

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

**PERFIL GENOTÍPICO DO HCV EM PORTADORES DE HEPATITE C
EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS - BRASIL**

CARLOS PERONE

Belo Horizonte - MG

2007

CARLOS PERONE

**PERFIL GENOTÍPICO DO HCV EM PORTADORES DE HEPATITE C
EM BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS-BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia – Área de concentração Propedêutica Complementar - da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientadora: Dra. Silvana Maria Elói Santos

Co-orientadora: Dra. Rosângela Teixeira

Belo Horizonte - MG

2007

Perone, Carlos
P453c Perfil genotípico do HCV em portadores de hepatite C em Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil/Carlos Perone. Belo Horizonte, 2007.
80f., il.
Dissertação.(mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina.
Área de concentração: Patologia – Propedêutica Complementar
Orientadora: Silvana Maria Elói Santos
Co-orientadora: Rosângela Teixeira
1.Hepacivirus/genética 2.Hepacivirus/classificação 3.Genótipo
4.Análise de seqüência 5.Regões 5' não traduzidas/genética
6.Filogenia I.Título

NLM: QH 447
CDU: 576.858

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA: Professora Heloísa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Jaime Arturo Ramírez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Professor Tarcizo Afonso Nunes

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COORDENADOR: Professor Geovanni Dantas Cassali

SUB-COORDENADORA: Professora Ana Margarida Miguel Ferreira Nogueira

MEMBROS DO COLEGIADO:

Professora Anílton César Vasconcelos

Professor Edilberto Nogueira Mendes

Professora Helenice Gobbi

Professor Wagner Luiz Tafuri

Enio Ferreira (Representante Discente Titular)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnostico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da UFMG, sob a orientação da Doutora Silvana Maria Elói Santos¹ e da Doutora Rosângela Teixeira^{2,3}.

¹Departamento de Propedêutica Complementar, Faculdade de Medicina da UFMG.

²Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da UFMG.

³Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Silvana Maria Elói Santos, agradeço profundamente pelo estímulo que recebi dela desde o início deste trabalho, pelos conselhos e pela ajuda fundamentais em todas as etapas percorridas até a finalização do mesmo.

À minha co-orientadora, Professora Dra. Rosângela Teixeira. Desde a implementação do diagnóstico molecular da hepatite C no NUPAD até o presente projeto, nada disto teria sido possível sem a presença dela. Agradeço também pela força e pelo incentivo para aceitar este desafio e pela sua ajuda em todos os momentos.

Ao Professor Dr. José Nélio Januário, diretor geral do NUPAD, por possibilitar o desenvolvimento deste projeto dentro do laboratório de Genética e Biologia molecular, e pelo apoio a esta e outras iniciativas de pesquisa que reafirmam o prestígio do NUPAD e da Faculdade de Medicina da UFMG em Minas Gerais e no Brasil.

Agradeço especialmente à Dra. Dora Mendez del Castillo, coordenadora do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD pelo apoio a este trabalho, integralmente realizado nesse Laboratório. Agradeço também pelo estímulo e constante exemplo de perseverança e profissionalismo. Mais ainda, agradeço por todos estes anos de convivência, e pela amizade e a confiança recebidas.

Agradeço a Gilsimary Lessa Pereira e a Nara de Oliveira Carvalho, pela inestimável ajuda no trabalho técnico de bancada. A colaboração delas, marcada pela experiência, competência e profissionalismo habituais foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

À minha esposa e meus filhos, que dão sentido a minha vida e a tudo que faço.

Aos meus pais, que apesar da distância estão sempre presentes e me acompanharam em todos os momentos importantes da vida.

RESUMO

O vírus da Hepatite C (HCV), assim como outros vírus de RNA, é caracterizado pela alta heterogeneidade genômica. São identificados seis genótipos principais, que apresentam diferentes distribuições geográficas. A determinação do genótipo do HCV é essencial na prática clínica para determinar o regime terapêutico e as chances de resposta viral ao tratamento. Existem diferentes métodos de genotipagem, sendo o seqüenciamento nucleotídico do genoma do vírus o método de referência. Para fins diagnósticos, a região mais utilizada para genotipagem é a 5'UTR, a mais conservada do genoma do HCV. No Brasil, os genótipos mais comuns são o 1, seguido do 3 e do 2. Todavia, a prevalência dos diferentes genótipos e subtipos varia consideravelmente dentro do país e ainda não é bem conhecida em algumas regiões. MÉTODOS: Foi realizada análise prospectiva em 788 amostras de pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos na rede pública em Belo Horizonte e encaminhados para testes de genotipagem ao Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Universidade Federal de Minas Gerais, entre 2002 e 2006. A identificação dos genótipos do HCV foi realizada por seqüenciamento direto da região 5' UTR, seguida de análise comparativa por alinhamento das seqüências obtidas com seqüências de referência do vírus. Adicionalmente, foi realizada análise filogenética de variantes obtidas dentro de cada genótipo. RESULTADOS: Foi analisado um total de 788 amostras, das quais foi realizada genotipagem em 777 (98,6%). Foi observada prevalência de 78,4% para o genótipo 1 (1b, 40,4%; 1a, 37,5% e 1a/b, 0,5%), seguido pelo genótipo 3a (17,9%) e pelo 2b (3,1%). Foram identificadas três amostras (0,4%) com o genótipo 2a/c e duas amostras (0,2%) com o genótipo 4. A análise filogenética mostrou a segregação esperada das seqüências obtidas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4. No genótipo 1, a maioria das seqüências se agrupou como esperado e duas segregaram separadamente. As duas seqüências obtidas do genótipo 4 apresentaram maior similaridade com o subtipo 4t. CONCLUSÕES: Este estudo contribuiu para confirmar o desempenho do método de genotipagem do HCV utilizado no laboratório do NUPAD – UFMG. A metodologia utilizada mostrou boa eficácia, com 98,6% de amostras seqüenciadas e genotipadas. A alta prevalência do genótipo 1 (78,4%) encontrada na população de Belo Horizonte é semelhante à já reportada em outras cidades, como Rio de Janeiro, mas superior à encontrada em São Paulo e no sul do país. A análise filogenética comprovou que a metodologia utilizada para a genotipagem do vírus permitiu discriminar com eficácia os genótipos 1, 2 e 3, os mais freqüentes na nossa população, assim como também os isolados do genótipo 4. O achado de seqüências atípicas para a região 5'UTR estudada e de mutações não descritas ou pouco freqüentes em diversas amostras sugere a possível existência de novos subtipos do vírus na nossa população. A classificação precisa destes isolados ou de genótipos pouco freqüentes no Brasil requer o seqüenciamento nucleotídico de outras regiões mais informativas do genoma do vírus. Os resultados apresentados nesta investigação mostram em detalhe o perfil genotípico do HCV em pacientes portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte e reforçam a necessidade de aprofundar as pesquisas sobre as características e a diversidade genômica do HCV no Brasil.

PALAVRAS-CHAVE: HCV, genotipagem, genótipos, seqüenciamento, hepatite C.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV), like other RNA virus, is characterized by a high genomic heterogeneity. To date, six different genotypes have been identified, with distinct geographical distribution. HCV genotype identification is essential in clinical practice, since therapeutic schedule and the probability of viral response are genotype-specific. The reference method is direct sequencing of viral genome. The highly conserved 5'UTR region is frequently used for diagnostic purposes. Geographical distribution of HCV genotypes in Brazil shows high prevalence of genotype 1, follow by genotypes 3 and 2. However, the prevalence of genotypes and subtypes varies between different regions of the country and remains unknown in some regions. **METHODOLOGY:** A prospective analysis was carried out from 2002 to 2006 in 788 specimens of patients with chronic hepatitis C sent to a reference laboratory (NUPAD) in Belo Horizonte (MG) Brazil. The HCV genotype test was performed by direct sequencing of the 5'UTR region, followed by comparative analysis through alignment with reference sequences of main viral genotypes. Additionally, phylogenetic analysis was performed including all representative variants and prototype 5'UTR sequences. **RESULTS:** Genotyping was successful in 777 (98,6%) of 788 samples. Results showed a high prevalence (78,4%) of genotype 1 (1b., 40,4%; 1a, 37,5% and 1a/b, 0,5%) followed by genotype 3a (17,9%) and 2b (3,1%). Three samples were identified as genotype 2 a/c and two as genotype 4. Phylogenetic analysis showed the expected cosegregation of selected sequences with reference 5'UTR sequences of genotypes 1, 2, 3 and 4, except for two samples of genotype 1a. Both genotype 4 sequences had shown greater similarity with subtype 4t. **CONCLUSIONS:** This work contributed to confirm the effectiveness and accuracy of the methodology used for HCV genotyping in the NUPAD – UFMG laboratory. The proportion of sequenced and genotyped samples (98,6%) demonstrated excellent performance of laboratory protocols. The high prevalence of genotype 1 (78,4%) found in Belo Horizonte was similar to the ones reported in other cities, but higher than the one found in São Paulo and the South of Brazil. Phylogenetic analysis provided support to genotyping assay in discriminating genotypes 1, 2 and 3, the most frequent in Brazil. Phylogenetic analysis also confirmed genotype 4 assignment in two samples. The finding of atypical 5'UTR strains and mutations suggests the existence of new virus subtypes in our population. Nucleotide sequencing of more informative viral genome regions is needed for accurate classification of those isolates as well as other uncommon genotypes. The results presented here show in detail the genotypic profile of HCV in chronic hepatitis C carriers in Belo Horizonte and strengthen the necessity to increase researches regarding the genetic diversity of HCV in Brazil.

KEY-WORDS: HCV, genotyping, genotypes, sequencing, hepatitis C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore filogenética da família Flaviviridae	1
Figura 2	Esquema do RNA do vírus HCV	2
Figura 3	Esquema do ciclo de replicação do HCV	4
Figura 4	Estrutura secundária da região 5'UTR do vírus HCV	5
Figura 5	Distribuição mundial de genótipos do vírus HCV	6
Figura 6	Prevalência mundial da hepatite C	10
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose a 2%	18
Figura 8	Seqüência completa da região 5'UTR do genoma do HCV	19
Figura 9	Alinhamento múltiplo das seqüências de referência	21
Figura 10	Alinhamento das 34 seqüências selecionadas	23
Figura 11	Eletroferograma (1)	28
Figura 12	Eletroferograma (2)	29
Figura 13	Filograma tipo <i>neighbor joining</i>	30
Figura 14	Árvore filogenética tipo <i>neighbor joining</i> radial	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Estudos de prevalência de genótipos do HCV no Brasil	8
Tabela 2	Prevalência mundial da hepatite C	9
Tabela 3	Prevalência da hepatite C no Brasil	10
Tabela 4	Resumo das principais etapas do teste qualitativo	17
Tabela 5	Seqüências de referência utilizadas	20
Tabela 6	Variantes do genótipo 4 utilizadas na análise comparativa	25
Tabela 7	Distribuição genotípica do HCV	27
Tabela 8	Matriz de distâncias do genótipo 4	32

LISTA DE ABREVIATURAS

5' UTR	<i>5' Unstranlated Region</i> – região 5' não traduzida
bp	<i>base pair</i> – pares de bases
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	desoxinucleosídeos trifosfatados
HCV	virus da hepatitis C
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
kb	Kilobases
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	<i>Noncoding Region</i> – região não codificante
NS	<i>Non Structural</i> – não estrutural
NUPAD	Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
RFLP	<i>Restriction Fragments Length Polymorphisms</i>
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	revoluções por minuto
RT-PCR	Reverse Transcription – PCR
SUS	Sistema Único de Saúde
T.A.	temperatura ambiente
TMB	Tetrametil benzidina
Tris-HCl	tampão Tris (hidroximetil) aminometano - ácido clorídrico
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UI/mL	Unidades Internacionais por mililitro
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FLUXOGRAMAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O HCV	1
1.2 Genótipos do HCV	5
1.2.1 Genótipos do HCV em Minas Gerais	7
1.3 Transmissão e evolução clínica da hepatite C	8
1.4 Epidemiologia da hepatite C	9
1.5 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV	11
1.6 Genotipagem do HCV	11
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Amostras	16
3.2 Detecção do RNA viral	16

3.3	Preparação do produto de PCR para seqüenciamento	17
3.4	Reação de seqüenciamento – Eletroforese capilar	18
3.5	Genotipagem	20
3.6	Agrupamento e alinhamento das seqüências obtidas	22
3.7	Alinhamento múltiplo das seqüências selecionadas para análise filogenética	24
3.8	Análise filogenética	24
3.9	Análise comparativa das amostras do genótipo 4	24
4	RESULTADOS	26
4.1	Estudo genotípico por seqüenciamento de HCV de pacientes portadores de hepatite C da região metropolitana de Belo Horizonte	26
4.2	Estudo de variabilidade das seqüências da região 5' UTR obtidas	27
4.3	Análise filogenética de seqüências de HCV obtidas de pacientes portadores de hepatite C da região metropolitana de Belo Horizonte	29
4.4	Análise complementar das amostras do genótipo 4	31
5	DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	38
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
	ANEXO I - PROTOCOLO DO TESTE QUALITATIVO	45
	ANEXO II - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE RT-PCR	49
	ANEXO III - PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE RT-PCR	52
	ANEXO IV – ARTIGO PUBLICADO	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 O HCV

O vírus da hepatite C (HCV) foi caracterizado em 1989, como sendo o agente etiológico responsável pela maior parte das hepatites virais não-A, não-B (CHOO *et al.*, 1989). Está classificado como membro do gênero *Hepacivirus* que, junto com os gêneros *Pestivirus* e *Flavivirus*, integra a família *Flaviviridae* (MURPHY *et al.*, 1995) (Figura 1).

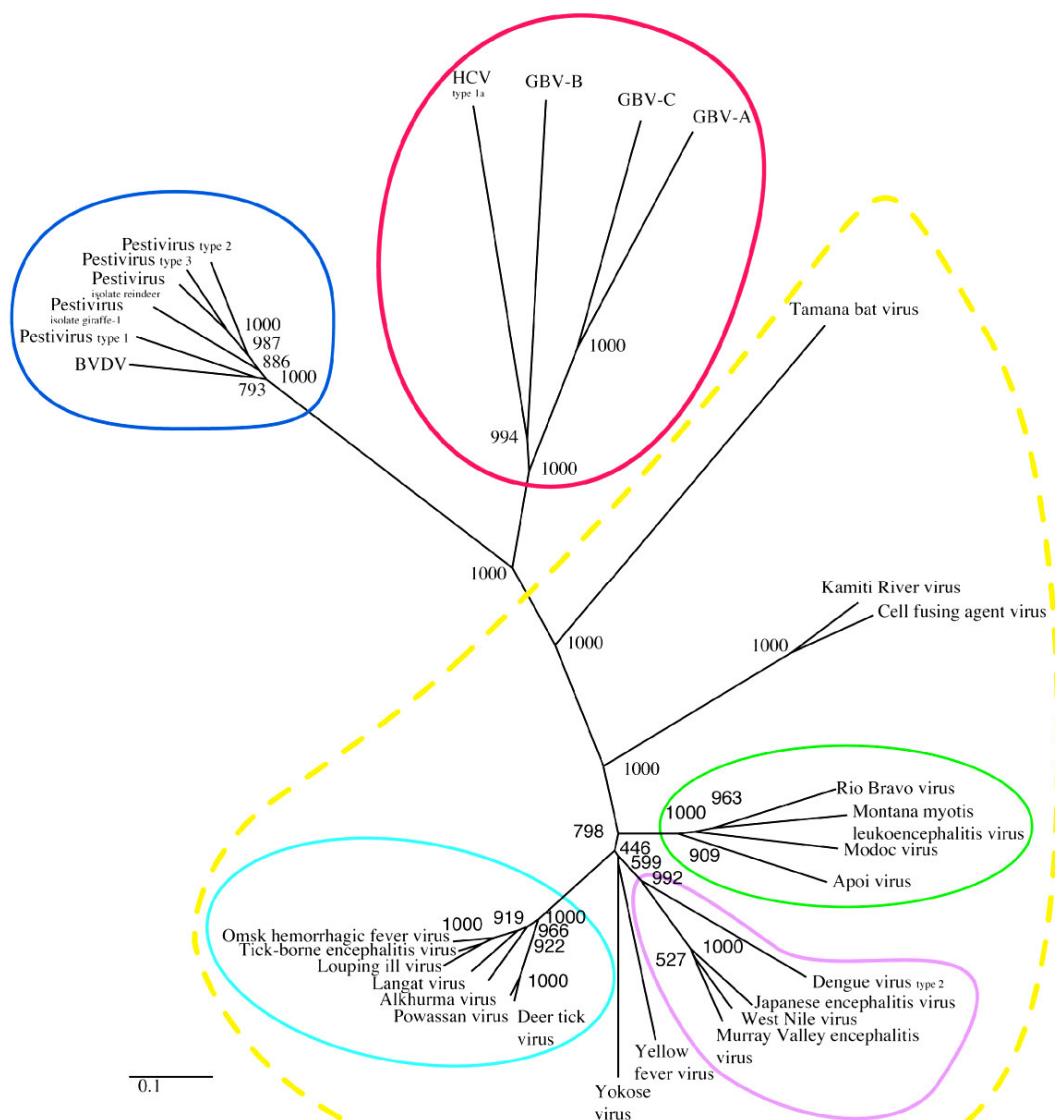


Figura 1: Árvore filogenética da família *Flaviviridae*, baseada na comparação das Polimerases. A área circulado em vermelho mostra o gênero *Hepacivirus* (Fonte: FERRON *et al.*, 2005).

