options. *Indian Journal of Medical Research*; 131, pp 17-34
- Shepard, C. W.; Finelli, L.; Alter, M. J. (2005). Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases*; 5: 558–67
- Shi, W.; Freitas, I. T.; Zhu, C.; Zheng, W.; Hall, W.W.; Higgins, D. G. (2012). Recombination in Hepatitis C Virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *Plos One*, Vol 7, Issue 7, e41997
- Silva, T.; Martins, H. C.; Coutinho, R.; Leitão, E.; Silva, R.; Pádua, E. (2015). Molecular characterization of Hepatitis C Virus for determination of subtypes and detection of resistance mutations to protease inhibitors in a group of intravenous drug users co-infected with HIV. *Journal of Medical Virology*; 87:1549–1557
- Simmonds, P.; Holmes, E. C.; Cha, T.-A.; Chan, S.-W.; McOmish, F.; Irvine, B.; et al (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*; 74, 2391-2399.
- 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. et al (2005). Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology*; Vol. 42, No. 4, 2005
- Strader, D. B.; Wright, T.; Thomas, D. L.; Seeff, L. B. (2004). Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*; Vol. 39, No. 4

TenCate, V.; Sainz Jr, B.; Cotler, S. J.; Uprichard, S. L. (2010). Potential treatment options and future research to increase hepatitis C virus treatment response rate. *Hepatic Medicine*; (2): 125–145

Tsertsvadze, T.; Sharvadze, L.; Chkhartishvili, N.; Dzigua, L.; Karchava, M.; Gatsereia, L.; et al. (2016). *Virology Journal* 13:22

Tovo, P.; Calitri, C.; Scolfaro, C.; Gabiano, C.; Garazzino, S. (2016). *World Journal of Gastroenterology*; 22(4): 1382-1392

Umer, M. and Iqbal, M. (2016). Hepatitis C virus prevalence and genotype distribution in Pakistan: Comprehensive review of recent data. *World Journal of Gastroenterology*; 22(4): 1684-1700

van Asten, L; Verhaest, I; Lamzira, S; Hernandez-Aguado, I; Zangerle, R; Boufassa, F; (2004). Spread of hepatitis C virus among European injection drug users infected with HIV: A phylogenetic analysis. *Journal of Infectious Diseases* 189:292 –302

Villar, L. M.; Cruz, H. M.; Barbosa, J. R.; Bezerra, C. S.; Portilho, M. M.; Scalioni, L. P. (2015). Update on hepatitis B and C virus diagnosis. *World Journal of Virology*; 12; 4(4): 323-342

Wandelera, G.; Dufourc, J.; Bruggmann, P.; Raucha, A. (2015). Hepatitis C: a changing epidemic. *Swiss Med Wkly*; 145:w14093

Westbrook R. H. and Dusheiko, G. (2014). Natural history of hepatitis C. *Journal of Hepatology*; Vol. 61: S58–S68

Wilkins, T.; Akhtar, M.; Gititu, E.; Jalluri, C.; Ramirez, J. (2015). Diagnosis and management of hepatitis C. *American Family Physician*; Vol. 91, No. 12

Wong, M. and Chen, S. S-L (2016). Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. *Cellular & Molecular Immunology*; 13, 11 –35

WHO, 2016 - <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>, acedido a 20 de setembro de 2016

Zaltron, S; Spinetti, A; Biasi, L; Baiguera, C; Castelli, F (2012). Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *Bio Med Central Infectious Diseases*; 12(Suppl 2):S2

Zeisel, M. B.; Crouchet, E.; Baumert, T. F.; Schuster, C. (2015). Host-Targeting Agents to Prevent and Cure Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*; 7, 5659 –5685

