João Paulo Moreira

**Caracterização das mutações da região core do
vírus da hepatite C associadas ao carcinoma
hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2015**

João Paulo Moreira

**Caracterização das mutações da região core do
vírus da hepatite C associadas ao carcinoma
hepatocelular**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Mestre em Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreira, João Paulo

Caracterização das mutações da região core do vírus da hepatite C associadas ao carcinoma hepatocelular / João Paulo Moreira. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Gastroenterologia.

Orientador: Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Hepatite C 2.Hepatite crônica 3.Carcinoma hepatocelular 4.Hepacivirus 5.Mutação 6.Fibrose

USP/FM/DBD-456/15

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais amados que nunca pouparam esforços para me ver feliz e para que eu pudesse realizar os meus sonhos. Dedico também ao Nilton que foi a pessoa que me fez entender o que é o verdadeiro amor.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que concordaram em participar da pesquisa mesmo que, muitas vezes, estivessem debilitados, quase sem forças. Além disso, arcaram com todos os custos, para se deslocarem até o Hospital das Clínicas. Obrigado pela confiança!

Ao Dr. João Renato Rebello Pinho, que orientou este trabalho e compartilhou seu conhecimento para desenvolvimento desta pesquisa.

À Fernanda de Melo Malta, que se dedicou muito para a realização desse estudo. Seus conselhos e ajuda foram fundamentais para a conclusão dessa dissertação. Ela foi uma verdadeira coorientadora.

À Michele Soares Gomes-Gouvêa, que sempre incentivou e deu conselhos sábios para execução do estudo.

À Dra. Denise Paranagué-Vezozzo, que, durante as coletas, realizou com muito profissionalismo e dedicação, todos os exames de ultrassonografia e fibroscan, além de compartilhar conselhos valiosos para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos médicos que acompanham os pacientes com CHC incluídos neste estudo, especialmente às Dra. Luciana Kikuchi, Dra. Aline Lopes Chagas, Dra. Regiane S. S. M. Alencar e Dra. Claudia Megumi Tani.

Ao Ambulatório do Fígado do Departamento de Gastroenterologia, aos médicos e aos funcionários.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, chefe do Departamento de Gastroenterologia, que sempre incentivou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Nairo Massakazu Sumita, chefe da Divisão do laboratório Central, que nos disponibilizou os exames bioquímicos do pacientes.

À Equipe de biologia molecular do LATE-Hospital Albert Einstein, pelos exames de genotipagem e carga viral.

Ao laboratório de epidemiologia e estatística do Departamento de Gastroenterologia, especialmente ao estatístico Dr. Marcio Augusto Diniz.

Às minhas amigas no laboratório Caroline Furtado Noble, Ariana Carolina Ferreira, Cris Nakle, Livia Botelho-Lima e Maiara Gottadi, que, além de serem colegas de trabalho, muitas vezes me fizeram rir, escutaram minhas dúvidas e me deram conselhos. Elas fizeram a rotina do laboratório muito mais prazerosa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório Karine Vieira Kaspareto, Ana Catharina Seixas Santos Nastri, Paola Lara Faria, Ketty Gleyzer de Oliveira e Max Diego Cruz Santos. Eles sempre me apoiaram e torceram muito pelo meu sucesso.

Aos funcionários do laboratório Clarice Lemos, Fatima Dantas, Dirce Mary Correia Lima, que sempre ajudaram o desenvolvimento da pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro disponibilizado para a realização deste trabalho.

Ao meu amigo Renato de Paula Vitor, a quem considero um irmão, pela amizade incondicional.

Aos meus irmãos Mauricio Saviniecz Moreira e Luiz Eduardo Moreira e minhas cunhadas Cheila de Jesus Santos e Rose Almeida, que sempre me incentivaram e torcem por meu sucesso.

À minha família Moreira e Saviniecz, que sempre acreditam no meu sucesso.

À Tia Lurdes A. Moreira Ratti e ao tio Paulo Cesar Ratti, sem os quais nem graduação teria feito. O incentivo de vocês mudou radicalmente minha vida, abrindo-me as portas do conhecimento. Obrigado por acreditar na minha capacidade e por tudo que fizeram por mim.

Ao meu companheiro Nilton Serson que mudou meu mundo em todos os aspectos, o que trouxe um colorido diferente na minha forma de ver o mundo. Obrigado por me incentivar e a me estimular para crescer cada vez mais. Te amo.

Aos meus pais Ana Saviniecz Moreira e Aldevino A. Moreira (Baiano), que me educaram e passaram os melhores princípios para ser quem eu sou, deram-me amor e carinho. Eles nunca pouparam esforços e trabalharam duro para me dar tudo melhor. Além disso, acreditaram muito no meu sonho. Amo vocês.

EPÍGRAFE

Triste época! É mais fácil desintegrar um
átomo do que um preconceito.

Albert Einstein

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Vírus da Hepatite C.....	14
1.2. História natural da hepatite C.....	16
1.3. Fatores de risco associados ao CHC.....	18
1.4. HCV e hepatocarcinogênese	19
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1. Aspectos Éticos.....	27
3.2. Casuística	27
3.2.1. Pacientes com CHC	29
3.2.2. Pacientes Cirróticos.....	30
3.3. Coleta e exames	31
3.4. Caracterização molecular da região core do HCV	32
3.4.1. Extração do RNA viral	32
3.4.2. Síntese do cDNA e primeira etapa da PCR	32
3.4.3. Segunda etapa da PCR (Nested-PCR).....	33
3.4.4. Identificação e quantificação do produto da PCR	34
3.4.5. Sequenciamento	35
3.4.6. Análise das sequências	36
3.5. Genotipagem do HCV	37
3.6. Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Características demográficas e laboratoriais.	39
4.2. Genótipos.....	40
4.3. Análise de mutações da região core do HCV	41
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Incidência de Câncer no Mundo em 2012.	13
Figura 2-	Organização genômica do vírus da Hepatite C.	14
Figura 3-	Vias da Hepatite C promovendo a hepatocarcinogênese.	20
Figura 4-	Vias de sinalização celular relacionadas à proteína do core HCV relacionadas a hepatocarcinogênese.	21
Figura 5-	Fluxograma da seleção dos pacientes.	28
Figura 6-	Distribuição dos genótipos e subtipos do HCV dos pacientes incluídos neste estudo.	40
Figura 7-	Resultado das reações de amplificação, sequenciamento e análise da qualidade das sequências da região core do HCV obtidas a partir das amostras de pacientes com CHC.	41
Figura 8-	Resultado das reações de amplificação, sequenciamento e análise da qualidade das sequências da região core do HCV obtidas a partir das amostras de pacientes com CHC.	42
Figura 9-	Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV genótipo 1a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.	44
Figura 10-	Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV genótipo 1b. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.	45
Figura 11	Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV genótipo 3a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.	46
Figura 12	Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV genótipo 2a, 2b, 2c e 5a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.	47
Figura 13	Análise de florestas aleatórias.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Proteínas do HCV e funções.	15
Tabela 2-	Características dos pacientes CHC: Idade, sexo, etiologia, Child Pugh e Estadiamento BCLC.	30
Tabela 3-	Características dos pacientes Cirróticos: Idade, sexo, etiologia.	31
Tabela 4-	<i>Primers</i> utilizados para amplificar o HCV.	33
Tabela 5	Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos neste estudo.	39
Tabela 6	Mutações encontradas nas posições 70 e 91 da proteína do core do HCV relacionadas ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.	48