Assim como outros vírus da família *Flaviviridae*, o HCV é constituído por uma cadeia simples de RNA, de sentido positivo, a qual contém um único e extenso marco de leitura (ORF- *open reading frame*) flanqueado por regiões terminais não codificantes. Este ORF codifica uma única poli-proteína precursora com porção N-terminal composta por proteínas estruturais (capsídeo, envelope) e porção C-terminal, composta por diversas proteínas não-estruturais (NS) (CHOO *et al.*, 1991) (Figura 2).

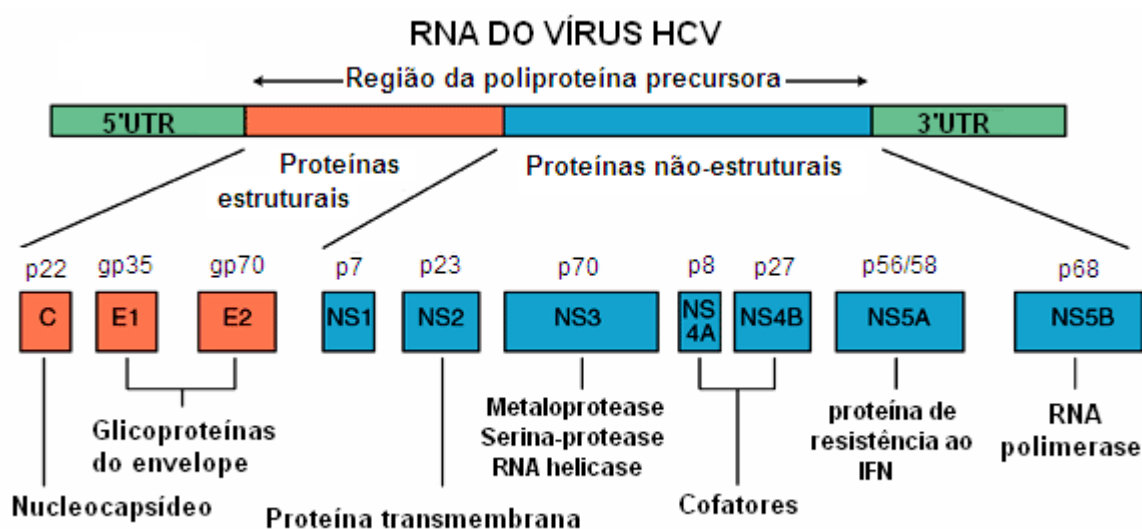


Figura 2: Esquema do RNA do vírus HCV. 5'UTR: região 5' não traduzida, 3'UTR: região 3' não traduzida. Na cor laranja: regiões que codificam proteínas estruturais (nucleocapsídeo e envelope), na cor azul: regiões que codificam proteínas não estruturais (Fonte: ANZOLA *et al.*, 2003).

O genoma do HCV apresenta tamanho aproximado de 9,5 kb, sendo que a poli-proteína codificada pelo ORF acima citado varia de 3010 a 3033 aminoácidos. Esta proteína precursora é clivada por proteases específicas do próprio vírus assim como também do hospedeiro, em pelo menos dez proteínas estruturais e não-estruturais. As proteínas estruturais, localizadas no extremo N-terminal, são a proteína do capsídeo viral e as proteínas E1 e E2. A proteína do capsídeo compõe o nucleocapsídeo viral, enquanto que as proteínas E1 e E2 são glicoproteínas transmembranas e constituem o envelope viral. O restante da poli-proteína é formado por diversas proteínas virais NS (não-estruturais), denominadas p7 (NS1),

NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B, que apresentam diferentes funções no ciclo de replicação viral (SHI *et al.*, 2001).

O ciclo de replicação começa com a entrada do vírus na célula, através da interação das proteínas E1 e E2 do HCV com receptores CD81 ou LDL na membrana celular. Uma vez dentro do citoplasma, o RNA genômico do vírus é liberado e traduzido. A tradução é mediada pela interação entre a subunidade ribossomal 40S e o sítio de entrada ribossomal, ou IRES (internal ribosomal entry site) presente na região 5' UTR do RNA viral. A tradução do RNA do HCV gera uma poliproteína que é posteriormente processada e clivada em diversas proteínas funcionais pela ação de proteinases do hospedeiro e virais. A maioria das proteínas virais NS formam um complexo de replicação que, associado às membranas intracelulares, é responsável pela síntese do RNA viral. A proteína NS5B, que apresenta atividade de RNA polimerase RNA dependente, tem um papel fundamental neste processo. A síntese começa pela produção de uma cadeia de RNA intermediária de sentido negativo, que serve como fita molde para a síntese de grande quantidade de RNAs de sentido positivo. Estas cadeias de RNA de sentido positivo são também traduzidas ou eventualmente empacotadas em novas partículas virais junto com proteínas estruturais do vírus. Este empacotamento ocorre provavelmente no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi. As partículas virais se acumulam no citoplasma em vesículas, que são posteriormente exportadas pela via secretora da célula hospedeira (BARTENSCHLAGER *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2001) (Figura 3).

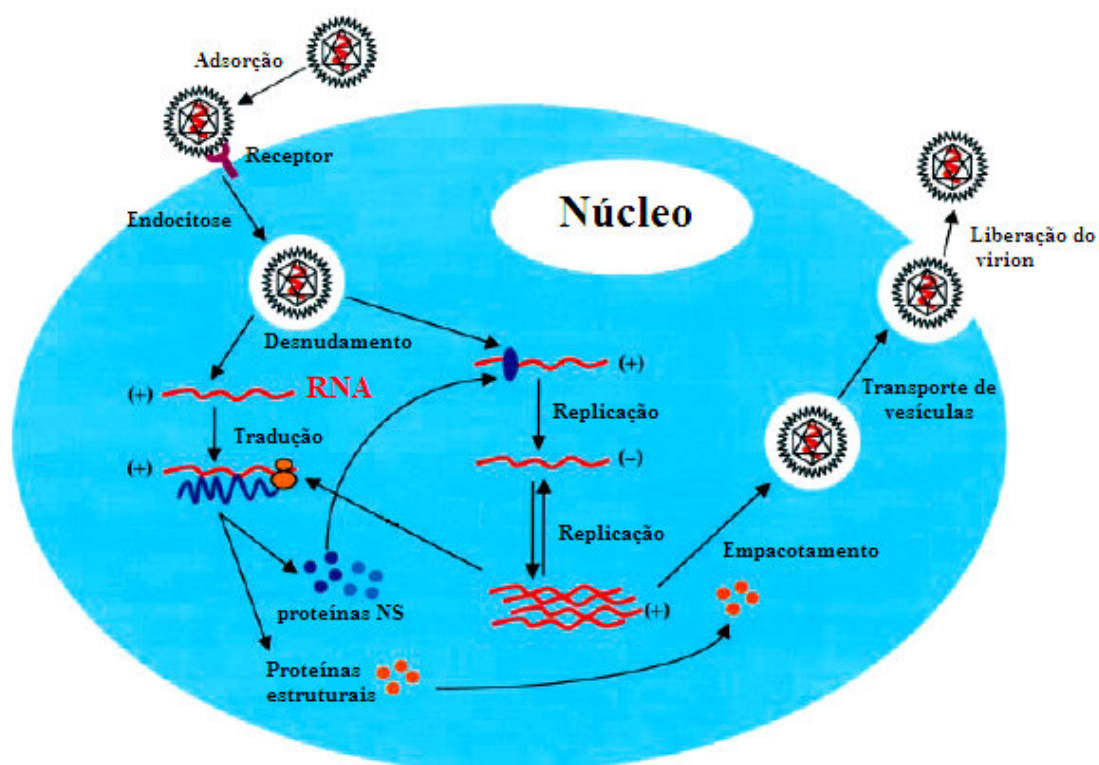


Figura 3: Esquema do ciclo de replicação do HCV (Fonte: SHI *et al.*, 2001).

A região 5'UTR (região 5' não traduzida) do HCV, medindo 341 nucleotídeos na maioria dos isolados virais, possui estrutura secundária complexa que inclui um sítio de entrada ribossomal (IRES), que regula a tradução do ORF nos ribossomos. Esta região 5'UTR mostra alto grau de conservação entre os diferentes isolados, apresentando geralmente mais de 90% de similaridade entre as diferentes seqüências (BUKH *et al.*, 1992). A variabilidade da região 5'UTR foi analisada em detalhe por diversos autores, e descrita a relação entre diversos polimorfismos que ocorrem na mesma e os genótipos e subtipos virais (SMITH *et al.*, 1995; STUYVER *et al.*, 1995) (Figura 4).

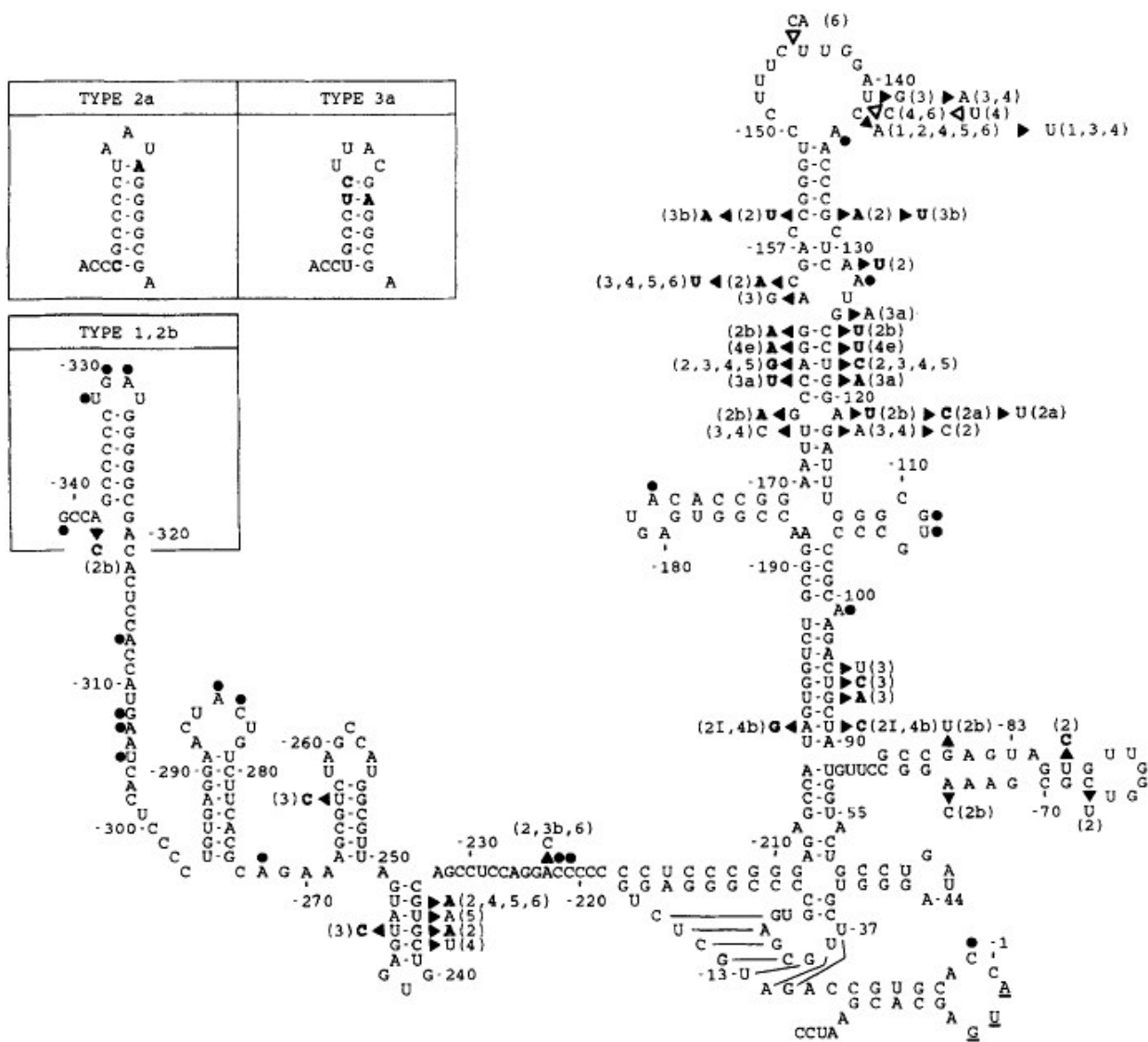


Figura 4: Possível estrutura secundária da região 5'UTR do vírus HCV. O *main stem loop* ou haste principal se encontra representado entre as posições -208 e -52. O símbolo ● indica sítios polimórficos que ocorrem em regiões não pareadas, ► indica substituições associadas a determinados genótipos (entre parêntesis) e Δ indica sítios de inserções (Fonte: SMITH *et al.*, 1995).

1.2 Genótipos do HCV

O HCV foi classificado em seis grandes grupos genéticos, denominados genótipos, que são numerados com algarismos arábicos na ordem de sua descoberta, e possuem divergência de 31% a 33% em sua seqüência nucleotídica. As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da seqüência de nucleotídeos entre 75% e 80%) são denominadas subtipos e são indicadas por letras (SIMMONDS *et al.*, 1993a, 1995, 2005). Os

subtipos, por sua vez, apresentam um complexo de variantes genéticas com divergência na seqüência de nucleotídeos de 1,0% a 9,2%. Essas variantes, denominadas *quasispecies*, são resultado do acúmulo de mutações durante a replicação viral. A alta taxa de mutação do HCV parece ser atribuída a erros no processo de replicação do RNA pela RNA polimerase do vírus, a qual não apresenta atividade de exonuclease (*proofreading activity*) (BUKH *et al.*, 1995; FORNS *et al.*, 1999).

A distribuição dos vários genótipos e subtipos descritos do HCV apresenta significativa variação geográfica na freqüência com que são observados.

Assim, os genótipos 1, 2 e 3 são predominantemente encontrados na Europa, no Japão e nos Estados Unidos; o genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire; o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia (MCOMISH *et al.*, 1994; MELLOR *et al.*, 1995; NGUYEN *et al.*, 2005; NAINAN *et al.*, 2006) (Figura 5). Foram também caracterizados diversos subtipos pouco freqüentes em locais específicos, como é o caso do subtipo 2k na Moldávia (SAMOKHVALOV *et al.*, 2000), dos subtipos 1c e 3k na Indonésia (OKAMOTO *et al.*, 1994; TOKITA *et al.*, 1996) e do subtipo 3b no Japão (CHAYAMA *et al.*, 1994)

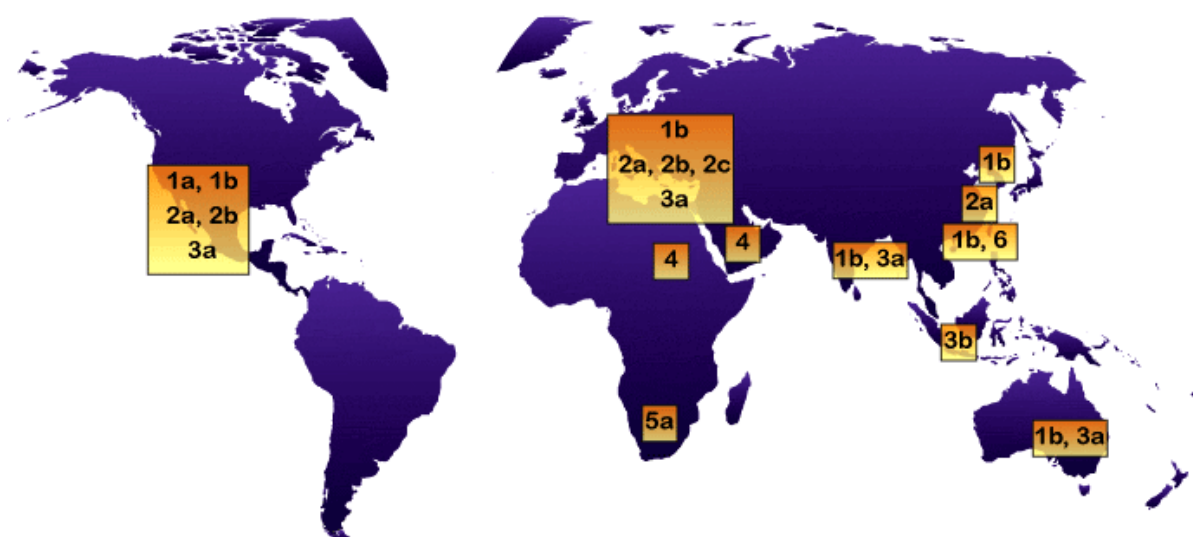


Figura 5: Distribuição mundial de genótipos do vírus HCV. Fonte: FANG J. *et al.*, 1997.

No Brasil, foi realizado estudo com 150 amostras de diversas regiões e grupos de risco analisadas pelo método de RFLP, tendo-se identificado o genótipo 1 como o mais freqüente (72%), seguido do 3 (25,3%) (OLIVEIRA *et al.*, 1999b). Outro trabalho recente analisou 1.688 amostras de diversas regiões geográficas do Brasil, obtendo freqüência de 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para o genótipo 2, 30,2% para o genótipo 3, 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5 (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Quando analisadas as diversas regiões do país, os estudos têm demonstrado considerável variação na distribuição de genótipos (Tabela 1). De forma geral, observa-se maior prevalência para o genótipo 1, seguido pelo genótipo 3 e o genótipo 2 (BUSEK *et al.*, 2003). Em algumas regiões, a população investigada ainda é insuficiente.

Também foram publicados no Brasil trabalhos relatando ocorrência de genótipos incomuns, como é o caso do genótipo 4 (BASSIT *et al.*, 1999) e do genótipo 5 (LEVI *et al.*, 2002), e outros descrevendo variações significativas em isolados do genótipo 3 (OLIVEIRA *et al.*, 1999a).