## **8. Anexos**

## 8. Anexos

**Anexo 1** – Lista das referências utilizadas nas árvores filogenéticas e retiradas da base de dados *Los Alamos*.

### Árvore NS5B

**Genótipo 1:** HCR6.AY045702; H77.AF009606; HEC278830.AJ278830; LTD1-2-XF222.AF511948; AB016785; D89815; HCR6.AY045702; HCV-CG1B.AF333324; AU.HCV-A.AJ000009; JP1994319563-A/1.E08443; IN.AY051292; IN.Khaja1.AY651061. **Genótipo 2:** G2AK3.AF169004; MD2A-1.AF238481; MD2A-2.AF238482; MD2A-4.AF238483; JPUT971017.AB030907; MD2B-1.AF238486; JP.MD2b7-1.AY232742; BEBE1.D50409; MD.VAT96.AB031663; JX227949; JX227953. **Genótipo 3:** CB.AF046866; K3A.D28917; NZL1.D17763; DE.HCVCENS1.X76918; JP1996056672-A/2.E10840; KC844044. **Genótipo 4:** EG.ED43.Y11604; AB795432; DQ988073; DQ418782; EU392172; DQ418786; DQ516083; FJ462437. **Genótipo 5:** GB.EUH1480.Y13184; ZA.SA13.AF064490. **Genótipo 6:** HK.6a33.AY859526; HK.EUHK2.Y12083. **RF\_2k/1b:** HQ537006; HQ537005; RU.N687.AY587845; C1NS5B.