RESUMO

Moreira JP. *Caracterização das mutações da região core do vírus da hepatite C associadas ao carcinoma hepatocelular.* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 63p.

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) pode evoluir gradualmente para hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) ao longo de 20 a 30 anos [1-3]. O carcinoma hepatocelular é a quinta neoplasia mais comum em todo o mundo, sendo responsável por mais de 600.000 mortes por ano. Atualmente, cerca de 170 milhões de indivíduos estão infectados pelo HCV, o que corresponde a aproximadamente 3% da população do mundo. A hepatocarcinogênese é um processo complexo, com várias etapas que envolvem alterações genéticas e epigenéticas. Estudos relatam que substituições de aminoácidos (aa) na posição 70 e 91 da região core do HCV podem estar relacionados ao desenvolvimento de CHC. O conhecimento sobre os mecanismos da carcinogênese que envolvem o HCV são importantes para a descoberta de biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos do CHC. Neste estudo, foram analisados os genótipos virais e a presença de mutações na região core do HCV, em 94 pacientes com CHC e em 79 pacientes cirróticos (sem CHC). As sequências da região core do HCV foram obtidas pelo método de sequenciamento populacional baseado na metodologia de Sanger. Características demográficas, bioquímicas e sorológicas também foram avaliadas. A idade dos pacientes com CHC foi significativamente maior do que a dos pacientes sem CHC (63 vs 60,5 anos, $P=0,025$). Uma proporção maior de homens foi observada no grupo CHC (64,4% vs 54%, $P=0,329$), qual apresentou nível de alfa-fetoproteína significativamente mais elevado ($P=0,003$) e menores níveis de albumina em relação ao grupo sem CHC ($P=0,012$). Elevada variabilidade genética do HCV foi observada. Ao todo, quatro genótipos e sete subtipos foram encontrados. O subtipo 1b foi o mais frequente em ambos os grupos. Os subtipos encontrados no grupo CHC e cirróticos foram, 1a (13,6%), 1b (45,7%), 3a (28,8%), 2b (6,8%), 2a (1,7%), 2c (1,7%), 5a (1,7%); e 1a (30%), 1b (44%), 3a (22%), 2b (2%) e 5a (2%). As mutações R70Q e L/C91M foram observadas principalmente no HCV genótipo 1b. Não houve associação entre mutações nas posições 70 e 91 na região core do HCV e o desenvolvimento de CHC.

Descritores: hepatite C; hepatite crônica; carcinoma hepatocelular; hepacivírus; mutação; fibrose.

SUMMARY

Moreira JP. *Characterization of mutations in Hepatitis C virus core region associated with hepatocellular carcinoma.* [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015. 63p.

Hepatitis C virus (HCV) infection is often persistent and gradually advances from chronic hepatitis (CH) to liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (HCC) over 20 to 30 years [1-3]. Worldwide, hepatocellular carcinoma is the fifth most common neoplasm and is responsible for more than 600,000 deaths annually due to very poor prognosis. There are about 170 million individuals infected with HCV, corresponding to approximately 3% of world population. Hepatocarcinogenesis is a complex process involving genetic and epigenetic modifications. Studies have reported that amino acid substitutions (aa) at position 70 and 91 of HCV core region may be related to development of HCC. Understanding the pathogenesis of HCV-induced hepatocarcinogenesis is important to identify novel biomarkers and potential therapeutic targets. In this study, the viral genotypes and the presence of mutations in HCV core region were analyzed in 94 patients with HCC, and also in 79 cirrhotic patients (without HCC). HCV core sequences were obtained using population sequencing based on Sanger method. Demographic, biochemical and serological characteristics were also evaluated. The age of patients with HCC were significantly higher than in patients without HCC (63 vs. 60.5 years, $P=0.025$). High proportion of men was observed in HCC group (64.4% vs 54%, $P=0.329$). Alpha-fetoprotein level was significantly higher in HCC group compared to cirrhotic group ($P=0.003$), and low rates of albumin was observed in cirrhotic group ($P=0.012$). High genetic variability of HCV was observed, in HCC group, however genotype 1b was the most common in both groups. Other genotypes were found in HCC group: 1a (13.6%), 1b (45.7%), 3a (28.8%) 2b (6.8%), 2a (1.7%), 2c (1.7%) and 5a (1.7%). In cirrhotic group was found genotypes 1a (30%), 1b (44%), 3a (22%), 2b (2%) and 5a (2%). Mutations R70Q and L/C91M were mainly observed in individuals infected with HCV genotype 1b. In the present study, no association between mutations at positions 70 and 91 of HCV

Descriptors: hepatitis C; hepatitis, chronic; carcinoma, hepatocellular; hepatitisvirus; mutation; fibrosis.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O vírus da Hepatite C (HCV) é a maior causa de hepatite crônica no mundo e o principal fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (CHC). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 185 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo HCV e a prevalência dessa infecção varia entre os diferentes países [3, 4].

Entre os indivíduos infectados pelo HCV, poucos apresentam resolução espontânea da infecção; a maioria, entretanto, torna-se cronicamente infectada, tendo, dessa maneira, um risco maior de desenvolvimento de cirrose e, conseqüentemente, CHC. A média de tempo a partir da infecção até a evolução para cirrose é de 13-25 anos, e para o CHC, 17-32 anos [3, 5-8]. O câncer hepático é o quinto tipo mais comum entre os homens e o sétimo entre as mulheres. Em 2012, sua incidência mundial foi estimada em 782.000 novos

casos (Figura 1) [7].

Figura 1: Incidência de câncer hepático no mundo (2012) estimada por 100.000 pessoas, considerando ambos os sexos e todas as idades [7].