1.2.1 Genótipos do HCV em Minas Gerais

No estado de Minas Gerais já foi pesquisada a distribuição genotípica do vírus em pacientes pertencentes a grupos de risco específicos. Em um grupo de 44 pacientes com doenças hematológicas (majoritariamente hemofílicos), foi encontrada alta prevalência do genótipo 1 (84,1%), seguido do 3 (13,6%) (OLIVEIRA *et al.*, 1999a). Em outro estudo, 83 pacientes de hemodiálise da cidade de Belo Horizonte apresentaram 66,3% de prevalência para o genótipo 1, seguido pelo genótipo 2 com 24,1% e o 3 com 7,2% dos casos (BUSEK *et al.*, 2002)

Tabela 1: Estudos de prevalência de genótipos do HCV publicados no Brasil até 2007.

Autor	Local	N	Grupos de pacientes	Técnica	Prevalência dos genótipos 1 e 3
Krug, 1996	Porto Alegre	100	HCV+	RFLP	1=55% 3=37%
Bassit, 1999	São Paulo	130	HCV+	Hibridização (INNO LiPA®)	1=61,5% 3=33,1%
Oliveira, 1999	Belo Horizonte	44	Hemofílicos	RFLP	1=84,1% 3=13,6%
Paraná, 2000	Bahia	232	HCV+	Hibridização (INNO LiPA®)	1=64% 3=26%
Silva, 2000	Bahia	83	HCV+	RT-PCR tipo específica (capsídeo)	1=62,7% 3=21,7%
Busek, 2002	Belo Horizonte	83	Renais crônicos	RFLP	1=66,3% 3=7,2%
Souza, 2003	Tocantins	14	Renais crônicos	Hibridização (INNO LiPA®)	1=85% 3=15%
Vogler, 2004	Londrina	61	HCV+	Seqüenciamento (5'NCR)	1=77,1% 3=21,3%
Campiotto, 2005	São Paulo	840	HCV +	Seqüenciamento (5'NCR)	1=62,5% 3=32,2%
	R. de Janeiro	234			1=79,1% 3=16,3%
	Pernambuco	122			1=60,7% 3=36,9%
	Paraná	156			1=52,6% 3=41,7%
Martins, 2006	Região Centro-oeste	165	HCV+ (doadores)	HIBRIDIZAÇÃO (INNO LiPA®)	1=67,9% 3=29,1%

1.3 Transmissão e evolução clínica da hepatite C

A via parenteral, por transfusão com sangue contaminado, foi a principal forma de transmissão da hepatite C até início dos anos 90, quando foi iniciada a triagem sorológica em alguns bancos de sangue. No Brasil, a triagem sorológica para HCV em bancos de sangue foi estabelecida em 1993. Atualmente, o índice de transmissão do vírus por transfusão sanguínea no Brasil é pequeno (STRAUSS E., 2001), e os principais fatores de risco passaram a ser: uso de drogas injetáveis, procedimentos envolvendo reutilização ou compartilhamento de

materiais contaminados (vacinação, injeções, cirurgias, *piercing*, tatuagens etc.), hemodiálise e a recepção de múltiplas transfusões de sangue.

Clinicamente, a fase aguda da infecção é assintomática na maioria dos casos e a maior parte dos pacientes (70%-85%) apresenta cronificação da infecção. Para estes pacientes, o risco de cirrose, após 20 a 30 anos de infecção, é de 2% a 20%, e a partir da aparição de cirrose, cerca de 1% a 4% dos pacientes desenvolvem carcinoma hepatocelular, a cada ano (SEEF, 2002).

1.4 Epidemiologia da hepatite C

Estima-se que existam na atualidade aproximadamente 170 milhões de pessoas infectadas com o vírus HCV no mundo. Observa-se prevalência maior na África e em algumas regiões asiáticas, e menor na Europa e nos Estados Unidos (SHEPARD *et al.*, 2005; WHO, 1999) (Tabela 2, Figura 6).

Tabela 2: Prevalência mundial da hepatite C.

Regiões	População total (em milhões)	População infectada (em milhões)	População infectada (%)	Nº de países sem dados na região
África	602	31.9	5.3	12
Américas	785	13.1	1.7	7
Mediterrânea	466	21.3	4.6	5
Europa	858	8.9	1.03	19
Sudeste asiático	1 500	32.3	2.15	3
Oeste do Pacífico	1 600	62.2	3.9	11
Total	5.811	169,7	2,9	57

Fonte: WHO, Wkly Epidemiol Rec, 1999

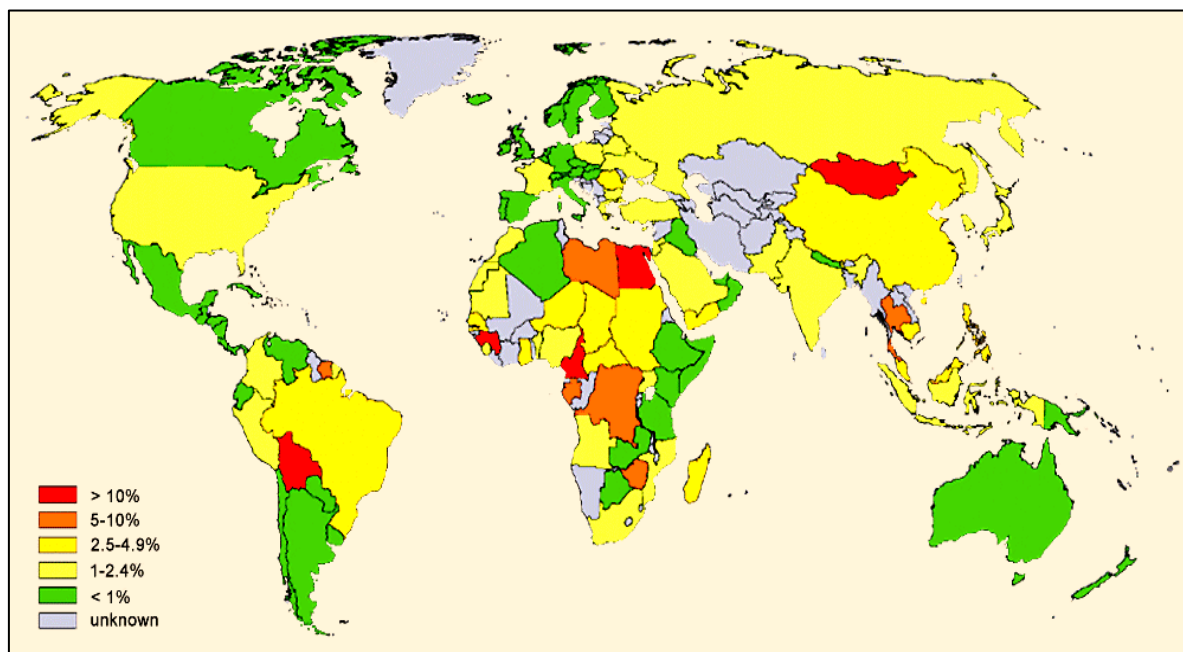


Figura 6: Prevalência mundial da hepatite C (Fonte: WHO, 2000).

No Brasil, em estudo realizado em 1999 entre pré-doadores de sangue, foi encontrada prevalência para HCV de 1,23% (FONSECA *et al.*, 1999). A maior taxa de prevalência foi encontrada na região Norte, e a menor na região Centro-Oeste (Tabela 3).

Tabela 3: Prevalência da hepatite C no Brasil, por região geográfica.

Regiões	Nº de amostras	Anti-HCV (+)	%
NORTE	183.195	3.891	2,12
CENTRO-OESTE	41.371	432	1,04
NORDESTE	191.720	2.290	1,19
SUDESTE	380.054	5.452	1,43
SUL	377.066	2.462	0,65
Total	1.173.406	14.527	1,23

Fonte: FONSECA *et al.*, 1999.

1.5 Diagnóstico laboratorial da infecção pelo HCV

O diagnóstico laboratorial da hepatite C envolve, normalmente, uma etapa de triagem sorológica realizada por ensaios imunoenzimáticos, e uma etapa confirmatória através de métodos qualitativos de detecção molecular de RNA viral, baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR).

Testes moleculares quantitativos são utilizados no acompanhamento terapêutico de pacientes, para quantificação da viremia (a concentração plasmática do vírus é medida em Unidades Internacionais por mililitro - UI/mL) enquanto que a genotipagem molecular encontra-se indicada para subsidiar a definição do plano terapêutico.

1.6 Genotipagem do HCV

A identificação do genótipo do HCV constitui ferramenta fundamental na adequada condução do paciente portador de hepatite C. O conhecimento do genótipo viral permite subsidiar definições a respeito do tratamento, além de prever as chances de resposta terapêutica (HNATYSZYN, 2005; SCOTT; GRETCH, 2007; ZEIN *et al.*, 1996). Os genótipos 1 e 4 são mais resistentes que os genótipos 2 e 3 aos tratamentos baseados na combinação de ribavirina e interferon- α *peguilado* (HNATYSZYN, 2005). A investigação do genótipo do HCV tem também importância em investigações epidemiológicas e em pesquisas imunológicas orientadas ao desenvolvimento de vacinas. Não se demonstrou, até agora, associação entre o genótipo do HCV e a progressão da hepatite C crônica para cirrose ou carcinoma hepatocelular (ZEIN, 2000). No entanto, é possível que manifestações clínicas como a esteatose hepática, mais frequente em portadores de genótipo 3, possam refletir diferenças na patogenicidade de distintos genótipos do HCV (FERNANDEZ SALAZAR *et al.*, 2004). O papel do genótipo do HCV na progressão da fibrose hepática é assunto

absolutamente controverso. Contudo, é possível que o genótipo 1b esteja associado à doença mais grave e agressiva e à recorrência da hepatite C acelerada no pós-transplante hepático (ZEIN, 2000).

Diversos métodos são utilizados para determinar o genótipo do HCV. De forma geral, podemos dividir os mesmos em métodos sorológicos e moleculares. Os métodos sorológicos são baseados na detecção de anticorpos genótipo-específicos. A sua implementação é simples, através de vários kits comerciais disponíveis, mas apresentam limitações de sensibilidade e especificidade.

Os métodos moleculares para genotipagem do HCV são diversos. Os mais utilizados são: hibridização com sondas tipo-específicas (STUYVER *et al.*, 1995), amplificação com iniciadores específicos (OHNO *et al.*, 1997), digestão com endonucleases de restrição ou RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*) (DAVIDSON *et al.*, 1995) ou seqüenciamento direto.

O método de referência para a identificação genotípica e para a classificação de isolados do HCV é o seqüenciamento direto do genoma do vírus, seguido da análise filogenética da seqüência obtida (DOGLIO *et al.* 1998; SIMMONDS *et al.*, 1995; SIMMONDS *et al.*, 2005; ZEIN N., 2000). Recomendações recentemente publicadas, para fins de classificação e designação de novos genótipos e subtipos, preconizam a análise filogenética de regiões codificantes do genoma viral, especificamente das regiões NS5b e capsídeo/E1, (SIMMONDS *et al.*, 2005).

Os métodos de seqüenciamento para fins de diagnóstico utilizam geralmente a região 5'UTR, pelo fato de ser esta região alvo da maioria dos testes diagnósticos para detecção do RNA do HCV (SIMMONDS *et al.*, 2005). Esta região se caracteriza por ser a mais conservada do genoma do HCV, porém apresenta vários polimorfismos que permitem caracterizar os diversos genótipos virais (DAVIDSON F. *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*,

1990; SIMMONDS *et al.*, 1993b; SMITH *et al.*, 1995). Diversos autores descreveram a identificação dos genótipos do HCV por seqüenciamento da região 5'UTR (HALFON *et al.*, 2001; O'BRIEN *et al.*, 1997; STUYVER *et al.*, 1995), inclusive através de seqüenciamento direto de produtos de PCR gerados pelo uso de kits comerciais (GERMER *et al.*, 1999; HOLLAND *et al.*, 1998; ROSS *et al.*, 2000).

Considerando a genotipagem para fins clínicos, os testes baseados no seqüenciamento da região 5'UTR exibem boa concordância com os genótipos identificados por seqüenciamento de outras regiões codificantes do genoma do vírus (SANDRES-SAUNÉ *et al.*, 2003; GERMER *et al.*, 1999). Entretanto, existem variantes do genótipo 6 cujas seqüências na região 5'UTR são idênticas às do genótipo 1. Deve-se ressaltar também que a diferenciação entre alguns subtipos não é possível nesta região, como é o caso dos subtipos 2a e 2c (SMITH *et al.*, 1995). Outra dificuldade se encontra na identificação dos subtipos 1a e 1b, baseada num único polimorfismo (G>A) na posição 243, o que pode levar segundo alguns autores à identificação errônea do subtipo em certo número de casos. Porém, não há concordância entre os autores a respeito da proporção de subtipos mal identificados, provavelmente devido a diferenças de metodologia e à casuística empregada (CHEN *et al.*, 2002; SANDRES-SAUNÉ *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 1995).

Pelo acima exposto, os testes de genotipagem baseados na análise da região 5'UTR podem apresentar nível de exatidão abaixo da esperada em regiões de alta diversidade, como por exemplo o sudeste asiático. De modo geral, deve-se considerar que o desempenho dos testes de genotipagem para HCV, especificamente os utilizados na rotina do diagnóstico molecular da hepatite C, está diretamente relacionado ao número de variantes presentes na população estudada. (SIMMONDS *et al.*, 2005).

No presente trabalho, foram estudadas amostras de pacientes portadores de hepatite C crônica, atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais do Município de Belo

Horizonte, e encaminhados para testes de caracterização molecular do HCV com finalidade diagnóstica ao NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais).

Esta pesquisa está inserida no projeto: “Caracterização molecular do vírus da hepatite C no município de Belo Horizonte, Minas Gerais – Brasil”

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a prevalência dos diferentes genótipos do HCV em pacientes portadores de hepatite C crônica, atendidos nos centros de referência do SUS localizados na cidade de Belo Horizonte, através de seqüenciamento direto de um fragmento da região viral 5'UTR.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Descrever a metodologia padronizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular do NUPAD, utilizada na rotina para a genotipagem do HCV em pacientes portadores de hepatite C.

2.2.2 Realizar alinhamento múltiplo de seqüências e seleção de variantes representativas dentro de cada grupo genético do vírus.

2.2.3 Executar a análise filogenética das principais variantes selecionadas dentro de cada grupo genético.

2.2.4 Comparar a identificação genotípica obtida por análise filogenética com a obtida pela metodologia de genotipagem de rotina para as variantes selecionadas.

2.2.5 Relatar e analisar a ocorrência de seqüências pertencentes a genótipos raros ou não característicos da região geográfica estudada, assim como de variantes ou mutações da região 5' UTR pouco freqüentes ou não publicadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

No período compreendido entre dezembro de 2002 e setembro de 2006, 788 pacientes portadores de hepatite C crônica residentes na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, e atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais credenciados pela Secretaria Estadual de Saúde, foram encaminhados ao NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais), para exames de diagnóstico molecular do vírus C. As amostras foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA. Os plasmas foram imediatamente separados e reservados em alíquotas de 100 µl congeladas a -70°C até a utilização.

3.2 Detecção do RNA viral – Teste qualitativo

Em todas as amostras analisadas foi confirmada a presença de RNA do HCV através de reação em cadeia da polimerase qualitativa (AMPLICOR[®] HCV Test v2.0 - Roche Molecular Systems Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. O teste baseia-se na amplificação de uma seqüência específica da região 5'UTR, através de transcrição reversa seguida de amplificação por PCR do cDNA (DNA complementar) obtido. Posteriormente, o produto de PCR é capturado por meio de hibridização molecular com sonda específica complementar à seqüência obtida e detectado por reação colorimétrica posterior. Junto com a amostra, um controle interno é extraído e amplificado, o que permite evidenciar a presença de fatores inibidores da PCR na amostra, assim como também controlar os procedimentos de extração e amplificação. O controle interno é uma seqüência de RNA sintético com uma composição de bases e tamanho similares à seqüência alvo do HCV (Tabela 4). Uma característica destacável deste kit é a utilização de Uracil N-glicosilase em todas as reações de

amplificação, como meio de prevenir a contaminação das amostras com produtos amplificados. O protocolo completo do teste qualitativo se encontra detalhado no anexo 1.

Tabela 4: Resumo das principais etapas do teste qualitativo para detecção do RNA do HCV*

Procedimento	Descrição
Extração de RNA/Purificação	Lise com tiocianato de guanidina, com prévia adição de controle interno no reagente. Precipitação com isopropanol e etanol.
Transcrição Reversa	Síntese de cDNA, a partir de RNA viral e de RNA do controle interno, utilizando enzima rTth pol, na presença do iniciador KY78 (biotinilado), Mn ²⁺ e dNTPs.
PCR	Reação de síntese de DNA de cadeia dupla a partir do cDNA, pela enzima rTth pol na presença dos <i>primers</i> KY78, KY80, Mn ²⁺ e dNTPs. Adição posterior de solução desnaturante.
Hibridização	Reação, em microplacas, dos produtos de PCR biotinilados com sondas específicas para HCV (KY150) e controle interno (SK535).
Deteção	Adição de conjugado de avidina-peroxidase. Adição de substrato (peróxido de hidrogênio e TMB). Leitura em 450 nm.

* Uma única enzima, rTth pol, é utilizada na transcrição reversa e no PCR. A mesma, na presença de Mn²⁺, possui ambas as atividades de transcriptase reversa e de DNA polimerase. Os resíduos de biotina do *amplicon* são provenientes do iniciador KY78, modificado por incorporação desta molécula.