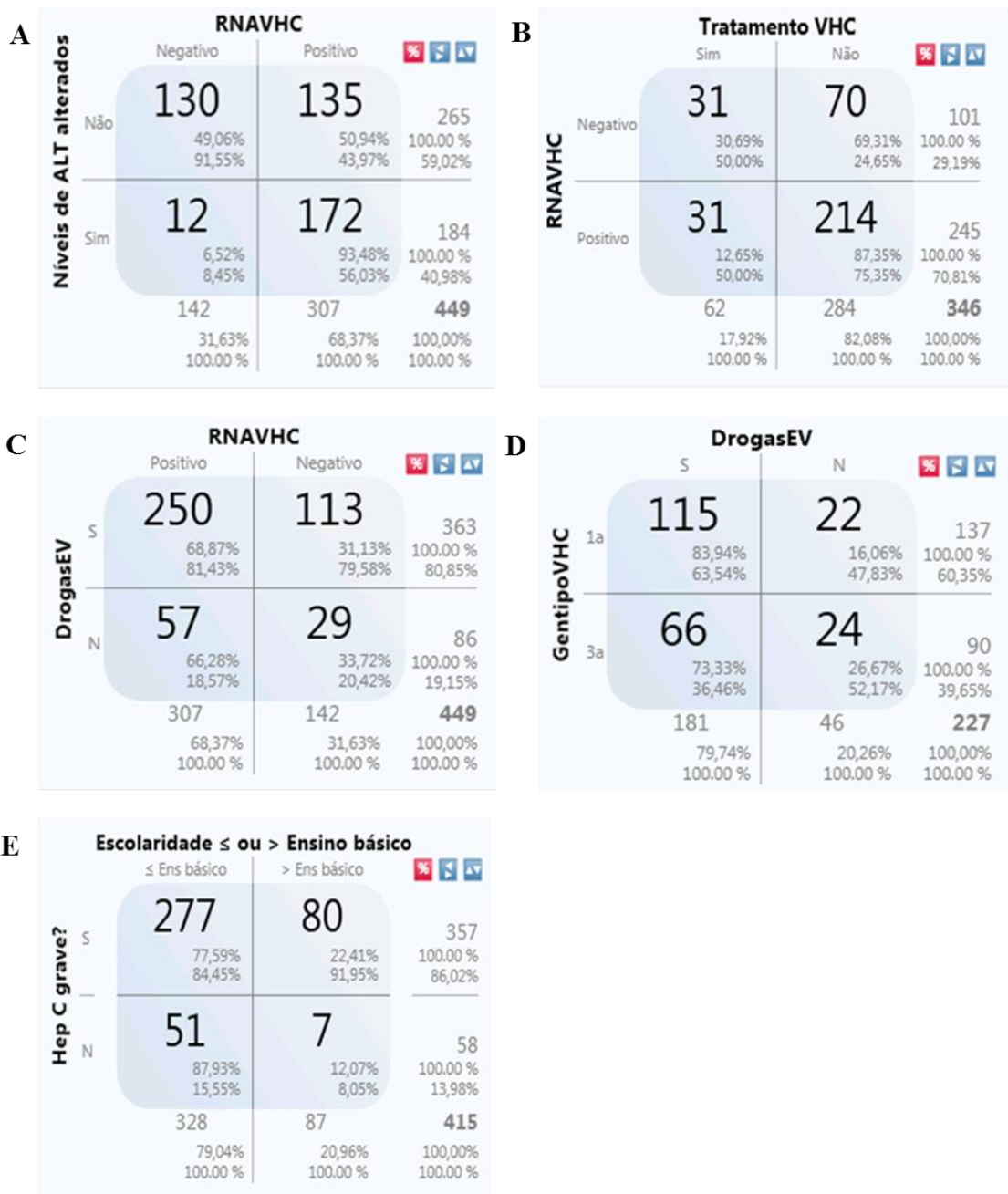
### Árvore NS3

**Genótipo 1:** H77.NC\_004102; US.BID-V73.EU155242; US.BID-V86.EU155243; US.BID-V90.EU155244; US.BID-V91.EU155245; US.BID-V93.EU155246; AU.HCV-A.AJ000009; CH.BID-V273.EU155356; CH.BID-V281.EU155361; CH.BID-V282.EU155362; CH.BID-V285.EU155363; DE.BID-V504.EU155382; ID.HC-G9.D14853; IN.AY051292.AY051292. **Genótipo 2:** JP.JFH-1.AB047639; JP.AY746460.AY746460; JP.HC-J6.D00944; JP.JCH-6.AB047645; JP.HC-J8.D10988; JP.MD2b1-2.AY232731; JP.MD2b10-2.AY232749; MD2B-1.AF238486; BEBE1.D50409; GB.x.HCV-2c/GB/BID-G1238.JX227949; MD.VAT96.AB031663; GB.x.HCV-2k/GB/BID-G1242.JX227953. **Genótipo 3:** DE.HCVCENS1.X76918; CB.AF046866; K3A.D28917; NZL1.NC\_009824; JP.HCV-Tr.D49374; JP1996056672-A/1.E10839. **Genótipo 4:** EG.ED43.Y11604; 01-09.DQ418782; 03-18.DQ418786; 24.DQ516083. **Genótipo 5:** GB.EUH1480.Y13184; ZA.SA13.AF064490. **Genótipo 6:** HK.6a33.AY859526; HK.6a35.DQ480513. **RF:2k/1b:** RU.N687.AY587845; HQ537006; HQ537005; C1NS3.

### Árvore C/E1

**Genótipo 1:** COLONEL.AF290978; H77.AF009606; HEC278830.AJ278830; LTD1-2-XF222.AF511948; LTD3-2-XF223.AF511949; LTD6-2-XF224.AF511950; AB016785; D89815; HCR6.AY045702; HCV-CG1B.AF333324; HCV-JS.D85516; HCV-S1.AF356827; JP1994319563-A/1.E08443; ID.HC-G9.D14853. **Genótipo 2:** G2AK1.AF169003; G2AK3.AF169004; MD2A-1.AF238481; MD2A-2.AF238482; JPUT971017.AB030907; MD2B-1.AF238486; JP.HC-J8.D10988; JP.MD2b1-1.AY232730; BEBE1.D50409; MD.VAT96.AB031663; KC197234; KC967479. **Genótipo 3:** CB.AF046866; K3A.D28917; NZL1.D17763; DE.HCVCENS1.X76918; JP.HCV-Tr.D49374; KC844044. **Genótipo 4:** AB795432; KC844045; DQ516083; EG.ED43.Y11604. **Genótipo 5:** GB.EUH1480.Y13184; ZA.SA13.AF064490. **Genótipo 6:** HK.6a33.AY859526; HK.EUHK2.Y12083. **RF2k/1b:** RU.N687.AY587845; HQ537006; HQ537005; C1CE1