1.1. Vírus da Hepatite C

O HCV é um vírus envelopado que pertence ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae*. Apresentam um genoma composto por uma fita simples de RNA de polaridade positiva, com aproximadamente 9.600 nucleotídeos, organizados em uma única região aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*), que codificam as proteínas estruturais (core, E1 e E2) e as não estruturais (p7, NS2 a NS5b). Nas extremidades do genoma, encontram-se regiões não traduzidas (5'UTR e 3'UTR), que têm função importante na replicação viral [9, 10] (Figura 2).

Figura 2: Organização genômica do vírus da Hepatite C [7].

Cada região do genoma viral tem uma função específica. Na tabela 1 estão descritas as principais funções de cada proteína do HCV.

Tabela 1: Proteínas do HCV e funções [10].

Proteína viral	Função
Core	Proteína formadora do capsídeo. Funções de regulação da tradução, replicação do RNA viral e montagem de partículas.
Glicoproteína 1 do envelope (E1)	Glicoproteína transmembrana do envelope viral. Adsorção e endocitose mediada por receptor.
Glicoproteína 2 do envelope (E2)	Glicoproteína transmembrana do envelope viral. Adsorção e endocitose mediada por receptor.
p7	Forma um canal iônico no retículo endoplasmático. Essencial na formação de partículas virais infecciosas.
NS2	Porção da protease NS2-3, que catalisa a clivagem da poliproteína precursora entre NS2 e NS3
NS3	Atividade ATPase / helicase, clivagem das proteínas não estruturais.
NS4A	Crucial na replicação do HCV. Induz a formação da rede membranosa no RE durante a replicação do RNA-HCV.
NS4B	Cofator da protease NS3-NS4A.
NS5A	Fosfoproteína multifuncional. Contém a região determinante de sensibilidade ao IFN (ISDR) que desempenha um papel importante na resposta ao tratamento com IFN- α .
NS5B	RNA polimerase RNA dependente. Replicação do genoma viral.

A elevada diversidade genética do HCV é resultado do acúmulo de erros de incorporação das bases durante sua replicação. Essa diversidade permite classificá-lo em sete genótipos filogeneticamente distintos e já foram descritos mais de 100 subtipos. A persistência da infecção é consequência da variabilidade genética do HCV, uma vez que favorece o aparecimento de variantes virais que não são reconhecidas pelo sistema imune, e até mesmo variantes resistentes à terapia antiviral [11].

1.2. História natural da hepatite C

A evolução da infecção pelo HCV pode variar drasticamente. Enquanto algumas pessoas eliminarão o vírus na fase inicial da infecção, outros desenvolverão uma infecção crônica que, ao longo de anos e décadas, pode permanecer benigna ou progredir para uma doença grave. Um indivíduo, depois de vinte anos de infecção, pode apresentar apenas lesões hepáticas de leve a moderada intensidade, enquanto outro, poderá desenvolver lesão hepática grave com avanço à insuficiência hepática, associada com cirrose ou evolução para CHC.

Durante a fase aguda da infecção pelo HCV, a maioria das pessoas não apresenta sintomas. Quando os sintomas se desenvolvem, tendem a aparecer cerca de seis semanas após a exposição ao HCV e podem ser descritos como semelhantes aos da gripe, com exceção da icterícia, colúria e acolia fecal, quando presentes [12]. Estes sintomas desaparecem algumas semanas após seu início. Em casos muito raros, a infecção aguda pelo HCV causa hepatite fulminante, com insuficiência hepática súbita e grave [13-15].

Nem todos os indivíduos com infecção aguda pelo HCV desenvolvem infecção crônica. Estudos mostram que de 15% a 25% das pessoas com infecção aguda desenvolvem anticorpos contra o vírus da hepatite C, mas não progridem para infecção crônica de HCV, ou seja, clareiam o vírus [16-20]. O clareamento viral é a eliminação espontânea do vírus da hepatite C da corrente sanguínea e pode ser o resultado da combinação de fatores virais e fatores relacionados ao hospedeiro.

Cerca de 80% dos indivíduos infectados pelo HCV não eliminam o vírus espontaneamente e, assim, a infecção crônica se estabelece. A maioria das pessoas com infecção crônica permanece assintomática durante anos, embora algumas possam apresentar fadiga, depressão e outras manifestações extra-hepáticas decorrentes da infecção viral.

As complicações clínicas da hepatite C podem incluir fibrose (cicatrização do tecido hepático), cirrose e carcinoma hepatocelular. A fibrose pode ser acelerada por vários fatores, incluindo idade avançada (> 40 anos), consumo de álcool (moderado a intenso), sexo masculino e infecção concomitante com outros vírus (hepatite B e co-infecção com o HIV). A progressão da fibrose pode ser mais rápida em pessoas que foram infectadas pelo HCV a partir de transfusões de sangue [3, 21-24].

A cirrose é caracterizada pela destruição e substituição de hepatócitos por fibrose. Histologicamente, é caracterizada pela presença desta, que evolui para formações nodulares difusas, promovendo um desarranjo na arquitetura e vascularização do fígado. Sua etiologia é variável, podendo estar associada a hepatites virais, alcoolismo, esteato-hepatite não alcoólica, hemocromatose, doença de Wilson, cirrose biliar primária, hepatite auto-imune e colangite esclerosante primária [25].

O Carcinoma Hepatocelular consiste em um dos principais tumores malignos, representando cerca de 5% de todas as neoplasias malignas. Ele é considerado o quinto tipo de câncer mais comum e o terceiro em causa de morte [26]. Até 5% dos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV

desenvolvem CHC. O CHC é um tumor epitelial derivado dos hepatócitos, com parênquima formado por células neoplásicas arranjadas em um padrão trabecular ou acinar, em meio a pouca quantidade de estroma. Macroscopicamente, pode ser classificado quanto à sua forma, tamanho ou padrão de crescimento [27].

1.3. Fatores de risco associados ao carcinoma hepatocelular

A etiologia do CHC pode variar conforme a região geográfica. Classicamente, os principais agentes etiológicos são as infecções crônicas pelo HCV e HBV bem como a cirrose alcoólica [28]. No mundo o HCV e o HBV são encontrados em 80% dos casos de CHC, sendo que no Brasil, o principal agente associado é o HCV (54%), seguido pelo HBV (16%) e o alcoolismo (14%) [29]. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do CHC são idade avançada, sexo masculino, doença hepática crônica, cirrose, exposição à aflatoxinas (toxinas produzidas por fungos presentes principalmente em grãos que não são bem armazenados, como amendoim, milho e soja) e diabetes [30-32].