3.3 Preparação do produto de PCR para seqüenciamento

Do volume total de produto de PCR obtido no teste qualitativo após o acréscimo da solução desnaturante, 50 µl foram utilizados nas etapas de hibridização e detecção descritas para a detecção do RNA viral. O produto restante, 150 µl, foi utilizado para os procedimentos de neutralização e posterior purificação. A neutralização foi efetuada pela adição de 4 µl de buffer Tris-HCl pH 7,5. Após a neutralização, o volume total da amostra foi purificado com o sistema Wizard SV[®] (Promega Corp.), de acordo com o protocolo do fabricante, com algumas modificações, e posteriormente re-diluído em 50 µl de água deionizada livre de nucleases.

Após purificação, foram aplicados 4 µl do produto em gel de agarose a 2%, juntamente com padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corp.) (Figura 7). Após eletroforese, os géis foram revelados com brometo de etídio, e a densidade

óptica das bandas produzidas pelas amostras foi comparada com as bandas do padrão de massa, para quantificação de DNA purificado obtido e cálculo da quantidade de amostra a ser adicionada na reação de seqüenciamento.

O protocolo utilizado para purificação e quantificação dos produtos de RT-PCR se encontra detalhado no anexo 2.

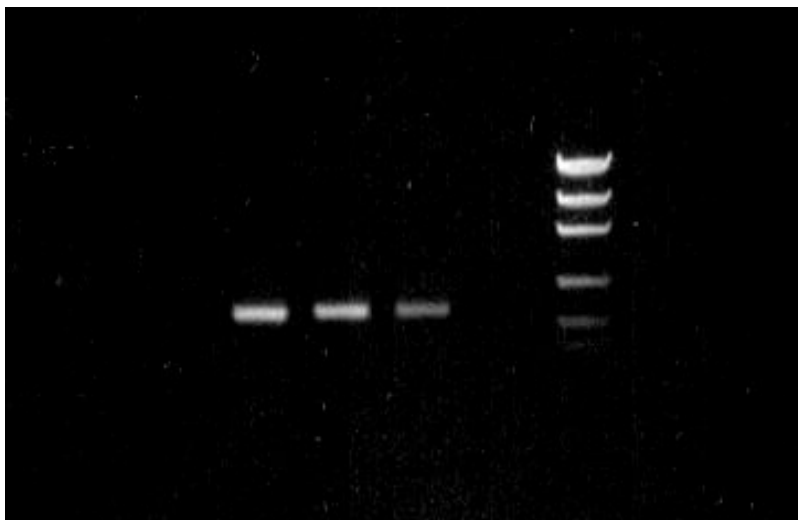


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de RT-PCR purificados

3.4 Reação de seqüenciamento – Eletroforese capilar

O *amplicon* obtido na etapa anterior é um fragmento de 244 bp, abrangendo da posição 68 até a posição 311 da região 5'UTR do genoma do HCV (Figura 8). Uma vez quantificado, o produto de PCR foi submetido à reação de seqüenciamento cíclico, utilizando o sistema BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems).

O método utilizado permite o seqüenciamento de um fragmento de 205 nucleotídeos da região 5' UTR, entre as posições 68 e 272. Resumidamente, foram utilizados 2 µl da solução *Ready Reaction Mix*, 6 µl do tampão de seqüenciamento provido pelo fabricante, 4 pmoles de iniciador e o volume de amostra necessário para introduzir na reação de 5 a 10 ng de DNA, de acordo com resultado da quantificação descrita no item 3.3. O volume final foi de

20 µl. A seqüência do iniciador utilizado na reação foi: 5' AGT ACC ACA AGG CCT TTC 3' (GERMER *et al.*, 1999), codificado no laboratório como PI-4 (Figura 8). Utilizou-se o sistema de numeração da seqüência nucleotídica do HCV sugerido por Kuiken e colaboradores (KUIKEN *et al.*, 2006).



Figura 8: Seqüência completa da região 5'UTR do genoma do HCV (código de acesso ao GenBank M67463). São indicadas as seqüências correspondentes aos primers KY78 e KY80 e ao iniciador utilizado na reação de seqüenciamento (PI-4).

As reações de seqüenciamento foram efetuadas no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Depois de efetuada a reação, o produto obtido foi purificado por precipitação com isopropanol 70% e lavado três vezes com etanol 70%, com a finalidade de retirar o excesso de desoxiribonucleotídeos e pigmentos não incorporados na reação. A seguir, as amostras foram processadas no seqüenciador ABI 3100-Avant® (Applied Biosystems) através de eletroforese capilar em capilares de 50 cm. Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o programa Sequencing Analysis v3.7 (Applied Biosystems).

O protocolo detalhado de seqüenciamento se encontra no anexo 3.

3.5 Genotipagem

As seqüências de 205 nucleotídeos obtidas foram convenientemente editadas, sendo também eliminada a seqüência homóloga ao iniciador KY78. Desta forma, foram obtidas seqüências de 172 nucleotídeos, abrangendo desde a posição 92 à 263. Todas as seqüências foram arquivadas em formato FASTA antes de proceder à identificação do genótipo.

A identificação dos genótipos foi realizada através de análise comparativa da seqüência de 172 nucleotídeos obtida contra um painel de seqüências de referência dos genótipos do HCV 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 5a e 6a (Figura 9). Os códigos de acesso ao GenBank das seqüências de referencia utilizadas para a genotipagem são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Seqüências de referência utilizadas na identificação dos genótipos do HCV.

GENÓTIPO	ISOLADOS	NÚMERO(S) DE ACESSO AO GENBANK
1a	HPCPLYPRE, HPCCGAA	M62321, M67463
1b	HPCJCG, HPCHUMR	D90208, M58335
2a	HPCPOLP, JFH-1	D00944, AB047639
2b	HPCJ8G, JPUT971017	D10988, AB030907
2c	BEBE1	D50409
3a	HPCEGS, HPCK3A	D17763, D28917
4a	HPC4APOLY	Y11604
5a	EUH1480	Y13184
6a	Y12083	Y12083

1a (M62321)	TAGTATGAGTGTTCGTGCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCCGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGG	90
1a (M67463)	90
1b (D90208)T.....	90
1b (M58335)	90
2a (D00944)A.....C.....G..	90
2a (AB047639)A.....C.....G..	90
2b (D10988)A.....C.....A..G.A	90
2b (AB030907)A.....C.....G.A	90
2c (D50409)A.....C.....G..	90
3a (D17763)C.....C..TG..	90
3a (D28917)C.....C..TG..	90
4a (Y11604)T..A.....T.....C..G..	90
5a (Y13184)AA.....G..	90
6a (Y12083)A.....C.....C.....	90
1a (M62321)	ACGACCGGGTCCTTTC--TTGGATCAA-CCCGCTCAATGCCTGGAGATTGGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTG	172
1a (M67463)--.....A.-.....	172
1b (D90208)--.....-.....G.....	172
1b (M58335)--.....-.....G.....	172
2a (D00944)	.A...T.....--.....A.-...A...T....C..TC.....C.	172
2a (AB047639)	.A...T.....--.....A.-...A...T....C..CC.....C.	172
2b (D10988)	.A...T.....--.....A.-...A...T...T.C..TC.....AC.....C.	172
2b (AB030907)	.A...T.....--.....A.-...A...T...T.C..TC.....C.	172
2c (D50409)	.A...T.....--.....A.-...A...T....C..TC.....C.	172
3a (D17763)	GT.....--.....G.-.....A..CA..A.....G...TCA.....	172
3a (D28917)	GT.....--.....A.-.....A..CA..A.....G...TCA.....	172
4a (Y11604)	.T.....--.....T.-.....C..A.....	172
5a (Y13184)	.T.....--.....A.-.....C.....G.....	172
6a (Y12083)	.T.....CA.....A.....C.....	175

Figura 9: Alinhamento múltiplo das seqüências de referência utilizadas para identificação do genótipo. À esquerda, entre parêntesis, é mostrado o código de acesso ao GenBank correspondente.

A análise comparativa entre a seqüência obtida e o painel de seqüências de referência foi realizada com o programa BioEdit v7.07 (HALL, 1999). A seguir, cada seqüência foi submetida à análise complementar no BLAST (Nacional Center for Biotechnology Information-NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para verificação de similaridade com seqüências de HCV depositadas no GenBank.

3.6 Agrupamento e alinhamento das seqüências obtidas.

As seqüências obtidas através do método descrito foram organizadas em seis grupos (1a, 1b, 2b, 3a, 2a/c, e 4), de acordo com os resultados obtidos na identificação. A cada grupo foram adicionadas as seqüências de referência correspondentes (Tabela 5, Figura 9). Posteriormente, foi realizado alinhamento múltiplo de cada grupo através do programa ClustalX (THOMPSON, 1997) e construídas matrizes de distância utilizando o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR;TAMURA; NEI, 2004).

A partir dos alinhamentos obtidos para cada um dos seis grupos de seqüências e das correspondentes matrizes de distância, foi realizada análise da variabilidade genética dentro de cada grupo.

Também a partir dos alinhamentos e matrizes obtidas, e com o objetivo de realizar posterior análise filogenética, foram selecionadas 34 seqüências representativas de todas as variantes presentes em cada grupo. Foram incluídas nesta seleção todas as seqüências que apresentaram substituições em relação às de referência para os grupos 1a, 1b, 2b e 3a, sendo que por cada grupo de seqüências idênticas foi selecionada apenas uma amostra. Foram também incluídas todas as seqüências identificadas como pertencentes aos genótipos 2a/c e 4. No total, foram selecionadas dez seqüências pertencentes ao grupo 1a, sete ao grupo 1b, quatro ao grupo 2b, oito ao grupo 3a e todas as seqüências do grupo 2a/c (três) e do grupo 4 (duas) (Figura 10).

	M67463	TAGTATGAGT	GTCGTGCAGC	CTCCAGGACC	CCCCCTCCCG	GGAGAGCCAT	AGTGGTCTGC	GGAACCGGTG	AGTACACCGG	AATTGCCAGG
1a	162pC.....
	163pC.....
	1169p
	1397pA.....
	1859pA.....
	2347pT.....
	3400p
	3595pA.....
	3736pA.....
	4318p
1b	2866p
	2959p
	3233p
	3601pT.A.....
	3661p
2a/c	3750p
	4494p
	1175pA.....C.....G.....
	1386pT.A.....C.....G.....
	2259pT.A.....C.....G.....
2b	2249pA.....C.....G.A.....
	2536pA.....C.....A.G.A.....
	4319pA.....C.....G.A.....
	3681pA.....C.....A.G.A.....
	1186pC.....C.....C.TG.....
3a	3392pC.....C.....C.TG.....
	3792pC.....C.....C.TG.....
	3809pC.....C.....C.TG.....
	4082pC.....C.....C.TG.....
	4134pC.....C.....C.TG.....
4	4297pC.....C.....C.TG.....
	4399pC.....C.....C.TG.....
	285pT.....C.G.....
	451pT.A.....C.G.....
	M67463	ACGACCGGGT	CCTTCTTTGG	ATA-AACCCG	CTCAATGCCT	GGAGATTTGG	GCGTGCCCCC	GCAAGACTGC	TAGCCGAGTA	GTG
1a	162p	.T.....A.....C.....
	163p	.T.....A.....
	1169pAC-
	1397p-C.....
	1859p-C.....
	2347pG.....-C.....
	3400pA.....C.....
	3595pC.....
	3736p
	4318pC-
1b	2866pTA.....G.....
	2959pTT.....G.....
	3233pCA.....G.....C.....
	3601pG.....
	3661pAT-G.....
2a/c	3750pT-G.....
	4494pGT-G.....
	1175p	.A...T.....A.....T.....C.....CC.....C.....
	1386p	.A...T.....-C...A.....TT.....C.....CC.....C.....
	2259p	.A...T.....-C...A.....TG.....C.....CC.....C.....
2b	2249p	.A...T.....A.....T...T.C.....TC.....A.....C.....
	2536p	.G...T.....-A.....C...T.C.....TC.....C.....
	3681p	.A...T.....-A.....T...T.C.....TC.....C.....
	4319p	.A...T.....-A.....T...T.C.....TC.....C.....
	1186p	GT.....GT-.....A..C A..A.....G...TCA.....
3a	3392p	GT.....GT-.....A..C A..A.....G...TCA.....
	3792p	GT.....GT-.....A..C A..A.....G...TCA.....
	3809p	GT.....ACA.....A..C A..A.....G...TCA.....
	4082p	GT.....GTA.....A..C A..A.....G...TCA.....
	4134p	GT.....GC-T.....A..C A..A.....G...TCA.....
4	4297p	GT.....C-.....A..C A..A.....G...TCA.....
	4399p	GT.....GC-.....A..C A..A.....G...TCA.....
	285p	.T.....T.....C.....A.....
	451p	.T.....T.....C.....A.....G.....

Figura 10: Alinhamento das 34 seqüências de 172 nucleotídeos da região 5'UTR selecionadas. Na primeira linha, a correspondente ao isolado HPCCGAA (genótipo 1a), representada pelo seu código de acesso ao GenBank (M67463).

3.7 Alinhamento múltiplo das seqüências selecionadas para análise filogenética

As 34 seqüências de 172 nucleotídeos escolhidas foram submetidas a alinhamento múltiplo, juntamente com as seqüências de referência apresentadas na Tabela 5. Todas as referências utilizadas pertenciam a isolados com classificação confirmada (SIMMONDS *et al.*, 2005). Para o genótipo 6, foi escolhido apenas o isolado HCV12083 (acesso ao GenBank Y12083), classificado como subtipo 6a, com a finalidade de incluir uma variante deste genótipo na análise filogenética, a despeito de não ter sido até o momento descrita nenhuma ocorrência do mesmo na população brasileira.

3.8 Análise filogenética

Posteriormente, procedeu-se à análise filogenética das 34 seqüências selecionadas e previamente alinhadas com as seqüências de referência dos 6 genótipos do HCV. Todas as análises foram realizadas com o programa MEGA versão 3.1. Em primeiro lugar, foi computada uma matriz de distâncias utilizando o modelo de Jukes-Cantor, sendo a seguir construída a árvore filogenética pelo método de *neighbor-joining* (SAITOU N.; NEI M., 1987).

A análise estatística foi realizada através do método de “bootstrap” (FELSENSTEIN J., 1985) com re-amostragem de 500 replicatas, através do qual foi possível estimar o grau de significância estatística das ramificações na topografia obtida. Adicionalmente, para efeitos de melhor visualização dos resultados, foi re-processado o filograma obtido para o formato radial.

3.9 Análise comparativa das amostras do genótipo 4

Separadamente, as duas espécies caracterizadas como genótipo 4 (285p e 451p) foram submetidas a alinhamento múltiplo juntamente com a seqüência correspondente ao isolado

HCV4APOLY (4a) e diversas variantes do genótipo 4 com classificação provisória do subtipo (SIMMONDS *et al.*, 2005). As seqüências utilizadas foram obtidas da base de dados de seqüências de HCV de Los Alamos-USA, (*The Los Alamos HCV Sequence Database*, <http://hcv.lanl.gov>) (KUIKEN *et al.*, 2005). Dos 19 subtipos já descritos do genótipo 4, foram utilizados 14 (4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 4h, 4n, 4o, 4p, 4q, 4r e 4t), sendo que dos 5 restantes (4i, 4j, 4k, 4l e 4m) não foram encontradas seqüências publicadas correspondentes à região 5'UTR analisada (Tabela 6). Após efetuado o alinhamento, foi analisado o grau de similaridade das amostras de código 285p e 451p com os diversos subtipos do genótipo 4 mencionados. Para melhor visualização desta análise comparativa, foi construída uma matriz de distancias através do programa MEGA versão 3.1.

Tabela 6: Variantes do genótipo 4 utilizadas na análise comparativa.

GENÓTIPO	ISOLADO	CÓDIGO DE ACESSO AO GENBANK
4a	HCV4APOLY	Y11604
4b	Z1	M84845
4c	Z6	M84865
4d	DK13	M84832
4e	CAM600	L29588
4f	G22	L29594
4g	GB549	L29619
4h	GB438	L29612
4n	QC97	AY434136
4o	QC59	AY434109
4p	QC139	AY434151
4q	QC86	AY434127
4r	Z4	M84848
4t	QC85	AY706995

RESULTADOS

4.1 Estudo genotípico por seqüenciamento de HCV de pacientes portadores de hepatite C da região metropolitana de Belo Horizonte

Como descrito em Material e Métodos, pacientes da região metropolitana de Belo Horizonte, portadores de hepatite C, atendidos na rede pública entre 2002 e 2006, foram avaliados quanto ao genótipo viral.

De 788 amostras examinadas, 777 (98,6%) foram seqüenciadas e tiveram os seus genótipos determinados. Em 11 amostras (1,4%), não foi possível a identificação do genótipo em razão da pequena quantidade de RNA viral obtida nas mesmas, o que motivou a obtenção de seqüências sem a qualidade suficiente para análise.

A identificação do genótipo do HCV em 777 amostras apresentou o seguinte resultado: 609/777 (78,4%) foram identificadas como genótipo 1, sendo 291 (37,5%) do subtipo 1a e 314 (40,4%) do subtipo 1b; 139 amostras (17,9%) foram identificadas como genótipo 3a; 24 amostras (3,1%) como genótipo 2b; três (0,4%) como genótipo 2a/c e duas (0,2%) como genótipo 4. A definição do genótipo misto 2a/c foi feita a partir da similaridade entre os subtipos a e c na região 5'UTR. Quatro amostras (0,5%) identificadas como genótipo 1 apresentaram subtipo indefinido por exibir superposição (G/A) na posição 243, sendo portanto identificadas como genótipo 1a/b (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição genotípica do HCV em 788 amostras analisadas no NUPAD-UFMG, no período de 2002 a 2006.