**Anexo 2:** Tabelas de contingência utilizadas para a realização do teste de Fisher bilateral.



**Figura 8.1** –Tabelas de contingência (2x2) utilizadas para a aplicação do teste de Fisher bilateral (programa EpiInfo). A) Estudo de independência das variáveis: níveis de ALT e o RNA viral (capítulo 4.7). B) o estudo de independência das variáveis: tratamento do VHC e presença ou ausência do RNA viral (capítulo 4.10). C) Estudo de independência das variáveis: via de consumo de drogas endovenosas e RNA do VHC (capítulo 4.11). D) Estudo de independência das variáveis: via de consumo de drogas e os subtipos 1a ou 3a (capítulo 4.12). E) Estudo de independência das variáveis: nível de escolaridade e percepção dos indivíduos sobre a gravidade da hepatite C (capítulo 4.13).

**Anexo 3** – Dados recolhidos e analisados no presente estudo (questionário parcial).

**I. DADOS DEMOGRÁFICOS, ECONÓMICOS, SOCIAIS E EDUCACIONAIS**

1. Sexo: Masculino  Feminino

2. Data de nascimento: / /  
dd/mm/aaaa

3. Naturalidade: Portuguesa  Outra   
(passar à questão 5) (passar à questão 4)

4. Qual o país de nascimento e desde quando reside em Portugal?

País: \_\_\_\_\_ Ano: \_\_\_\_\_

5. Como define a sua situação laboral?

Tem trabalho estável  Tem trabalho temporário  Desempregado  Reformado

6. Em que tipo de alojamento vive?

Casa  Quarto ou pensão  Sem-abrigo

7. Que ano de escolaridade completou:

8. Frequenta ou frequentou ensino superior? Sim  Não

**II. CONHECIMENTO SOBRE A HEPATITE C**

10. Pensa que a hepatite C é uma doença grave? Sim  Não  Não sei

**III. SITUAÇÃO DE INFEÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)**

11. Sabe se não tem, se tem ou se teve hepatite C?

Em caso de ter, ou ter tido, indique quando foi que conheceu a situação

a. Sei que não tenho hepatite C

b. Sim, tenho ou tive hepatite C  Conheci a minha situação em: /  
mm/aaaa

c. Desconheço a minha situação

12. Escolha a melhor opção que descreve a sua situação relativamente à hepatite C:

- a. Sim, tenho hepatite C e não fiz tratamento
- b. Sim, tenho hepatite C e estou em tratamento
- c. Sim, tenho hepatite C e tratamento não teve sucesso
- d. Sim, tive hepatite C mas foi tratada com sucesso
- e. Sim, tive hepatite C mas curei-a sem tratamento

#### IV. COMPORTAMENTOS DE RISCO PARA A AQUISIÇÃO DA HEPATITE C

20. Quando iniciou o consumo de qualquer tipo de drogas ilícitas? Data de início: / /  
mm/aaaa

Nunca consumi drogas ilícitas

21. Consome ou consumiu drogas por via endovenosa?

Sim  Data último consumo: / / Não   
mm/aaaa (passar à questão 15)

22. Alguma vez partilhou material de injeção no consumo de drogas?

Sim  Data da última partilha: / / Nunca partilhei qualquer tipo de material   
mm/aaaa

23. Consome ou já consumiu drogas por via inalada (via nasal)?

Sim  Data último consumo: / / Não   
mm/aaaa

24. Consome ou já consumiu drogas por via fumada (via oral)?

Sim  Data último consumo: / / Não   
mm/aaaa