A ingestão de álcool em pacientes com hepatite C crônica aumenta o risco de desenvolvimento de CHC [33-35]. Outros fatores de risco, como a diabetes mellitus, principalmente com a presença de esteatose hepática, podem também sugerir risco aumentado de desenvolvimento de CHC [36-38]. O papel do genótipo do HCV é menos claro, porém estudos mostram risco aumentado de CHC em pacientes infectados com o subtipo 1b [35, 39, 40]. Em um trabalho anteriormente realizado por nosso grupo, foi observada uma maior

frequência de HCV genótipo 3 entre os casos de CHC do que a encontrada nos casos sem CHC [41]. A mesma associação foi previamente relatada no Paquistão [42, 43].

No Brasil, os estudos relatam predominância do CHC nos pacientes do sexo masculino (frequência três vezes maior do que em mulheres) e associação com álcool. O CHC apresenta uma taxa de mortalidade para ambos os sexos, variando de 0,25 na região Sul; 0,27 no Sudeste; 0,12 no Nordeste; 0,08 no Norte e 0,05 casos no Centro-Oeste, por 100.000 habitantes por ano [44, 45].

1.4. HCV e hepatocarcinogênese

Pacientes cronicamente infectados com HCV, seguindo a história natural da doença, poderão desenvolver CHC após 30 anos [46]. A taxa anual de pacientes cirróticos que desenvolvem o CHC é de 1 a 7% [36]. Nos últimos anos, foi observado o aumento da incidência de casos de CHC principalmente na população ocidental e a maioria deles está relacionada ao HCV. A associação entre HCV e CHC é provavelmente resultado da combinação de fatores virais, resposta imunológica e presença de cirrose. Esses efeitos parecem causar uma instabilidade genômica (Figura 3), modificando genética e epigeneticamente o genoma do hospedeiro [47].

Figura 3: Vias da Hepatite C promovendo a hepatocarcinogênese. (Adaptado de Jeong [48].

No seu ciclo de replicação o HCV não apresenta atividade corretora da transcriptase reversa e também não se integra ao genoma do hospedeiro. Dessa forma, sendo o HCV um vírus que replica unicamente no citoplasma, a principal hipótese da progressão para a carcinogênese é a de que possa ocorrer através de formas indiretas, como os efeitos da inflamação crônica e da lesão hepatocelular. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que a presença de cirrose é quase um pré-requisito para o desenvolvimento de CHC, uma vez que, 80 a 90% dos fígados que desenvolvem CHC são cirróticos [47]. Algumas proteínas do HCV (core, NS3 e NS5A) parecem estar associadas a mudanças na expressão de genes no hospedeiro, as quais podem favorecer a

oncogênese, modulando a apoptose, a transformação celular, promovendo o crescimento e a imortalização celular, ainda, auxiliando na replicação viral [49].

A proteína do core do HCV está envolvida na montagem da partícula viral e na geração de vírions completos. No entanto, também está associada à sinalização celular, ativação da transcrição, apoptose, metabolismo lipídico e transformação celular [50]. Essa proteína desempenha um papel crucial na regulação do crescimento de hepatócitos e no desenvolvimento de CHC [51].

Em modelos de camundongos transgênicos, a proteína do core pode induzir o CHC, embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorra ainda não foi totalmente elucidado [52]. Essa proteína foi caracterizada por afetar a modulação dos produtos dos genes celulares em várias vias de regulação envolvidas na proliferação celular, controle do ciclo celular e formação de tumores [50]. A figura 4 representa esquematicamente as vias em que essa proteína interfere diretamente.

Figura 4: Vias de sinalização celular relacionadas à proteína do core HCV relacionadas à hepatocarcinogênese. Adaptado de Jeong [48].

A proteína do core interage se ligando às proteínas supressoras tumorais, como p21, p53, p73 e pRb, modificando a expressão destas, que são importantes no controle da oncogênese. A via do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β abreviação do inglês *transforming growth factor beta*) controla a proliferação e a diferenciação celular. A interação com a proteína do core favorece o aumento da fibrogênese e da oncogênese. Na via de sinalização da RAF/MAPKS (abreviado do inglês *RAF kinases/mitogen-activated protein kinases*), a interação com a proteína do core pode promover o envio de sinais de estímulo de crescimento do exterior da célula até o núcleo, ativando genes para a progressão do ciclo celular, que aumentam a transcrição e a divisão celular. Outra via que pode sofrer interação é a Wnt/ β -catenina, que ao interagir com a proteína do core do HCV, estimula a proliferação celular e a diminuição da diferenciação [48].

Estudos clínicos observaram a associação entre a presença de mutações de aminoácidos da proteína core, posições 70 (arginina) e 91 (leucina), com resposta ao tratamento. Esses estudos indicaram que essas mutações, presentes na região codificadora da proteína do core do HCV no subtipo 1b, são fatores preditivos de má resposta ao tratamento com PEG-Interferon/Ribavirina [53-57]. Um estudo retrospectivo realizado em 361 pacientes infectados pelo genótipo 1 determinou, de forma significativa, que o risco do CHC poderia ser previsto por essas mutações em associação a fatores do hospedeiro, como idade, sexo e fibrose hepática [58].

A proteína do core do HCV está envolvida em diferentes vias que estimulam o processo de hepatocarcinogênese, tornando-se, dessa maneira,

uma proteína muito importante de ser estudada. O presente estudo buscou conhecer a diversidade dessa proteína na tentativa de identificar mutações que possam estar associadas ao desenvolvimento de CHC. Sendo assim, a caracterização da proteína do core pode ser uma importante ferramenta no acompanhamento clínico dos pacientes infectados pelo HCV.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- ✓ Comparação entre o perfil de mutações da região core do HCV de indivíduos cirróticos e de indivíduos com CHC.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar possível associação entre mutações do HCV e desenvolvimento de CHC;
- ✓ Avaliar as diferentes variáveis clínicas e demográficas dos pacientes estudados.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Para realizar este estudo, os pacientes voluntários concordaram em participar, estando cientes dos riscos e benefícios implícitos relacionados à pesquisa, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cappesq HCFMUSP projeto n. 0255/11).

3.2. Casuística

A população de estudo foi inicialmente baseada na análise de prontuários de pacientes atendidos no ambulatório de Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram selecionados 300 pacientes com histórico de infecção pelo HCV, informação obtida no prontuário do paciente que foi posteriormente confirmada através da solicitação de exames para a detecção do HCV RNA.

Os pacientes selecionados foram classificados em dois grupos: pacientes com carcinoma hepatocelular (CHC) e pacientes com cirrose (sem nódulo).