Genótipo do HCV	Número de amostras	Frequência (%)
1a	291	37,5
1b	314	40,4
1a/b	4	0,5
2a/c	3	0,4
2b	24	3,1
3a	139	17,9
4	2	0,2
Total	777	100,0
N/D	11	
Total de amostras*	788	

* cada amostra é representativa de um paciente portador de hepatite C crônica. N/D: genótipo não determinado.

Nas duas seqüências obtidas do genótipo 4 (285p e 451p) não foi especificado o subtipo devido à ausência de similaridade completa com o isolado de referência HCV4APOLY (4a) utilizado na rotina para genotipagem.

4.2 Estudo de variabilidade das seqüências da região 5' UTR obtidas

Como já descrito em Material e Métodos (item 3.6), o total de 777 seqüências obtidas foi dividido em 6 grupos (1a, 1b, 3a, 2b, 2a/c e 4), com a finalidade de analisar a variabilidade das mesmas e facilitar o procedimento de seleção de variantes. Cada um destes grupos foi submetido a alinhamento múltiplo, sendo calculada a matriz de distâncias correspondente.

O alinhamento múltiplo realizado nos seis grupos de seqüências evidenciou diversidade de variantes dentro de cada um dos mesmos. Dentro do grupo 1a, foi observada divergência de até 2,3% (isolados 162p e 163p) em relação às seqüências de referência. No grupo 1b e no grupo 3a, a divergência atingiu 1,8%. Dentro do grupo 2b, foram encontradas as maiores divergências, chegando a 3% em um dos isolados (2536p), o que representa cinco

substituições de nucleotídeos. No grupo 2a/c, apenas uma das amostras apresentou completa similaridade com a seqüência de referência enquanto as duas restantes apresentaram divergências de 1,8%. Já no grupo 4, como foi detalhado no item 4.1, nenhuma das duas seqüências encontradas (285p e 451p) exibiu completa similaridade com a espécie de referência utilizada (subtipo 4a), apresentando ambas duas substituições em relação à mesma (1,2% de diferença).

Em 17 seqüências, sendo quatro pertencentes ao genótipo 1a, oito ao 1b, e cinco ao 3a, foi observada inserção de adenina entre as posições 204 e 205 (204_205insA). Em três seqüências, uma pertencente ao genótipo 1b e duas ao 3a, foi observada inserção de timina na mesma posição (204_205insT).

Adicionalmente, foi detectado padrão de mistura nas seqüências em cinco amostras. Em quatro delas, três pertencentes ao genótipo 1a e uma ao 3a, foi observada superposição até a posição 204. A análise do eletroferograma revelou a presença de duas cadeias de cDNA, uma com a seqüência normal (172 nucleotídeos), e outra apresentando inserção de adenina (204_205insA). A restante, correspondente ao genótipo 3a, apresentava superposição até a posição 119, revelando a presença de uma cadeia normal e outra contendo inserção de citosina (119_120insC) (figuras 11 e 12). Em todos os casos, as amostras foram reprocessadas a partir de alíquotas independentes, confirmando os resultados expostos.

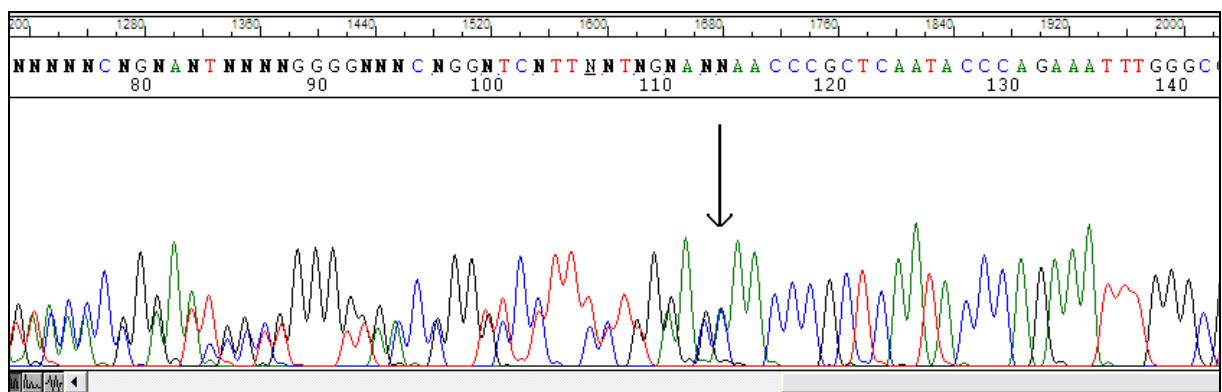


Figura 11: Eletroferograma exibindo padrão de superposição de seqüências até a posição 204 (seta).

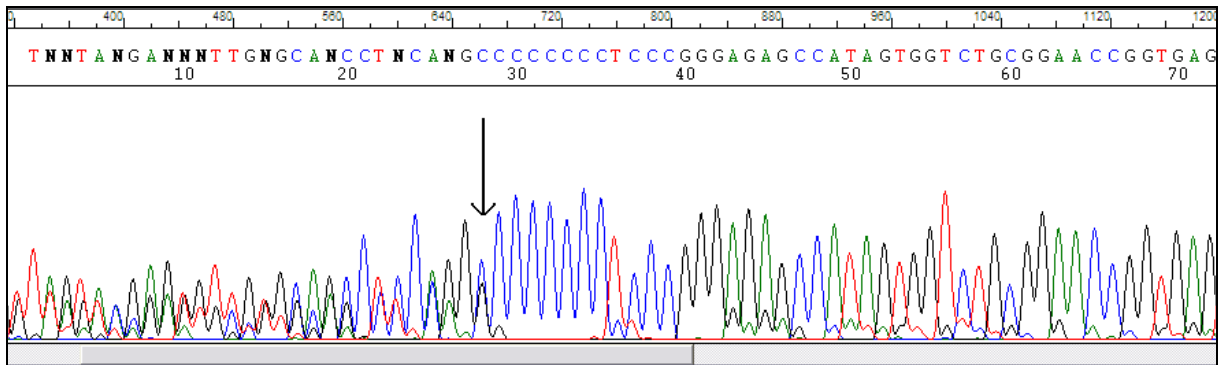


Figura 12: Eletroferograma exibindo padrão de superposição de seqüências até a posição 119 (seta).

4.3 Análise filogenética de seqüências de HCV obtidas de pacientes portadores de hepatite C da região metropolitana de Belo Horizonte

A análise filogenética mostrou o agrupamento esperado das seqüências selecionadas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os valores de “*bootstrap*” mostraram significância estatística para os nós principais correspondentes a estes genótipos na árvore obtida (> a 50% das replicatas produzidas no “*bootstrap*”) (Figuras 13 e 14).

A maioria das seqüências pertencentes aos subtipos 1a e 1b se agrupou próximo às seqüências de referência dos mesmos, mas não houve suficiente suporte estatístico para as ramificações obtidas dentro do genótipo 1. As seqüências 162p e 163p, previamente identificadas como subtipo 1a, segregaram de forma independente no filograma, sendo que a ramificação obtida para as mesmas foi estatisticamente significativa (valor de “*bootstrap*” de 91%). Estas espécies foram as que apresentaram maior número de substituições dentro do grupo de seqüências do genótipo 1a (item 4.2).

As duas seqüências correspondentes ao genótipo 4 se agruparam como esperado junto ao genótipo 4a na análise filogenética.

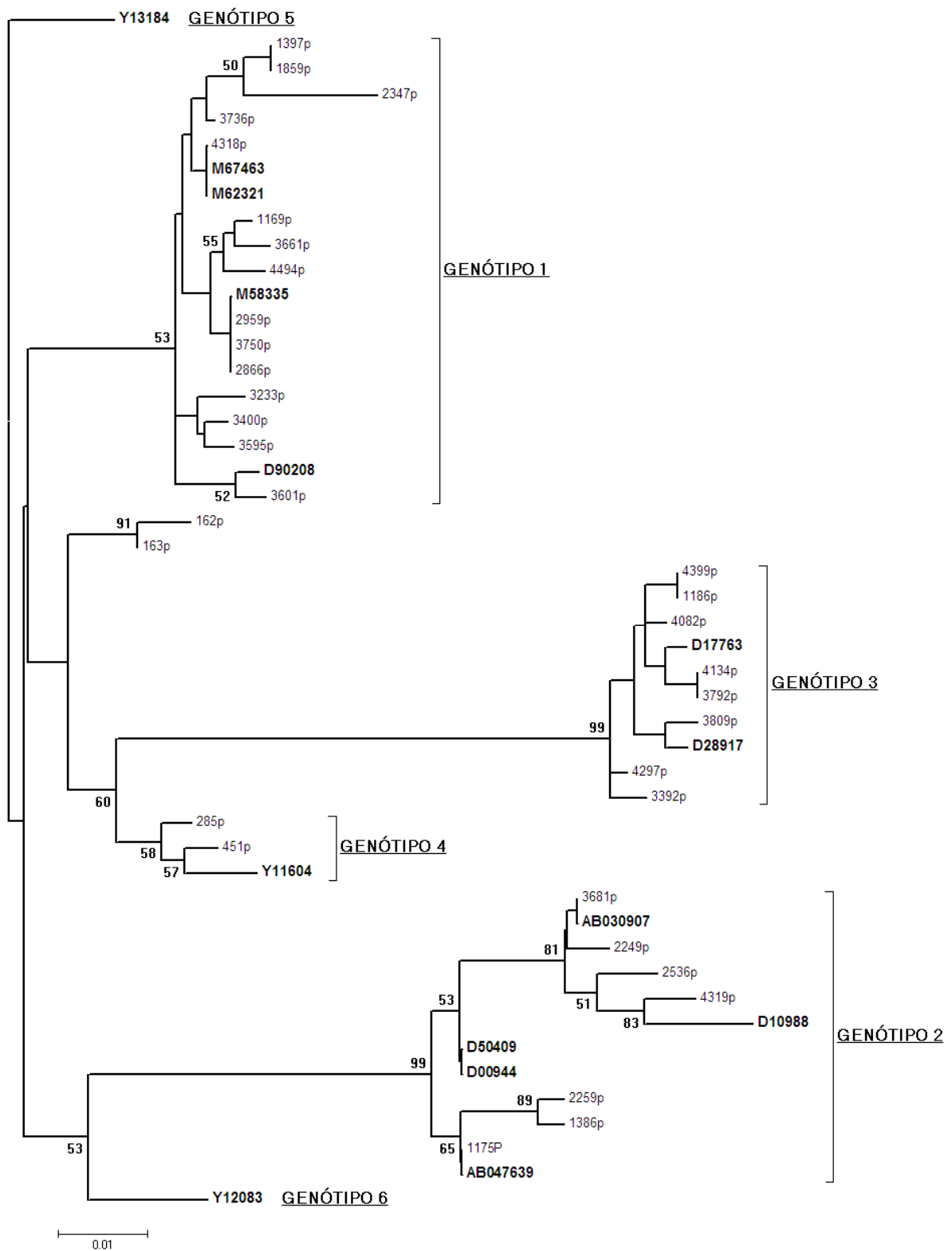


FIGURA 13 - Filograma tipo *neighbor joining* com correção de Jukes-Cantor e re-amostragem tipo “*bootstrap*” (500 replicatas) do segmento de 172 nucleotídeos estudado (posições 92 a 263) da região 5’UTR. Os valores de “*bootstrap*” superiores a 50% são mostrados próximos aos nós. As seqüências de referência utilizadas aparecem em negrito. As restantes são as seqüências selecionadas representativas das variantes obtidas dentro de cada genótipo.

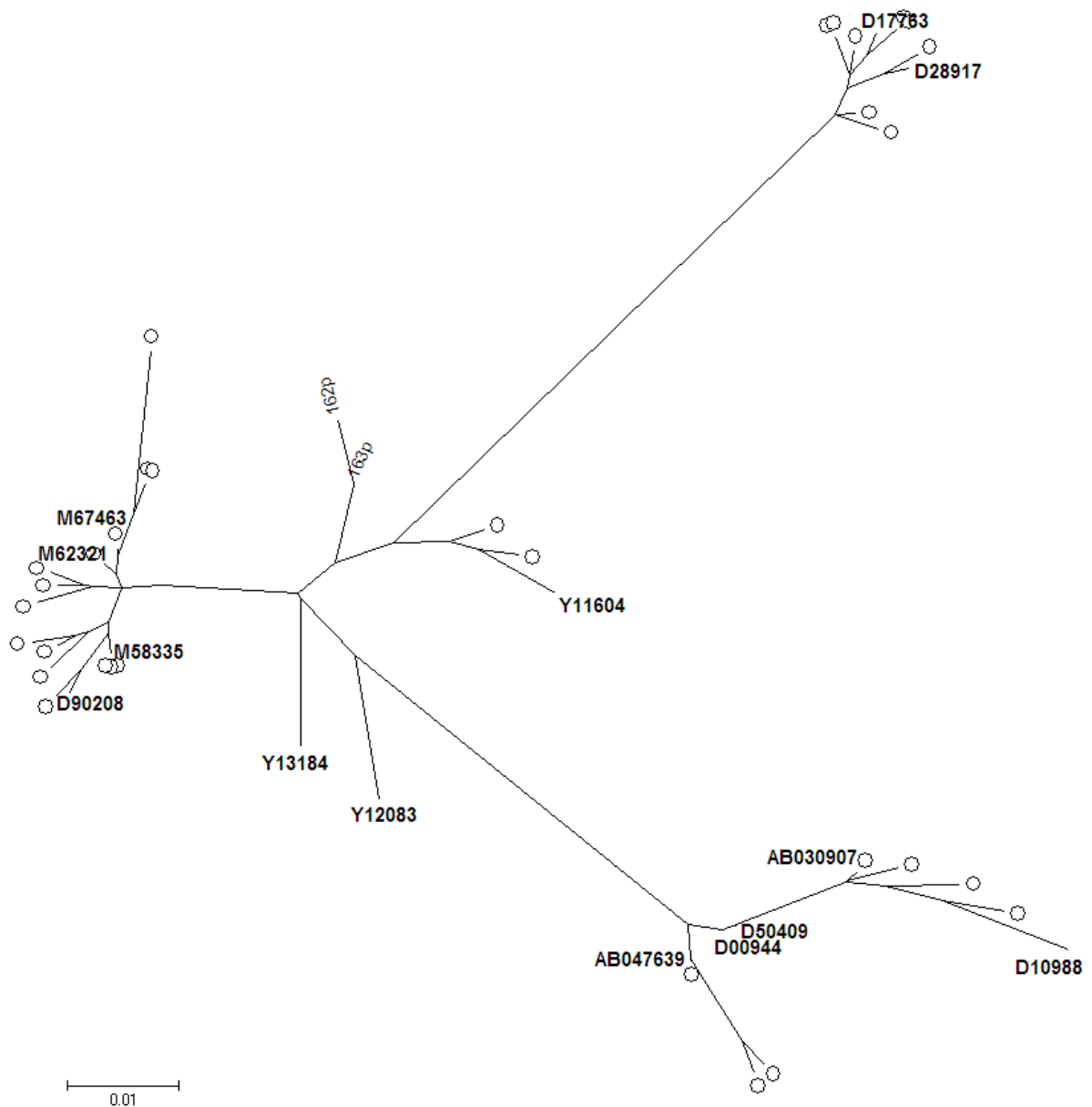


FIGURA 14 – Árvore filogenética do tipo *neighbor joining* com correção de Jukes-Cantor em visualização radial. São mostradas as seqüências de referência (em negrito) e as seqüências dos isolados 162p e 163p. O símbolo ○ indica a posição das seqüências das amostras selecionadas.

4.4 Análise complementar das amostras do genótipo 4

A análise posterior das amostras identificadas como genótipo 4, realizada por alinhamento e análise de similaridade com diversas seqüências de referência deste genótipo, revelou maior similaridade com a seqüência de referência do genótipo 4t (99,4%) e ligeiramente menor (98,8%) com os genótipos 4a, 4c, 4d e 4n (Tabela 8).

Tabela 8: Matriz de distância genética calculada a partir de seqüências de referência do genótipo 4 junto com as amostras 285p e 451p

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
4a(Y11604)	[1]																
4b(M84845)	[2]	0.037															
4c(M84862)	[3]	0.012	0.031														
4d(M84832)	[4]	0.012	0.031	0.000													
4e(L29588)	[5]	0.024	0.037	0.018	0.018												
4f(L29594)	[6]	0.031	0.056	0.031	0.031	0.043											
4g(L29619)	[7]	0.043	0.043	0.037	0.037	0.043	0.050										
4h(L29612)	[8]	0.050	0.076	0.050	0.050	0.063	0.069	0.056									
4n(AY434136)	[9]	0.012	0.024	0.006	0.006	0.012	0.031	0.031	0.050								
4o(AY434109)	[10]	0.043	0.043	0.037	0.037	0.043	0.037	0.012	0.056	0.031							
4p(AY434151)	[11]	0.018	0.037	0.006	0.006	0.024	0.024	0.031	0.056	0.012	0.031						
4q(AY434127)	[12]	0.024	0.050	0.024	0.024	0.037	0.043	0.031	0.024	0.024	0.031	0.031					
4r(M84848)	[13]	0.037	0.050	0.031	0.031	0.037	0.043	0.043	0.063	0.024	0.043	0.024	0.050				
4t(AY706995)	[14]	0.006	0.031	0.006	0.006	0.018	0.024	0.037	0.043	0.006	0.037	0.012	0.018	0.031			
285p	[15]	0.012	0.037	0.012	0.012	0.024	0.031	0.031	0.050	0.012	0.043	0.018	0.024	0.037	0.006		
451p	[16]	0.012	0.037	0.012	0.012	0.024	0.031	0.043	0.037	0.012	0.043	0.018	0.024	0.024	0.006	0.012	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

5 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada no NUPAD-UFMG para genotipagem do HCV é o seqüenciamento direto dos produtos de RT-PCR obtidos nos testes qualitativos realizados com o kit AMPLICOR[®], seguido de análise do grau de similaridade das seqüências obtidas com seqüências de referência dos diversos genótipos virais. O seqüenciamento dos fragmentos gerados pelo kit AMPLICOR[®] já havia sido proposto por Holland *et al.* (1998), obtendo 86% de eficiência no seqüenciamento destes produtos de PCR, e por Germer *et al.* (1999), obtendo 89,4%. O número de seqüenciamentos bem sucedidos neste trabalho foi de 777 (98,6%) em 788 amostras processadas, ou seja, maior eficácia da metodologia quando comparada a trabalhos anteriores, no que diz respeito ao número de seqüenciamentos em relação ao número de amostras comprovadamente positivas analisadas. Isto provavelmente é devido a diferenças nos diversos protocolos empregados.