Figura 5: Fluxograma da seleção dos pacientes.

Todos os indivíduos antes de realizarem o procedimento da coleta de sangue passaram por uma entrevista para coleta de informações.

3.2.1. Pacientes com CHC

Neste grupo foram incluídos 94 indivíduos infectados pelo HCV e com CHC. O rastreamento dos nódulos foi realizado por ultrassonografia pela divisão de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. A confirmação do diagnóstico de CHC foi realizada através de um exame de imagem (Tomografia Computadorizada ou Ressonância Magnética) ou pela biopsia do nódulo hepático.

Foi considerado uso de álcool em indivíduos com história de ingestão de mais de 60g/dia de etanol para mulheres e de 80g/dia para homens, por mais de 10 anos. Esta informação estava disponível no prontuário médico.

Os pacientes com CHC foram classificados quanto à gravidade da cirrose utilizando o escore Child-Pugh no momento do diagnóstico. Este escore valoriza três variáveis contínuas (tempo de protrombina, bilirrubina e albumina) e duas quantitativas (ascite e encefalopatia hepática) [59, 60]. Este escore define 3 grupos de pacientes com gravidade da doença crescente A, B e C. No ano de 2000, o grupo do fígado de Barcelona propôs um novo estadiamento, o BCLC, que pode orientar a terapêutica no tratamento do tumor. Nesse estadiamento o paciente pode ser classificado de 0, A, B, C e D, conforme gravidade da doença (Tabela 2).

Tabela 2: Características dos pacientes CHC: Idade, sexo, etiologia, Child-Pugh e Estadiamento BCLC.

Pacientes com CHC	
n=94	
Idade (anos)	
mediana (25-75%)	62 (57,5-68)
mín.-máx.	45-78
Sexo	
masculino/feminino	58/36
Etiologia	
Hepatite C	84 (89,4%)
Hepatite C + álcool	10 (10,6%)
Child Pugh	
A	78 (83%)
B	15 (16%)
C	1 (1%)
Estadiamento BCLC	
0	16 (17%)
A	51 (54,3%)
B-C	25 (26,6%)
D	2 (2,1%)

BCLC= Barcelona Clinic Liver Cancer

3.2.2. Pacientes Cirróticos

Foram selecionados 79 indivíduos infectados pelo HCV portadores de cirrose hepática. No mesmo dia em que foi realizada a coleta de sangue, a cirrose hepática foi verificada pela associação da ultrassonografia com a elastografia transitória (Fibroscan[®]), sendo que todas as avaliações conduzidas no presente estudo foram realizadas pelo mesmo observador. Para considerar

cirrose, o ponto de corte da elastografia transitória foi de 14 kpa. Todos os indivíduos incluídos nesse grupo realizaram exames de ultrassonografia seis meses após a realização do primeiro exame, com o intuito de verificar ausência de nódulos hepáticos (Tabela 3).

Tabela 3 Características dos pacientes Cirróticos: Idade, sexo e etiologia.

Pacientes cirróticos n=79	
Idade (anos)	
mediana (25-75%)	61 (52-66)
mín.-máx.	36-80
Sexo	
masculino/feminino	40/39
Etiologia	
Hepatite C	79 (100%)

3.3. Coleta e exames

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos tratados com Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (K3 EDTA) e também em tubos com gel e sem aditivos (BD Vacutainer™). Uma alíquota das amostras de sangue foi encaminhada para o laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), onde foram realizados os exames bioquímicos. A genotipagem e a carga viral foram realizadas no laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein. A quantificação da carga viral foi realizada com a utilização do COBAS AmpliPreP/COBAS Taqman HCV Test da Roche versão 2.0. A faixa de linearidade de quantificação foi de

43 a 19.100.000 UI/mL. O limite inferior de detecção para esse teste, com faixa de positividade de 63%, é de 2,5 UI/mL. A genotipagem foi realizada a partir da amplificação e sequenciamento da região NS5B do genoma do HCV.

A outra parte das amostras foi encaminhada ao laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical-IMT/USP, onde foi armazenada em freezer -80°C e, posteriormente, foram realizadas as técnicas para caracterização molecular da região do core do HCV.

3.4. Caracterização molecular da região core do HCV

3.4.1. Extração do RNA viral

A extração do RNA foi realizada a partir de 1 mL de soro dos indivíduos selecionados. As amostras de soro foram centrifugadas por 1 hora em centrífuga refrigerada à 4°C em rotação de 13.200 rpm. O sobrenadante de 800 µL foi descartado e os 200 µL restantes foram utilizados na extração de RNA. O kit utilizado foi o *QIAamp® MinElute Virus Spin* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Imediatamente após a extração, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA).

3.4.2. Síntese do DNA Complementar (cDNA) e primeira etapa da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de transcrição reversa (síntese do cDNA) e a primeira etapa de amplificação por PCR foram realizadas no mesmo tubo, para isso foi utilizado o

kit *SuperScript™ III One-Step RT-PCR/ Platinum® Taq High Fidelity* (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram utilizados *primers* específicos para a região da proteína core do HCV (Tabela 3).

O volume final da reação foi de 25 µL, sendo: 12,5 µL do 2X Reaction Mix, 1 µL do primer senso e 1 µL do *primer* anti-senso (10 µM cada), 0,5 µL da enzima, 7µL de H₂O (livre de RNase e DNase) e 3 µL do RNA extraído. As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de variação de temperatura: 50°C por 30 minutos, 94°C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 68°C por 80 segundos, extensão final a 68°C por 5 minutos.

Tabela 4: *Primers* utilizados para amplificar o HCV.

Primer	Sequência de nucleotídeo no sentido 5' - 3'	Posição do nucleotídeo	Reação	Referência
HCV5UTRcoreF1 (senso)	CCCTGTGAGGAAGTCTGTCTTCACGC	43 → 69	Síntese do DNA Complementar (cDNA)	Kato et. Al, 1990
HCV5UTRcoreR1 (anti-senso)	AAGATAGARAARGAGCAACC	511 → 530	Síntese do DNA Complementar (cDNA)	Deste estudos
HCV5UTRcoreF2 (senso)	TCTAGCCATGGCGTTAGTAYGAGTGT	78 → 103	PCR e Sequenciamento	Sturyver et al., 1996
HCV5UTRcoreR2 (anti-senso)	ATGTACCCCATGAGGTCGGC	391 → 410	PCR e Sequenciamento	Abdel-Hamid M, et al., 2007

3.4.3. Segunda etapa da Reação em Cadeia da Polimerase (Nested-PCR)

O produto obtido na etapa de RT-PCR foi submetido a mais uma etapa de amplificação (*Nested-PCR*) utilizando-se a enzima *Platinum Taq DNA* polimerase (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de

PCR foram realizadas em volume final de 50 μ L nas seguintes condições: 35 μ L H₂O (livre de RNase e DNase), 5 μ L de Buffer 10X, 1 μ L dNTPs Mix (10 mM), 1.5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 0,5 μ L da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (5U/ μ L), 1 μ L do primer senso e 1 μ L do primer anti-senso (10 μ M cada, vide tabela 3) e 5 μ L do produto da reação RT-PCR.