Quanto à distribuição dos diferentes genótipos na população estudada, os resultados deste trabalho mostraram alta prevalência da infecção pelo genótipo 1 nos pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais no município de Belo Horizonte. Em 609 (78,4%) de 777 pacientes portadores de hepatite C crônica, identificou-se o genótipo 1 do HCV. Dados previamente publicados haviam reportado prevalência deste genótipo no Brasil variando de 52,6% no Paraná (CAMPIOTTO *et al.*, 2005) a 85% no Tocantins (SOUZA *et al.*, 2003). Na região Sudeste, já havia sido reportada alta prevalência para o genótipo 1 no Rio de Janeiro (79,1%) mas expressivamente menor em São Paulo (62,5%) (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Em Belo Horizonte, já foram publicados dados de prevalência deste genótipo em grupos de risco específicos, variando de 84,1% (hemofílicos) a 66,3% (pacientes renais crônicos) (BUSEK *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 1999a).

Observou-se nesta investigação que, apesar da proximidade na prevalência dos genótipos 1a e 1b, houve predomínio do subtipo 1b (40.4%) quando comparado ao subtipo 1a (37,5%). Não obstante, este resultado deve ser analisado com cautela uma vez que a diferenciação do subtipo 1a do 1b na região 5' UTR, se baseia em um único polimorfismo (G>A) na posição 243 o que, segundo alguns autores, contribui para caracterizar erroneamente o subtipo em alguns casos (CHEN *et al.*, 2002; SANDRES-SAUNÉ *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 1995). Para verificar a ocorrência de equívoco na subtipagem para o genótipo 1 e comprovar a proporção em que este ocorre na nossa população, deveria ser reanalisado um número suficiente de amostras de ambos subtipos por seqüenciamento de outra região sub-genômica do vírus.

Também dentro do genótipo 1 foram observadas quatro seqüências que apresentavam superposição na posição 243, e que foram caracterizadas como 1a/b. A presença de superposição nesta posição pode ser resultado da presença de infecção por ambos subtipos ou da presença de diferentes *quasispécies* originadas a partir do mesmo subtipo durante a infecção (CHEN;WECK, 2002; FORNS *et al.*, 1999). Todavia, este número de quatro subtipagens (0,7%) indefinidas para o genótipo 1 em um total de 609 amostras deste genótipo é pequeno, se comparado com resultados obtidos por outras metodologias. Chen e Weck (2002), obtiveram 13,6% de indefinição de subtipagem para o genótipo 1 na análise de 1.035 amostras utilizando o método INNO-LiPA HCV II. Já Ohno *et al.* (1997) obtiveram 15 (3,6%) de indefinições de subtipo em 420 amostras do genótipo 1 analisadas por PCR tipo específica da região do capsídeo viral.

O genótipo 3a, mais prevalente no sul do Brasil e algumas localidades do nordeste (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; KRUG *et al.*, 1996), foi detectado em 139 casos (17.9%). Apenas 27/777 amostras (3,5%) apresentaram genótipo 2, sendo 24 do subtipo b e 3 de subtipo indefinido a ou c, em razão da similaridade das seqüências desses dois subtipos na região

5'UTR. Somados, os genótipos 2 e 3 apresentaram uma frequência de 21.4%.

O genótipo 4, muito frequente em alguns países da África e no Oriente Médio (MCOMISH *et al.*, 1994, NGUYEN *et al.*, 2005), mas extremamente raro no Brasil (BASSIT *et al.*, 1999, CAMPIOTTO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 1999b), foi identificado em dois isolados. Para tais isolados não foi especificado o subtipo, devido à ausência de resultados de subtipagem definidos no BLAST, e ausência de similaridade completa com o isolado de referência HCV4APOLY (4a) utilizado na rotina para genotipagem. A baixa prevalência da infecção pelo genótipo 4 encontrada no nosso meio também tem sido reportada em outros países da América e na Europa (MCOMISH *et al.*, 1994; MELLOR *et al.*, 1995; NAINAN *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2005).

Nesta investigação não houve amostras identificadas com os genótipos 5 ou 6. Este achado era esperado, já que o genótipo 5 é frequentemente encontrado na África do Sul e o 6 no sudeste asiático, mas são extremamente raros na América e na Europa (NGUYEN *et al.*, 2005).

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu a descrição de algumas ocorrências pouco frequentes. Por meio da distribuição das 777 seqüências obtidas em seis grupos e posterior alinhamento múltiplo e análise das mesmas, foi possível observar e relatar alguns eventos, como é o caso da inserção de A ou T na posição 204-205 em 17 amostras dos genótipos 1 e 3. Já foram relatadas inserções de C e T na mesma posição em algumas variantes dos genótipos 4 e 6 (BUKH *et al.*, 1992; SMITH *et al.*, 1995) (Figura 4), mas não foi possível encontrar relatos de inserções de A ou T nesta posição em seqüências dos genótipos 1 ou 3.

Em cinco casos, foi comprovada a presença de duas seqüências diferentes na mesma amostra, sendo uma cadeia normal e outra apresentando alguma das inserções mencionadas acima. Estes cinco casos também pertencem aos genótipos 1 e 3, o que reforça a hipótese

desse tipo de inserções ocorrer com certa frequência também nesses dois genótipos. É possível que a coexistência de duas cadeias de RNA diferentes nestas amostras seja explicada pela presença de duas *quasispécies*, ambas com concentração plasmática semelhante no momento da análise. Deve-se ressaltar que as *quasispécies* são geradas por erros na síntese do RNA viral durante o curso da infecção (BUKH *et al.*, 1995; FORNS *et al.*, 1999).

De acordo à metodologia anteriormente descrita, para proceder à análise filogenética foram selecionadas 34 seqüências representativas das variantes presentes nos genótipos 1a, 1b, 2b e 3a, sendo que para os grupos 2 a/c e 4 foram incluídas todas as seqüências obtidas. Os resultados da análise filogenética mostraram agrupamentos bem definidos e com suporte estatístico significativo para todos os genótipos. A falta de suporte estatístico para os agrupamentos dos subtipos dentro do genótipo 1 era esperada (CHEN *et al.*, 2002; GERMER *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 1995) devido à existência de apenas uma substituição filogeneticamente informativa na região 5'UTR. As amostras 162p e 163p, identificadas como genótipo 1a, formaram um grupo monofilético com suporte estatístico significativo (91%), e independente dos seis genótipos principais não sendo possível, portanto, identificá-las através da análise filogenética. No entanto, a caracterização das mesmas como pertencentes ao genótipo 1a é consistente com os resultados obtidos no BLAST e com a maior distância apresentada em relação aos outros grupos genéticos. Deve-se destacar que foram precisamente estas duas seqüências as que apresentaram maior divergência em relação às de referência entre as amostras incluídas no grupo 1a (item 4.1). No Brasil, já tinham sido relatadas diferenças significativas na região 5'UTR em relação aos isolados de referência em amostras do genótipo 3 (OLIVEIRA *et al.*, 1999a).

Como já exposto em Material e Métodos, para representar o genótipo 4 na análise filogenética foi escolhido apenas o isolado de referência HCV4APOLY, pertencente ao subtipo 4a, por ser esse o único isolado com classificação confirmada neste grupo genético

(SIMMONDS, 2005). As duas amostras caracterizadas como genótipo 4 se agruparam, como esperado, junto à sequência de referência mencionada, confirmando a designação correta do genótipo para as mesmas.

Finalmente, considerando que as 34 seqüências selecionadas representavam o conjunto de 777 amostras incluídas neste trabalho, podemos concluir que a análise filogenética confirmou a genotipagem previamente obtida em 775 das 777 amostras analisadas. Este resultado confirma que a metodologia empregada para genotipagem de rotina descrita neste trabalho é adequada para distinguir, com precisão, os genótipos 1, 2, 3 e 4 do vírus HCV. A viabilidade da genotipagem por análise da região 5'UTR já havia sido comprovada por diversos autores (DAVIDSON F. *et al.*, 1995; GERMER *et al.*, 1999; HALFON *et al.*, 2001; HOLLAND *et al.*, 1998; O'BRIEN *et al.*, 1997; OKAMOTO *et al.*, 1990; ROSS *et al.*, 2000; SIMMONDS *et al.*, 1993b; SMITH *et al.*, 1995; STUYVER *et al.*, 1995).

Na análise complementar dos dois isolados obtidos do genótipo 4, realizada por comparação com diversas variantes publicadas deste grupo genético, não foi obtida completa similaridade com nenhuma das mesmas, sendo, no entanto, observada maior similaridade com a seqüência do subtipo 4t. Todavia, o genótipo 4 é originário de regiões de alta diversidade genômica, onde existe grande número de variantes deste grupo genético, muitas das quais não possuem seqüências da região 5'UTR publicadas (KUIKEN *et al.*, 2005). Seria necessário para confirmação da subtipagem destes dois isolados o seqüenciamento de outras regiões codificantes do genoma do HCV, tais como a NS5B ou capsídeo/E1 (SIMMONDS *et al.*, 2005), o que não constituiu objetivo desta pesquisa.

6 CONCLUSÃO

Este estudo contribuiu para confirmar o bom desempenho do método de genotipagem do HCV utilizado no laboratório do NUPAD – UFMG, que compõe os testes moleculares para diagnóstico da hepatite C realizados naquele laboratório.

Ainda, por meio desta investigação, foi possível caracterizar o perfil genotípico do HCV, assim como também ratificar a alta prevalência do genótipo 1, em pacientes portadores de hepatite C crônica na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Foi possível também confirmar, através da análise filogenética realizada, a identificação de duas amostras pertencentes ao genótipo 4. Através de análise complementar, estas duas amostras apresentaram maior similaridade com o subtipo 4t, mas a confirmação do subtipo requer o seqüenciamento de outras regiões do vírus.

O achado de seqüências atípicas, como as duas pertencentes ao genótipo 1a, e de mutações pouco freqüentes ou não relatadas anteriormente em diversas amostras analisadas, sugere a possível existência de variantes do HCV ainda não descritas no nosso meio e reforça a necessidade de pesquisar mais profundamente as características e a diversidade genômica do HCV no Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZOLA M., BURGOS J.J. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. **Exp. Rev. Mol. Med.** Vol. 5, 2003.

BARTENSCHLAGER R. AND LOHMANN V. Replication of hepatitis C virus. **J. Gen. Virol.** 81:1631-1648, 2000.

BASSIT L *et al.* Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: Rare subtype found. **Hepatology** 29(3):994-995, 1999.

BUKH J., PURCELL R.H., MILLER R.H. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89:4942-4946, 1992.

BUKH J., MILLER R.H., PURCELL R.H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin Liver Dis.** 15:41-63, 1995.

BUSEK S. *et al.* Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 97:775-778, 2002.

BUSEK S., OLIVEIRA G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genetics, Molecular Research** 2:117-123, 2003.

CAMPIOTTO S. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J. Med. Biol. Res.** 38(1):41-49, 2005.

CHAYAMA K. *et al.* Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. **J. Gen. Virol.** 75:3623-3628, 1994.

CHEN Z., WECK K.E. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. **J.Clin.Microbiol.** 40:3127-3134, 2002.

CHOO Q.L. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science** 244:359-362, 1989.

CHOO Q.L. *et al.* Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88:2451-2455, 1991.

DAVIDSON F. *et al.* Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. **J. Gen. Virol.** 76:1197-1204, 1995.

DOGLIO A. *et al.* Rapid genotyping of hepatitis C virus by direct cycle sequencing of PCR-amplified cDNAs and capillary electrophoresis analysis. **Res. Virol.** 149(4):219-227, 1998.

FANG J.W.S, CHOW V., LAU J.Y.N. Virology of Hepatitis C Virus. **Clinics in Liver Disease** 1:493-514, 1997.

FELSENSTEIN J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. **Evolution** 39(4):783-791, 1985.

FERNANDEZ SALAZAR L. I. *et al.* Iron overload and genotype 3 are associated with liver steatosis in chronic hepatitis C. **Rev. esp. enferm. dig.** 96(12):809-817, 2004.

FERRON F. *et al.* The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases. **BMC Bioinformatics** 6:255, 2005.

FONSECA J.C.F. *et al.* Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. **Gastroenterol. Endosc. Digest.** 18:3-9, 1999.

FORNS X., PURCELL R. H., BUKH J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. **Trends in Microbiol.** 7:402-10, 1999.

GERMER J. *et al.* Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. **J. Clin. Virol.** 37(8):2625-2630, 1999.

HALFON P. *et al.* Hepatitis C Virus Genotyping Based on 5' Noncoding Sequence Analysis (Trugene). **J. Clin. Microbiol.** 39:1771-1773, 2001.

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

HNATYSZYN H.J. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. **Antivir. Ther.** 10:1-11, 2005.

HOLLAND J. *et al.* Hepatitis C genotyping by direct sequencing of the product from the Roche AMPLICOR test: methodology and application to a South Australian population. **Pathology** 30:192-195, 1998.

KUMAR S., TAMURA K., NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics** 5:150-163. 2004.

KUIKEN C. *et al.* The Los Alamos HCV Sequence Database. **Bioinformatics** 21(3):379-84, 2005.

KUIKEN C. *et al.* A Comprehensive System for Consistent Numbering of HCV Sequences, Proteins, Epitopes. **Hepatology** 44(5):1355-1361, 2006.

KRUG L.P. *et al.* Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29(12):1629-32, 1996.

LEVI J.E. *et al.* Three Cases of Infection with Hepatitis C Virus Genotype 5 among Brazilian Hepatitis Patients. **J. Clin. Microbiol.** 40(7):2645-2647, 2002.

MARTINS R.M.B. *et al.* Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 48(1):53-55, 2006.

MCOMISH F. *et al.* Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **Journal of Clinical Microbiology** 322:884-892, 1994.

MELLOR J. *et al.* Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. **J. Gen. Virol.** 76: 2493-2507, 1995.

MURPHY P.A. *et al.* Classification and Nomenclature of Viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 424-426, **Springer, Vienna**, 1995.

NAINAN O.V. *et al.* Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. **Gastroenterology** 131(2):478-484, 2006.

NGUYEN M.H., KEEFE E.B. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.** 3(Suppl 2):97-101, 2005.

O'BRIEN C.B. *et al.* cDNA sequencing of the 5' noncoding region (5' NCR) to determine hepatitis C genotypes in patients with chronic hepatitis C. **Dig. Dis. Sci.** 42:1087-1093, 1997.

OHNO T. *et al.* New Hepatitis C Virus (HCV) Genotyping System That Allows for Identification of HCV Genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4, 5a, 6a. **J. Clin. Microbiol.** 35(1):201-207, 1997.

OKAMOTO H. *et al.* The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. **Jpn. J. Exp. Med.** 60:167-177, 1990.

OKAMOTO H. *et al.* The entire nucleotide sequence and classification of a hepatitis C virus isolate of a novel genotype from an Indonesian patient with chronic liver disease. **J. Gen. Virol.** 75:629-635, 1994.

OLIVEIRA G.C. *et al.* Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the State of Minas Gerais, Brazil. **Transfusion** 39:1194-1199, 1999.

OLIVEIRA M.L.A. *et al.* Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 32:279-282, 1999.

PARANÁ R. *et al.* HCV Infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. **Arq. Gastroenterol.** 37(4): 213-216, 2000.

ROSS R.S. *et al.* Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. **J. Clin. Microbiol.** 38(10):3581-3584, 2000.

SAITOU N., NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4:406-425, 1987.

SAMOKHVALOV E.I. *et al.* Full-genome Nucleotide Sequence of a Hepatitis C Virus Variant (Isolate Name VAT96) Representing a New Subtype within the Genotype 2 (Arbitrarily 2k). **Virus Genes** 20(2):183-187, 2000.

SANDRES-SAUNÉ K. *et al.* Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. **J. Virol. Met.**, 109:187-193, 2003.

SCOTT J.D. & GRETCH D.R. Molecular diagnosis of hepatitis C vírus. **JAMA**, 297: 724-732, 2007.

SEEF L.B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology** 36(5):35-46, 2002.

SHEPARD C.W., FINELLI L., ALTER M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect. Dis.** 5:558-567, 2005.

SHI S.T., LAI M.M.C. Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. **Cell. Mol. Life Sci.** 58:1276–1295, 2001.

SILVA L.K. *et al.* Hepatitis C Vírus Genotypes in a Northeastern area of Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 62(2):257-260, 2000.

SIMMONDS P. *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J. Gen. Virol.** 74:2391-2399, 1993 (a).

SIMMONDS P. *et al.* Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **J. Gen. Virol.** 74:661-668, 1993 (b).

SIMMONDS P. Variability of hepatitis C virus. **Hepatology** 21: 570-583, 1995.

SIMMONDS P. *et al.* Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology** 42(4):962-973, 2005.

TOKITA H. *et al.* Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e an 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. **J. Gen. Virol.** 77:293-301, 1996.

SMITH D.B. *et al.* Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. **J. Gen. Virol.** 76:1749-1761, 1995.