As amostras foram submetidas aos seguintes ciclos de variação de temperatura: 95°C por 5 minutos seguidos de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 48°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. A extensão final a 72°C por 10 minutos.

3.4.4. Identificação e quantificação do produto da PCR

Após a amplificação, a identificação do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2%. Para isto, foram misturados 4 μ L do produto final da PCR com 1 μ L do tampão 10X Bluejuice Gel Loading Buffer (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), sendo aplicada em gel de agarose 2% preparada com tampão TAE 1X e adição de 5% de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA). Também foi aplicado no gel o padrão de massa *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) que permitiu avaliar a quantidade de produto obtido na reação de PCR.

Depois da eletroforese, os géis foram colocados em um transluminador de luz Ultra Violeta (Image Acquisition and Analysis Software, UVP, INC., Carlsbad, CA, EUA) e as bandas dos produtos de PCR foram comparadas com

as bandas dos padrões de tamanho molecular e de massa, conforme orientação do fabricante.

3.4.5. Sequenciamento

Para o sequenciamento das amostras foi empregada a técnica de sequenciamento direto derivada da metodologia de Sanger, utilizando-se dideoxynucleotídeos (ddNTPs) marcados com fluorescência, conforme o *kit* ABI Prism®BigDye™ Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O equipamento utilizado foi o Sequenciador Automático de DNA modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) [61].

As reações de sequenciamento foram realizadas com volume final de 20 µL nas seguintes condições: 4 µL do reagente *Ready Reaction Premix kit Big Dye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 4 µL do tampão 5X, 2 µL de *primer* (1,6 µM), 2 µL de DNA (20ng/µL) e H₂O q.s.p. 20 µL. As condições das reações de sequenciamento foram as mesmas para todas as reações. As amostras foram submetidas a 25 ciclos de variação de temperatura: 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Para cada amostra foram geradas sequências a partir das fitas de DNA senso e anti-senso para garantir a melhor qualidade.

Antes de realizar a eletroforese capilar, as amostras foram purificadas para remoção de ddNTPs (dideoxynucleotídeos) que não foram incorporados ao DNA durante a reação. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 65% (Merck S.A) ao produto da reação, com posterior incubação por 15 minutos à

temperatura ambiente (TA) e centrifugação a 13.000 rpm por 45 min (TA). Após esta etapa, o isopropanol foi removido e em seguida foram realizadas duas lavagens por centrifugação com 150 μ L de etanol 60% (Merck S.A), durante 15 min também a 13.000 rpm (TA). Após as lavagens, todo o etanol foi retirado e as amostras incubadas por aproximadamente 2 min a 94° C, para a evaporação completa do etanol.

As amostras purificadas foram ressuspensas em 10 μ L de formamida *Hi-Di* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e incubadas a 95°C por 4 min para desnaturação das fitas de DNA. Imediatamente após a incubação, foram colocadas em gelo por 1 min e imediatamente levadas ao sequenciador.

3.4.6. Análise das sequências

As sequências obtidas foram analisadas quanto a sua qualidade utilizando o programa *Electropherogram quality analysis* desenvolvido por Togawa, R.C. and Brigido, M.M. disponível no site <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. A partir das sequências senso e anti-senso de cada amostra, foi montada uma sequência consenso [62]. O alinhamento dessas sequências e a análise de mutações foram realizadas utilizando-se o programa Clustal W integrado ao programa BioEdit desenvolvido por Hall, 1999 (versão 7.2.5) [63].

A análise das sequências de aminoácidos foi realizada a partir da comparação das sequências obtidas neste estudo com a sequência referência obtida no banco de dados de Los Alamos (*HCV sequence database*, código de acesso no GenBank D11355) [64]. Com esse alinhamento foi possível

encontrar a fase de leitura da proteína do core e observar substituições de aminoácidos entre as posições 1 a 120.

3.5. Genotipagem do HCV

As amostras foram encaminhadas ao laboratório de técnicas especiais do Hospital Albert Einstein para a realização da genotipagem, empregando como metodologia o sequenciamento populacional da região NS5B do HCV (ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As sequências geradas foram comparadas às sequências referência de cada um dos genótipos do HCV para a determinação do genótipo [41].

3.6. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa R Foundation for Statistical Computing (versão 2.15.3, R Development Core Team 2008, Vienna, Austria). As análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis e os resultados foram apresentados em tabelas para melhor interpretação das informações mais relevantes. O valor de $P < 0,05$ foi considerado para indicar uma diferença estatisticamente significativa. A análise de Florestas Aleatórias foi realizada utilizando o Random Forest package (v4.6-6) considerando 1000 réplicas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características demográficas e laboratoriais.

As amostras de sangue coletadas foram encaminhadas ao laboratório central do HCFMUSP para a realização das dosagens bioquímicas, no entanto, a determinação da carga viral bem como a genotipagem do HCV foram realizadas no Laboratório de Técnicas Especiais (LATE) do Hospital Israelita Albert Einstein. Na tabela 5 estão mostrados os resultados desses exames dos pacientes com sequências de boa qualidade obtidas para a região core do HCV.

Tabela 5: Características demográficas e laboratoriais dos pacientes incluídos neste estudo.