SOUZA K.P. *et al.* Hepatitis B and C in the Hemodialysis Unit of Tocantins, Brazil: Serological and Molecular Profiles. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 98(5):599-603, 2003.

STRAUSS E. Hepatite C. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 34:69-82, 2001.

STUYVER L. *et al.* Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. **Virus Res.** 38:137-157, 1995.

THOMPSON J.D. *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25:4876-4882, 1997.

VOGLER I. H., *et al.* Serological, epidemiological and molecular aspects of hepatitis C virus infection in a population from Londrina, PR, Brazil, 2001-2002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 46(6):303-308, 2004.

WHO. Hepatitis C – Global prevalence. **Weekly Epidemiological Records** 74(49):421-428, 1999.

WHO. Hepatitis C – Global prevalence. **Weekly Epidemiological Records** 75(3):17-28, 2000.

ZEIN N.N. *et al.* Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. **Annals of Internal Medicine**, 125:634-639, 1996.

ZEIN N.N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes, **Clin. Microb. Rev.** 13(2):223-235, 2000.

ANEXO I

PROTOCOLO DO TESTE QUALITATIVO

EXTRAÇÃO DE RNA (protocolo de uso do kit Amplicor[®] HCV preparation)

- Pipetar em tubo tipo eppendorf 400 µL de mistura de lise *
- Adicionar 200 µL de plasma (amostra)
- Vortex por 15 seg
- Incubar a 60°C por 10 min
- Vortex
- Adicionar 600 µL de Isopropanol 100%
- Incubar em temperatura ambiente por 2 min
- Centrifugar por 15 min a 14.000 rpm
- Remover todo o sobrenadante
- Adicionar 1 mL de Etanol a 70%
- Vortex por 15 seg
- Centrifugar por 5 min a 14000 rpm
- Remover todo sobrenadante
- Adicionar 200 µL do diluente
- Vortex por 15 seg
- Armazenar a -70°C até o uso

*mistura de lise: 6,9 mL de reagente de lise + 0,1 mL de controle interno

RT-PCR (protocolo para uso do kit Amplicor[®] HCV amplification)

- Aliquotar 50 µL do mix de trabalho*
- Adicionar 50 µL da amostra
- Programa :
- 1-50°C por 5 min
- 2-62°C por 30 min
- 3-90°C por 10 seg
- 4-58°C por 25 seg
- 5-Retornar ao passo 3, 37 vezes.
- 6-91°C por 2 horas
- No final do passo 6 Adicionar 100 µL do desnaturante do kit ao produto da PCR
- Incubar 10 min em temp. ambiente
- Volume final será de 200 µL

*Mix de trabalho (0,7 mL de Master mix + 0,1 mL de Mn²⁺)

Observação: do produto de RT-PCR obtido (200 µl), 50 µl são utilizados para o procedimento de detecção a seguir, sendo o volume restante utilizado para purificação e posterior reação de sequenciamento, como descrito nos anexos 2 e 3.

DETECÇÃO (protocolo para uso do kit Amplicor[®] HCV detection)

- Adicionar 100 µL de solução Hybridizante para cada poço
- Adicionar 25 µL de produto de PCR no poço correspondente
- Adicionar 25 µL de produto da PCR no poço correspondente ao Controle Interno
- Incubar a 37 °c por 1 hora
- Lavar os poços 5 x com 300 µL da solução de lavagem do kit
- Secar a placa
- Adicionar 100 µL de Conjugado em cada poço
- Incubar a 37 °c por 15 min
- Lavar os poços 5 vezes com 300 µL da solução de lavagem do kit
- Secar a placa
- Colocar 100 µL de Substrato em cada poço
- Incubar por 10 min protegido da luz
- Adicionar 100 µL da solução Stop
- Determinar Densidade ótica em 450 nm

ANEXO II

PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE RT-PCR

PURIFICAÇÃO (protocolo de uso do kit Wizard SV[®] - Promega Corp.)

- Adicionar aos 150 µl de produto da RT-PCR (ver página 3) 4 µL de Tris HCl pH 7,5 para neutralização
- Incubar 5 min
- Adicionar o mesmo volume de Membrane Binding solution
- Montar as micro-colunas
- Pipetar todo o volume total no centro da coluna
- Incubar por 1 min em T.A.
- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm
- Adicionar 700 µL de Membrane Wash Solution
- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm
- Descartar a solução do tubo coletor
- Adicionar 500µL de Membrane Wash Solution
- Centrifugar por 5 min a 14.000 rpm
- Montar a coluna em outro tubo coletor previamente identificado
- Adicionar 50 µL de água bidestilada
- Incubar por 1 min em T.A.
- Centrifugar por 1 min a 14.000 rpm
- Desprezar a coluna e reservar o tubo com a amostra eluída
- Armazenar a -20°C

QUANTIFICAÇÃO

- Misturar 5 μ L da amostra purificada + 5 μ L de corante não desnaturante
- Aplicar 8 μ L da mistura em gel de agarose a 2%, juntamente com um padrão de massa (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corp.)
- Após a eletroforese, corar com brometo de etídio
- Calcular a quantidade de DNA em cada banda por comparação com as bandas do padrão

ANEXO III

PROTOCOLO DE SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE RT-PCR

REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

- Pipetar o volume necessário para incorporar 3 a 10 ng de produto de PCR na reação
- Adicionar 2 μ L da solução *Ready Reaction Mix* (BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, Applied Biosystems)
- Adicionar 6 μ L do buffer (kit)
- Adicionar 4 pmol do iniciador de seqüenciamento PI-4
- Ajustar o volume final da reação para 20 μ L, com água bidestilada
- Manter protegido da luz
- Programa de seqüenciamento cíclico (termociclador GeneAmp[®] PCR System 9700,

Applied Biosystems):

96° C por 10 segundos	}	25 X
50° C por 5 segundos		
60° C por 4 minutos		
4° C (manter até purificação)		

PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE SEQUENCIAMENTO

- Adicionar 80 μ L de Isopropanol 70% aos 20 μ L do produto de seqüenciamento
- Vortex por 15 seg
- Incubar por 20 min em T.A.
- Centrifugar por 25 min a 13.000 rpm
- Remover todo o sobrenadante
- Adicionar 250 μ L de etanol 70%
- Vortex por 2 min
- Centrifugar por 5 min a 13.000 rpm
- Remover completamente o sobrenadante
- Repetir a purificação com etanol mais uma vez
- Deixar secar as amostras para eliminar os restos de etanol
- Adicionar 12 μ L de formamida deionizada
- Vortex por 2 min
- Desnaturar a 95°C e colocar em gelo imediatamente
- Aplicar 11 μ L de amostra em micro-placa para eletroforese capilar

ANEXO IV

ARTIGO PUBLICADO

**Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em
Belo Horizonte, Minas Gerais**

*High prevalence of genotype 1 in hepatitis C carriers in Belo Horizonte, Minas
Gerais*

**Carlos Perone¹, Dora Mendez del Castillo¹, Gilsimary Lessa Pereira¹, Nara de Oliveira
Carvalho¹, José Nélio Januário^{1,2} e Rosângela Teixeira^{2,3}**

1. Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

2. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

3. Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Endereço para correspondência: Dr. Carlos Perone. Rua Xavier de Gouvêia 88, 30430-710 Belo Horizonte, MG.

e-mail: carlos@nupad.ufmg.br

RESUMO

O vírus da hepatite C é caracterizado pela significativa heterogeneidade genética e é atualmente classificado em seis genótipos principais e diversos subtipos. A determinação do genótipo do vírus tem importância na prática clínica para orientar o tratamento dos pacientes portadores de hepatite C crônica. A prevalência dos diferentes genótipos e subtipos do vírus da hepatite C não tem sido amplamente estudada em algumas regiões do Brasil. Neste estudo foram analisadas 788 amostras de pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais de Belo Horizonte, entre 2002 e 2006. A genotipagem do vírus foi realizada por seqüenciamento direto da região 5' UTR. Adicionalmente, foi realizada análise filogenética incluindo todas as variantes genotípicas obtidas. Observou-se alta prevalência do genótipo 1 (78,4%; 1b [40,4%], 1a [37,5%] e 1a/b [0,5 %]), seguida pelo genótipo 3a (17,9%) e pelo 2b (3,1%). Foram identificadas três amostras (0,4%) com o genótipo 2a/c e duas amostras (0,2%) com o genótipo 4. A análise filogenética mostrou a segregação esperada das seqüências obtidas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4, exceto em duas amostras do genótipo 1a. A alta prevalência do genótipo 1 (78,4%), encontrada na população de Belo Horizonte é semelhante à previamente descrita em outras cidades, como Rio de Janeiro, mas superior à encontrada em São Paulo e no Sul do país. A presença de raras seqüências atípicas da região 5'UTR sugere a presença de variantes do HCV nesta população.

Palavras-chaves: *Vírus da hepatite C/genética. Genótipo. Genoma viral. Filogenia.*

ABSTRACT

Hepatitis C virus is characterized by a high genetic heterogeneity. To date, six different genotypes and several subtypes have been identified. Viral genotype test is essential in clinical practice in view of the guidelines of treatment in hepatitis C carriers. Nevertheless, the prevalence of distinct viral genotypes has not been totally studied in Brazil. Analysis was carried out from 2002 to 2006 in 788 specimens from patients with chronic hepatitis C attended at the Viral Hepatitis Reference Centers in Belo Horizonte. The hepatitis C genotype test was performed by direct sequencing of the 5' UTR region. Additionally, phylogenetic analysis was performed including all genotypic variants obtained. High prevalence of genotype 1 (78.4%; 1b [40.4%], 1a [37.5%] and 1a/b [0.5%]) was observed, followed by genotypes 3a (17.9%) and 2b (3.1%). Four samples were identified as genotype 2a/c (0.4%) and two as genotype 4 (0.2%). Phylogenetic analysis confirmed an expected segregation of selected sequences with reference sequences for genotypes 1, 2, 3 and 4, except for two samples of genotype 1a. The high prevalence of genotype 1 (78.4%) in Belo Horizonte is similar to previous reports in other cities such as Rio de Janeiro, but it is higher than that described in São Paulo and in the South. Atypical 5'UTR strains founded suggest the existence of HCV variants in this population.

Key-words: *Hepatitis C virus/genetic. Genotype. Viral genome. Phylogeny.*

O vírus da hepatite C (HCV), um membro da família *Flaviviridae* clonado por Choo e colaboradores em 1989⁸, é constituído por uma fita simples de RNA e caracteriza-se pela alta frequência de mutações e heterogeneidade genômica^{3 38}. Algumas regiões do genoma, como E1 e E2, são altamente variáveis, enquanto outras, como a região 5' não traduzida (5'UTR) são mais estáveis^{30 41 42}. Tem-se descrito variações de até 51% na sequência de aminoácidos da proteína E1 em diferentes isolados do HCV³. Estas variações na sequência genômica ou de fragmentos genômicos permitiram classificar o vírus C em seis grandes grupos ou genótipos⁴⁰. As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da sequência de nucleotídeos entre 75% e 80%) são denominadas subtipos e são indicadas por letras^{38 39}. Estes, por sua vez, apresentam um complexo de variantes genéticas com heterogeneidade na sequência de nucleotídeos que varia de 1% a 9,2%. É possível que estas variantes, conhecidas como *quasispecies*, sejam resultantes de mutações acumuladas durante a replicação viral no curso da infecção crônica^{3 12}.

A genotipagem do HCV constitui ferramenta essencial na prática clínica em razão de sua importância nas decisões terapêuticas. Os estudos clínicos têm demonstrado respostas virológicas variáveis ao tratamento da hepatite C crônica com interferon peguillado mais ribavirina com base na infecção por distintos genótipos. Assim, pacientes infectados pelo genótipo 1 apresentam respostas virológicas próximas de 50%, enquanto os infectados pelos genótipos 2 ou 3 têm mais chances de erradicar a infecção, da ordem de 80%^{13 15 17 23 36}. A investigação do genótipo do HCV tem, ainda, importância em investigações imunológicas que visam o desenvolvimento de vacinas.

Diversos pesquisadores têm relatado ampla variação geográfica mundial na distribuição dos genótipos. Assim, os genótipos 1, 2 e 3 são mais prevalentes na Europa, Japão e Estados Unidos, o genótipo 4 na África central, Egito e Oriente Médio, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 na Ásia^{25 26 27 28}. No Brasil, tem-se observado maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3^{5 6 32}, a despeito da considerável variação na distribuição de genótipos e da insuficiência de informações em algumas regiões brasileiras^{1 21 24 33 37}. Genótipos incomuns, como o 4 e o 5, também foram relatados esporadicamente no Brasil²². Em Minas Gerais, maior prevalência do genótipo 1 foi observada em portadores de hemofilia (84,1%)³¹, quando comparados aos portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise (66,3%)⁴.

O método de referência para a classificação genotípica do HCV é o sequenciamento direto de uma região do genoma do vírus, seguido da análise filogenética da sequência obtida^{39 45}. As metodologias mais utilizadas para a identificação do genótipo para fins de diagnóstico baseiam-se na análise de um fragmento amplificado do genoma viral, geralmente da região não codificante 5' (5'UTR)^{14 16 18}. Esta região, a despeito de

seu alto grau de conservação, apresenta diversos polimorfismos característicos de cada grupo genético do HCV²

29 41 44

MATERIAL E MÉTODOS

Entre 2002 a 2006, 788 portadores de hepatite C crônica, atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais do Município de Belo Horizonte foram referenciados ao NUPAD (Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, para caracterização molecular do vírus C com finalidade terapêutica. As amostras foram coletadas em tubos estéreis contendo EDTA. Os plasmas foram imediatamente separados e reservados em alíquotas de 100 microlitros congeladas a – 70 °C até a utilização. Em todas as amostras foi confirmada a presença do RNA do HCV através de reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems), conforme especificações do fabricante.

Seqüenciamento Direto. Do volume total de produto da PCR obtido no teste qualitativo, 150 microlitros foram purificados utilizando-se o sistema Wizard SV[®] (Promega Corp.) e, posteriormente, ressuspensos em 50 microlitros de água deionizada livre de nucleases.

Em seguida, foram aplicados 4 microlitros do produto purificado em gel de agarose a 2% juntamente com padrão de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen Corp.) Após eletroforese, os géis foram revelados com brometo de etídio (Figura 1). As densidades ópticas das bandas produzidas pelas amostras foram comparadas à do padrão de massa com a finalidade de quantificar o DNA purificado obtido e calcular a quantidade de amostra a ser adicionada na reação de seqüenciamento.

As reações de seqüenciamento cíclico foram efetuadas com o sistema BigDye Terminator[®] (Applied Biosystems), utilizando-se na reação 4 picomoles do primer 5' AGT ACC ACA AGG CCT TTC 3'¹⁴ e a quantidade de DNA necessária de acordo com a quantificação descrita. Em seguida, as amostras foram processadas no seqüenciador ABI 3100-Avant[®] (Applied Biosystems).

Genotipagem. A identificação dos genótipos foi realizada através da análise comparativa da seqüência obtida de 172 nucleotídeos (nt: 92 a 263) com seqüências de referência dos genótipos do HCV (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 5a e 6a). Em seguida, efetuaram-se análises complementares das seqüências obtidas através do BLAST (*Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI)* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Análise filogenética. Após o agrupamento das seqüências obtidas em seis grupos (1a, 1b, 2a/c, 2b, 3a e 4), foram selecionadas 34 espécies representativas das diversas variantes presentes em cada grupo. Incluíram-se, nesta seleção, todas as seqüências que apresentaram substituições em relação às de referência nos grupos 1a, 1b, 2b e 3a, e todas as seqüências dos genótipos 2a/c e 4. Estas seqüências, juntamente com as seqüências de referência obtidas do GenBank, foram submetidas a alinhamento múltiplo. Em seguida, procedeu-se à análise filogenética por matriz de distâncias com correção de Jukes-Cantor¹⁹. A árvore filogenética foi obtida pelo método de Neighbor Joining. O método de *bootstrap*¹¹ foi utilizado para testar a significância estatística para cada ramo da árvore gerada. Os valores de *bootstrap* foram obtidos por re-amostragem dos dados com 500 replicatas. Valores de *bootstrap* menores que 50% não foram mostrados na árvore. A análise filogenética das seqüências foi executada utilizando-se o programa MEGA versão 3.1²⁰.

Empregaram-se as seguintes seqüências de referência para a identificação genotípica e a análise filogenética: 1a: M62321 e M67463, 1b: D90208 e M58335, 2a: D00944 e AB047639, 2b: D10988 e AB030907, 2c: D50409, 3a: D17763 e D28917, 4a: Y11604, 5a: Y13184 e 6a: Y12083. As seqüências dos genótipos 5a e 6a foram incluídas com a finalidade de investigar a sua ocorrência na população brasileira.

RESULTADOS

De 788 amostras examinadas, 777 (98,6%) foram seqüenciadas e tiveram os genótipos determinados. Onze (1,4%) amostras apresentaram quantidade de RNA viral insuficiente para a obtenção de seqüências para análise. Os seguintes genótipos foram identificados: genótipo 1 em 609/777 (78,4%) amostras, sendo 291 (37,5%) do subtipo 1a e 314 (40,4%) do subtipo 1b, genótipo 3a em 139/777 (17,9%) amostras, 2b em 24/777 (3,1%) amostras, 4 em 2/777 (0,2%) amostras e genótipo 2 com indefinição do subtipo a ou c em 3/777 (0,4%) amostras. Quatro (0,5%) amostras classificadas como genótipo 1 apresentaram subtipagem indefinida em razão de superposição de picos (G/A) na posição 243 (Tabela 1).