	Pacientes com CHC n=59	Pacientes cirróticos n=50	valor de <i>P</i>
Idade, anos [mediana (25-75%)]	63 (58-68)	60,5 (52-65)	0,025 [#]
Gênero Masculino [n (%)]	38 (64,4%)	27 (54%)	0,329
Plaquetas, x1000/mm ³ [mediana (25-75%)]	88 (69-140)	92 (65-133)	0,939
Albumina, g/dL [mediana (25-75%)]	3,8 (3,2-4,2)	4,15 (3,7-4,4)	0,012
GGT, U/L [mediana (25-75%)]	117,5 (68-215)	85 (51,7-164,5)	0,147
Bilirrubina total, mg/dL [mediana (25-75%)]	0,9 (0,7-1,4)	1 (0,72-1,2)	0,824
Colesterol total, mg/dL [mediana (25-75%)]	141,5 (119,75-166,25)	146,5 (128,5-162)	0,624 [#]
α-fetoproteína, ng/mL [mediana (25-75%)]	18,4 (5-111,9)	6,9 (4-19,1)	0,003
AST, U/L [mediana (25-75%)]	76 (44,5-116,5)	67 (43-106,5)	0,576
ALT, U/L [mediana (25-75%)]	55 (35-85)	54,5 (39,5-90,75)	0,939
FA, U/L [mediana (25-75%)]	116 (82-158,5)	104 (75-135,75)	0,094
HCV RNA, log UI/mL [mediana (25-75%)]	6,06 (5,33-6,37)	5,91 (5,54-6,35)	0,968

O valor de *P* foi calculado utilizando o teste de Mann-Whitney; [#]Test t; *p*<0,05. CHC= Carcinoma hepatocelular.

Dentre as variáveis analisadas, apresentaram diferença estatisticamente significativa a idade, as dosagens de albumina e a alfafetoproteína. Não foi observada diferença entre as cargas virais nos grupos estudados.

4.2. Genótipos

A partir do resultado da genotipagem do HCV, foi possível observar que o grupo de indivíduos com carcinoma hepatocelular apresenta uma maior diversidade genética viral (Figura 6), pois nesse grupo foi encontrado um número maior de subtipos do HCV.

Figura 6: Distribuição dos genótipos e subtipos do HCV dos pacientes incluídos neste estudo.

O genótipo 1 do HCV (incluindo os subtipos 1a e 1b) foi o mais frequente nos dois grupos de pacientes estudados (74% dos cirróticos e 59,3% dos CHC), seguido do HCV genótipo 3 (22% dos cirróticos e 28,8% dos CHC).

4.3. Análise de mutações da região core do HCV

No grupo CHC foram incluídos 94 pacientes, porém 81 amostras apresentaram amplificação da região core do HCV por PCR, ou seja, 13 amostras foram negativas. O sequenciamento da região core foi realizado nas 81 amostras positivas, com obtenção de sequências de boa qualidade em 59 amostras (Figura 7).

Figura 7: Resultado das reações de amplificação, sequenciamento e análise da qualidade das sequências da região core do HCV obtidas a partir das amostras de pacientes com CHC.

No grupo Cirrótico foram incluídos 79 pacientes, porém 71 amostras apresentaram amplificação da região core do HCV por PCR, ou seja, 8 amostras foram negativas. O sequenciamento da região core foi realizado nas 71 amostras positivas, sendo que 50 amostras apresentaram sequências de boa qualidade (Figura 8).

Figura 8: Resultado das reações de amplificação, sequenciamento e análise da qualidade das sequências da região core do HCV obtidas a partir das amostras de pacientes com CHC.

Portanto, a análise de mutações da região core foi realizada em 59 amostras do grupo CHC e em 50 amostras do grupo cirrótico. A tabela 6 resume as mutações observadas nas posições 70 e 91 da proteína do core que, na literatura, são descritas como relacionadas ao desenvolvimento de

carcinoma hepatocelular, principalmente para os indivíduos infectados pelo HCV subtipo 1b.

A análise de mutações foi realizada a partir do alinhamento da sequência consenso obtida de cada paciente com uma sequência referência (Figuras 9 e 10). Apenas sequências validadas no site da Embrapa (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) foram incluídas na análise.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
M62321_1a	MSTNPKPQKK	NKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR	KTSEERSQPRG	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG
C25_1a	R.	T.....										
C83_1a	R.	T.....										
C87_1a	R.	T.....										
C102_1a	R.	T...I...									H.....	
C119_1a	R.	T.....										
C133_1a	R.	T...T...										
C134_1a	R.	T.....										
C137_1a	R.	T.....										
C148_1a	R.	T.....			T.....							
C149_1a	R.	T.....					Q.....	A.....				
C150_1a	R.	T.....						A.....				
C08_1a	R.	T.....										
C15_1a	R.	T...T...										
C33_1a	R.	T.....										
C88_1a	R.	T.....										
HCC7_1a	R.	T.....										
HCC36_1a	R.	T.....						A.....				K.....
HCC43_1a	R.	T.....						A.....				
HCC59_1a	R.	TN.....									N.....	
HCC106_1a	R.	T.....										
HCC70_1a	R.	T.....										H.....
HCC29_1a	R.	T.....										
HCC105_1a	R.	T.....										-----

Figura 9: Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV subtipo 1a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
M58335_1b	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRAPR	KTSESRQPRG	RRQPIPKARR	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	LGWAGWLLSP	RGSRPSPWGPT	DPRRRSRNLG
C13_1b					..T.				M			
C28_1b					..T.		Q	A	M			
C55_1b					..T.		Q		M			
C75_1b					..T.		Q	A				
C86_1b					..T.		Q	A	M			
C101_1b					..T.		Q	A	M			
C103_1b					..T.		Q		M		S	
C114_1b					..T.		Q		M			
C115_1b					..T.		Q	A	M			
C117_1b					..T.		Q	A	M			
C118_1b					..T.		Q	A	M			
C127_1b	Q		..F.		..TT.		V					
C129_1b					..K.	..T.	Q	A	H	M		
C136_1b					..T.		Q	A		M		
C138_1b	Q	..N.	..N.		..T.		Q	T	M			
C146_1b	Q				..T.		Q	A	M			
C147_1b					..T.		Q	A	M			
C34_1b					..T.		Q	A	M			
C38_1b					..T.		Q	A	M			
C71_1b	..M.	..N.					Q	A				
C81_1b					..TT.						S	
C125_1b					..T.			A				
HCC21_1b					..T.			A	M			
HCC22_1b					..T.		Q	A	M			
HCC23_1b					..T.		Q	A	M			
HCC25_1b		..N.			..M.	..T.	Q	S	M		S	
HCC30_1b					..T.		Q	A	M			
HCC33_1b					..T.		Q	A	M			
HCC45_1b	Q				..T.		Q		M			
HCC49_1b					..T.		Q	A	M			
HCC53_1b					..T.		Q	A				
HCC63_1b		Y			..T.		Q		M		S	
HCC65_1b					..T.		Q	A	M			
HCC68_1b					..T.		Q	A				
HCC77_1b					..A.		D	A				
HCC81_1b					..T.		Q	A	M			
HCC95_1b					..T.		Q	A	M			
HCC101_1b					..T.		Q					
HCC104_1b					..T.		Q	A	M			
HCC110_1b					..T.		Q	A	M			
HCC118_1b					..T.		Q	A	M			
HCC120_1b					..T.		Q	A	M			
HCC121_1b					..T.		Q	A	M			
HCC122_1b					..T.		Q	A	M			
HCC124_1b					..T.		Q	A	M			
HCC125_1b					..T.		Q	A	M			
HCC127_1b					..T.		Q	A	M			
HCC128_1b	K				..T.		Q		M			
HCC129_1b					..T.			A			S	