A análise filogenética mostrou o agrupamento esperado das seqüências selecionadas junto às seqüências de referência para os genótipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os valores de *bootstrap* mostraram significância estatística para os nós principais correspondentes a estes genótipos na árvore obtida (>50% das replicatas produzidas no *bootstrap*).

As seqüências 162p e 163p, identificadas inicialmente como subtipo 1a, segregaram de forma independente no filograma, sendo estatisticamente significativa a ramificação obtida (valor de *bootstrap* de

91%). Coincidentemente, foram as duas espécies que apresentaram maior número de substituições dentro do grupo de 291 seqüências do genótipo 1a. As duas seqüências correspondentes ao genótipo 4 se agruparam conforme esperado junto ao genótipo 4a (Figura 2).

DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho demonstraram alta prevalência da infecção pelo genótipo 1 nos pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos nos Centros de Referência em Hepatites Virais no Município de Belo Horizonte. Assim, o genótipo 1 foi identificado em 78,4% das amostras dos pacientes incluídos nesta casuística.

Em investigações prévias conduzidas no Brasil, os autores demonstraram que a prevalência do genótipo 1 nas amostras testadas variou de 52,6% no Estado do Paraná⁶ a 85% em Tocantins⁴³. Na região Sudeste, alta prevalência do genótipo 1 foi relatada no Rio de Janeiro (79,1%), embora prevalência menor (62,5%) tenha sido descrita em São Paulo⁶. Em Belo Horizonte, estudos realizados em grupos específicos de portadores de infecção crônica pelo HCV reportaram prevalência do genótipo 1 com variações de 84,1% em hemofílicos³¹ a 66,3% em portadores de insuficiência renal crônica em tratamento hemodialítico⁴.

Observou-se, ainda, nesta investigação, tendência ao predomínio do subtipo 1b (40,4%) comparado ao subtipo 1a (37,5%). Não obstante, este resultado deve ser analisado com cautela uma vez que a diferenciação do subtipo 1a do 1b na região 5' UTR baseia-se em um único polimorfismo (G>A) na posição 243. Este fato contribui, de acordo com alguns autores, para caracterizar erroneamente amostras do subtipo 1a como 1b^{7 35 42}. Para verificar a ocorrência de equívoco na subtipagem para o genótipo 1 e comprovar a proporção em que este ocorre na nossa população, seria recomendado a análise de amostras de ambos os subtipos por seqüenciamento de outra região sub-genômica do vírus, o que não constituiu objetivo desta investigação.

Em amostras classificadas como genótipo 1, foram observadas quatro seqüências que apresentavam superposição A/G na posição 243 e, por esta razão, foram caracterizadas como 1a/b. É possível que a superposição observada nesta posição seja devida a co-infecção por ambos subtipos. Outra possibilidade é a presença de diferentes *quasispécies* originadas a partir do mesmo subtipo infectante^{7 12}.

O genótipo 4, muito freqüente em alguns países da África e no Oriente Médio^{25 28} foi identificado em duas amostras. Esta baixa prevalência da infecção pelo genótipo 4 também tem sido reportada em outros países das Américas e da Europa^{26 27}. De forma semelhante, não foram identificados os genótipos 5 e 6. De fato, a

despeito da alta prevalência descrita dos genótipos 5 na África do Sul e 6 no Sudeste Asiático, ambos são genótipos raros e pouco descritos, tanto nas Américas como no Brasil^{5 6} e na Europa²⁸.

O resultado da análise filogenética das 34 variantes selecionadas mostrou agrupamentos bem definidos e com significância estatística para todos os genótipos. A falta de suporte estatístico para os agrupamentos dos subtipos dentro do genótipo 1 era esperada^{7 14 42} em função da existência de apenas uma substituição filogeneticamente informativa na região 5'UTR. As amostras 162p e 163p constituíram um grupo monofilético distinto dos seis genótipos principais; no entanto, a caracterização destas duas amostras como genótipo 1a foi concordante com os resultados obtidos no BLAST e com a maior distância apresentada em relação aos outros grupos genéticos. No Brasil, Oliveira e cols. também reportaram diferenças significativas na região 5'UTR em relação aos isolados de referência em amostras do genótipo 3³¹. Finalmente, as duas amostras caracterizadas como genótipo 4 se agruparam, como esperado, junto à seqüência de referência utilizada, confirmando a designação correta do genótipo para as mesmas.

Considerando que as 34 seqüências selecionadas foram representativas de todas as amostras analisadas, pode-se inferir que a análise filogenética confirmou o resultado da genotipagem em 775/777 (99,7%) amostras. Este resultado confirma que a metodologia empregada foi adequada para distinguir, com acurácia, os genótipos 1, 2, 3 e 4 do vírus C. Assim, este estudo corrobora relatos prévios de diversos autores que qualificam a região viral 5'UTR como confiável para a genotipagem do HCV^{9 10 14 29 34 44}.

Em síntese, este estudo contribuiu para o maior conhecimento da distribuição da freqüência dos genótipos do HCV no nosso meio e reitera a confiabilidade e o bom desempenho da análise da região 5'UTR para a genotipagem do HCV. A ocorrência de seqüências atípicas em duas amostras caracterizadas como genótipo 1a sugere a presença de variantes do HCV ainda não descritas no nosso meio. Mais investigações são necessárias para ampliar o conhecimento a respeito da diversidade genômica do HCV no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Bassit L, Ribeiro dos Santos G, Da Silva LC, Takei K, Villaça P, David Neto E, Chamone D, Saez Alquezar A. Genotype distribution of hepatitis C virus in São Paulo, Brazil: Rare subtype found. *Hepatology* 29:994-995, 1999.
2. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 89:4942-4946, 1992.
3. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in liver disease* 15:41-63, 1995.
4. Busek SU, Babá EH, Tavares Filho HA, Pimenta L, Salomão A, Corrêa-Oliveira R, Oliveira GC. Hepatitis C and hepatitis B virus infection in different hemodialysis units in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:775-778, 2002.
5. Busek S, Oliveira G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2:117-123, 2003.
6. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38:41-49, 2005.
7. Chen Z, Weck KE. Hepatitis C Virus Genotyping: Interrogation of the 5' Untranslated Region Cannot Accurately Distinguish Genotypes 1a and 1b. *Journal of Clinical Microbiology* 40:3127-3134, 2002.
8. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362, 1989.
9. Davidson F, Simmonds P, Ferguson JC, Jarvis LM, Dow BC, Follett EA, Seed CR, Krusius T, Lin C, Medgyesi GA. Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. *Journal of General Virology* 76:1197-1204, 1995.
10. Doglio A, Laffon C, Thyss S, Lefebvre JC. Rapid genotyping of hepatitis C virus by direct cycle sequencing of PCR-amplified cDNAs and capillary electrophoresis analysis. *Research in Virology* 149:219-227, 1998.
11. Felsenstein J. Confidence Limits on Phylogenies: an Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 39:783-791, 1985.
12. Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends in Microbiology*. 7:402-410, 1999.
13. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves Jr FL, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *New England Journal of Medicine* 347:975-982, 2002.
14. Germer JJ, Rys PN, Thorvilson JN, Persing DH. Determination of Hepatitis C Virus Genotype by Direct Sequence Analysis of Products Generated with the Amplicor HCV Test. *Journal of Clinical Microbiology* 37:2625-2630, 1999.
15. Hadziyannis SJ, Sette Jr H, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM, PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine* 140:346-355, 2004.

16. Halfon P, Trimoulet P, Bourliere M, Khiri H, de Lédighen V, Couzigou P, Feryn JM, Alcaraz P, Renou C, Fleury HJ, Ouzan D. Hepatitis C Virus Genotyping Based on 5' Noncoding Sequence Analysis (Trugene). *Journal of Clinical Microbiology* 39:1771-1773, 2001.
17. Hnatyszyn HJ. Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes. *Antiviral Therapy* 10:1-11, 2005.
18. Holland J, Bastian I, Ratcliff RM, Beers MY, Haesy P, Harley H, Shaw DR, Higgins GD. Hepatitis C genotyping by direct sequencing of the product from the Roche Amplicor test: Methodology and application to a South Australian population. *Pathology* 30:192-195, 1998.
19. Jukes TH, Cantor CR. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) *Mammalian protein metabolism*, Academic Press, New York, p.21-123, 1969.
20. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163. 2004.
21. Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca AS, Cheinquer H, Ozaki LS, Barros SG. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29:1629-1632, 1996.
22. Levi JE, Takaoka DT, Garrini RH, Fachini RM, Focaccia R, de Bortholi Santos E, Mitre HP, de Mendonça JS, de Paula Cavalheiro N, Barone AA, Wendel S. Three Cases of Infection with Hepatitis C Virus Genotype 5 among Brazilian Hepatitis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 40:2645-2647, 2002.
23. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358:958-965, 2001.
24. Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto FJD, Mussi A, Amorim RMS, Martins CRF. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48:53-55, 2006.
25. McOmish F, Yap PL, Dow BC, Follett EAC, Seed C, Keller AJ, Cobain TJ, Krusius T, Kolho E, Naukkarinen R, Lin C, Lai C, Leong S, Medgyesi GA, Héjjas M, Kiyokawa H, Fukada K, Cuyper T, Saeed AA, Al-Rasheed AM, Lin M, Simmonds P. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology* 32:884-892, 1994.
26. Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, Yap PL, Simmonds P, International HCV Collaborative Study Group. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology* 76: 2493-2507, 1995.
27. Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, Gao FX, Xia G, McQuillan G, Margolis HS. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology* 131:478-484, 2006.
28. Nguyen MH, Keefe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3:97-101, 2005.
29. O'Brien CB, Henzel BS, Wolfe L, Gutekunst K, Moonka D. cDNA sequencing of the 5' noncoding region (5'NCR) to determine hepatitis C genotypes in patients with chronic hepatitis C. *Digestive Diseases and Sciences* 42:1087-1093, 1997.
30. Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Yotsumoto S, Tanaka T, Yoshizawa H, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Japanese Journal of Experimental Medicine* 60:167-177, 1990.

31. Oliveira GC, Carmo RA, Rocha MO, Silva MO, Lima AT, Guimarães MD, Correa-Oliveira R. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the State of Minas Gerais, Brazil. *Transfusion* 39:1194-1199, 1999.
32. Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, Patzold U, Schreier E, Pauli G, Yoshida CFT. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:279-282, 1999.
33. Paraná R, Vitvitski L, Berby F, Portugal M, Cotrim HP, Cavalcante A, Lyra L, Trepo C. HCV Infection in Northeastern Brazil: unexpected high prevalence of genotype 3a and absence of African genotypes. *Arquivos de Gastroenterologia* 37: 213-216, 2000.
34. Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, Beyou A, Monnet A, Mazure C, Roggendorf M. Genotyping of hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* 38:3581-3584, 2000.
35. Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, Thibaut V, Duverlie G, Izopet J. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *Journal of Virological Methods* 109:187-193, 2003.
36. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnosis of hepatitis C virus. *Journal of the American Medical Association* 297:724-732, 2007.
37. Silva LK, Paraná R, Souza SP, Berby F, Kay A, Trepó C, Santana N, Cotrim H, Lyra LG, Reis MG. Hepatitis C Virus Genotypes in a Northeastern area of Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62:257-260, 2000.
38. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 21: 570-583, 1995.
39. Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. *Hepatology* 42:962-973, 2005.
40. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. 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, 1993.
41. Simmonds P, McOmish F, Yap PL, Chan SW, Lin CK, Dusheiko G, Saeed AA, Holmes EC. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. *Journal of General Virology* 74:661-668, 1993.
42. Smith DB, Mellor J, Jarvis LM, Davidson F, Kolberg J, Urdea M, Yap PL, Simmonds P. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *Journal of General Virology* 76:1749-1761, 1995.
43. Souza KP, Luz JA, Teles SA, Carneiro MA, Oliveira LA, Gomes AS, Dias MA, Gomes SA, Yoshida CF, Martins RM. Hepatitis B and C in the Hemodialysis Unit of Tocantins, Brazil: Serological and Molecular Profiles. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98:599-603, 2003.
44. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Lunel F, Laurent-Puig P, Pawlotsky JM, Kleter B, Bassit L, Nkengasong J, van Doorn LJ, Maertens G. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Research* 38:137-157, 1995.
45. Zein NN. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews* 13:223-235, 2000.

Figura 1 - Eletroforese dos produtos de RT-PCR em gel de agarose a 2%.

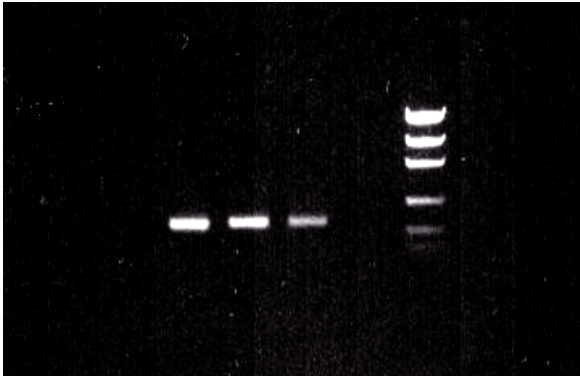
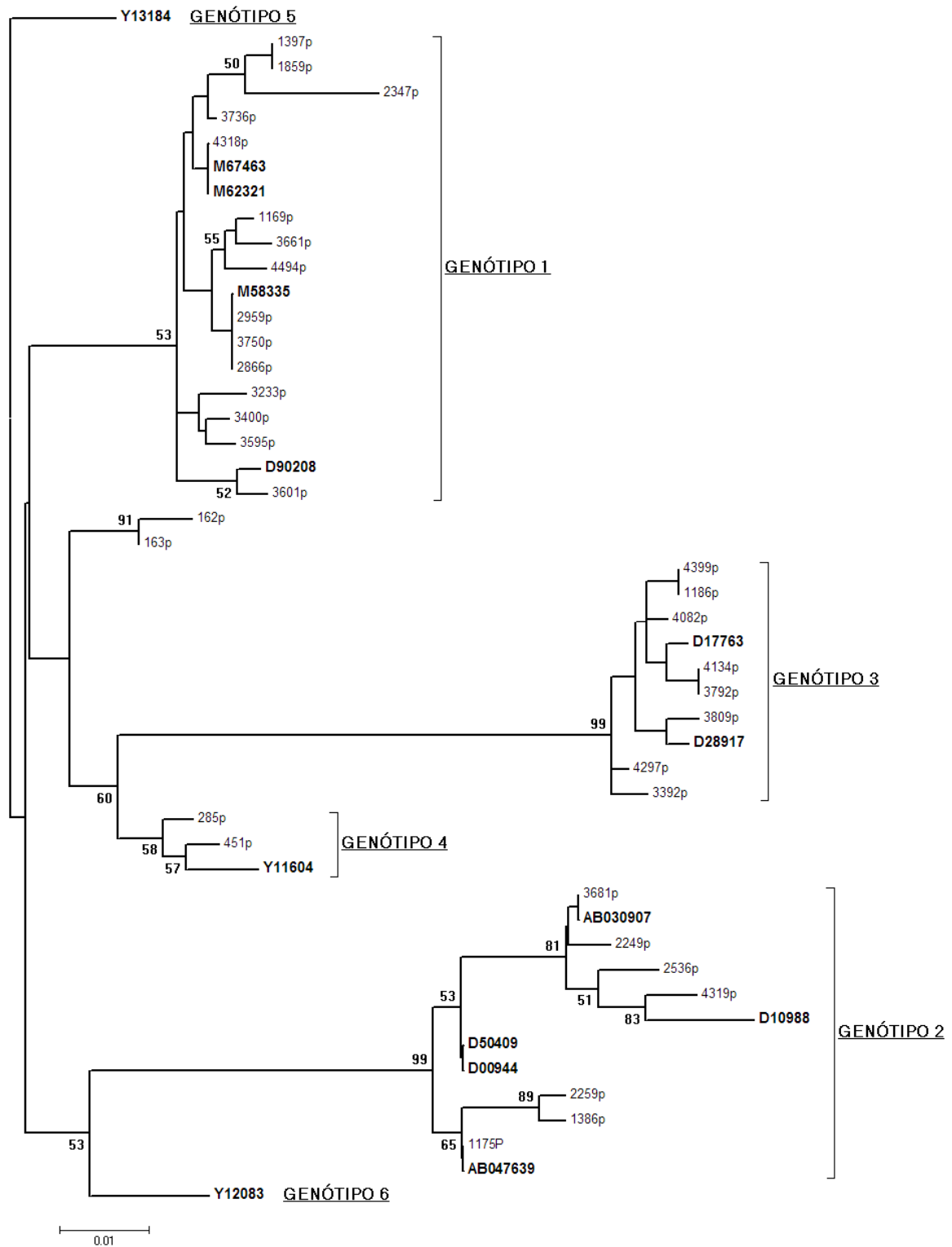


Tabela 1 - Distribuição genotípica do vírus da hepatite C em 788 amostras analisadas no Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico, Universidade Federal de Minas Gerais, no período de 2002 a 2006.

Genótipo do VHC	Número de Amostras (n°)	Frequência (%)
1a	291	37,5
1b	314	40,4
1a/b	4	0,5
2a/c	3	0,4
2b	24	3,1
3a	139	17,9
4	2	0,2
Total	777	100,0
N/A	11	1,4
Total de amostras*	788	

VHC - vírus da hepatite C, * cada amostra é representativa de um paciente portador de hepatite C crônica.

Figura 2 - Filograma com base em matriz de distâncias e algoritmo neighbor joining com re-amostragem tipo bootstrap (500 replicatas) do segmento de 172 nucleotídeos estudado (posições 92 a 263) da região 5'UTR.



Os valores de bootstrap superiores a 50% são mostrados próximos aos nodos. As seqüências de referência utilizadas aparecem em negrito. As restantes são seqüências selecionadas representativas de todas as variantes obtidas dentro de cada genótipo.