Figura 10: Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV subtipo 1b. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
D17763_3a	MSTLPKPQRK	TKRNTIRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYVLP RR	GPRLGVRATR	KTSEERSQPRG	RRQPIPKARR	SEGRSWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP	RGSRPSWGP N	DPRRRSRN LG
C24_3a		P										
C124_3a	Q										T	
C128_3a		V				E					Q	W
C130_3a												
C139_3a	Q											
C154_3a				M				D			T	
C16_3a							Q					
C31_3a		V	R				Q					
C84_3a			I				D					
C155_3a					C	R						
C156_3a												
HCC8_3a	Q	N										
HCC28_3a												
HCC35_3a			I								T	
HCC39_3a		V										
HCC40_3a	F			L			Q					
HCC50_3a												
HCC55_3a	Q					E						
HCC67_3a					T		D					
HCC71_3a		P					Q					
HCC91_3a												
HCC93_3a											Q	
HCC98_3a												
HCC99_3a												
HCC100_3a						E						
HCC108_3a						E						
HCC115_3a												
HCC132_3a						A					S	

Figura 11: Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV subtipo 3a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.

Figura 12: Alinhamento da sequência de aminoácidos da região core do HCV genótipos 2a, b, c e 5a. Destacados em vermelho os aminoácidos das posições 70 e 91. As sequências identificadas com C antes do número são dos pacientes cirróticos e as identificadas com CHC são dos pacientes com hepatocarcinoma.

Os resultados mostram que os indivíduos infectados pelo HCV subtipo 1b apresentaram maior frequência de mutações nas posições 70 e 91 da proteína core quando comparados aos outros genótipos estudados, isso foi observado tanto nos pacientes CHC como nos cirróticos. Entretanto, para essas posições não foram observadas diferenças com significância estatística entre os grupos CHC e cirróticos (Tabela 6).

Tabela 6: Mutações encontradas nas posições 70 e 91 da proteína do core do HCV relacionadas ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Genótipos e mutações	Grupos		valor de <i>P</i> *
	CHC (n= 59)	Cirróticos (n= 50)	
Mutação R70Q			
1a	0/8 [#] (0%)	1/15 (6,7%)	1
1b	18/27 (66,7%)	15/22 (68,2%)	
3a	2/17 (11,8%)	2/11 (18,2%)	
Mutação L91M			
1b	21/27 (77,8%)	16/22 (72,7%)	1

R (Arginina), Q (Glutamina), L (Leucina), C (Cisteína) e M (Metionina);

[#] número de amostras com mutação/número total de amostras de cada genótipo (%);

* Teste de Fisher; *P* <0,05

Outras posições de aminoácidos na proteína do core foram avaliadas, para isso foi realizada a análise de florestas aleatórias, e os resultados dessa análise mostraram que para o HCV subtipo 1b, as posições 48 e 75 se destacaram das demais posições (Figura 13A) e, para o HCV genótipo 3a, a posição 72 se destacou (Figura 13B). Isso foi observado considerando 1000 replicações.

Figura 13: Análise de florestas aleatórias. (A) Posições de aminoácido da proteína core do HCV subtipo 1b; (B) Posições de aminoácido da proteína core do HCV subtipo 3a. Foram utilizadas 1000 réplicas.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivos caracterizar mutações na região core do HCV de indivíduos com carcinoma hepatocelular e cirrose hepática (sem nódulo), avaliar as variáveis bioquímicas e realizar uma possível associação entre as mutações encontradas e o desenvolvimento de CHC.

Sabe-se que a hepatocarcinogênese é um processo bastante complexo que pode envolver múltiplos fatores. Uma melhor compreensão desses fatores pode levar ao desenvolvimento de estratégias de detecção precoce e até mesmo de terapias mais eficazes.

A idade é um fator do hospedeiro importante no desenvolvimento de hepatocarcinoma, estudos mostram que pacientes infectados pelo HCV após os 40 anos de idade apresentam estágio de fibrose significativamente mais avançado do que aqueles infectados antes de 40 anos. Sabe-se que a fibrose não é um fator linear e que ela apresenta ritmos de progressão diferentes e, que com a idade avançada, esse ritmo pode ser acelerado [65-67]. No presente estudo também foi observada associação entre idade e presença de CHC. Os indivíduos com CHC apresentaram idade mais avançada do que os indivíduos com cirrose e sem nódulo, porém não foi possível estabelecer se essa idade corresponde a um maior tempo de exposição ao vírus ou se o indivíduo foi infectado já em idade avançada.

Os pacientes recrutados para o presente estudo foram acompanhados em um importante centro de referência no tratamento e acompanhamento do hepatocarcinoma em São Paulo. O grupo médico responsável pelo manejo

clínico destes pacientes publicou recentemente dados epidemiológicos dos pacientes atendidos por esse centro. Pode-se observar nas publicações desse grupo que as taxas de detecção de tumores pequenos são bastante elevadas [68]. Este resultado é comparável a taxas encontradas em alguns centros de referência japoneses. Isso é resultado de um eficiente programa de monitoramento dos pacientes que têm doença hepática avançada. Com esse programa, o diagnóstico de CHC ocorre de maneira precoce, o que ajuda a preservar a função hepática, acarretando em um melhor prognóstico da doença.

Este fato pode explicar o bom perfil bioquímico dos pacientes incluídos neste estudo. O dado bioquímico mostrado, que é amplamente utilizado no manejo da doença crônica do fígado, a albumina [68], apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mas o interessante foi notar que embora ela tenha se diferenciado, o valor se encontra dentro dos valores de referência estipulados para pacientes com doença crônica do fígado, sendo o mesmo encontrado para o marcador alfafetoproteína. Nesse caso esse parâmetro não poderia ser utilizado como marcador tumoral. Esse dado reforça a recomendação dos protocolos europeus para a não utilização da alfafetoproteína como ferramenta de diagnóstico para CHC [69, 70].

Em relação aos fatores virais, no presente estudo foi avaliada a diversidade de genótipos e subtipos do HCV nos grupos de pacientes com cirrose e com CHC. No Brasil, são poucos os estudos que relatam essa característica especificamente no grupo de indivíduos com CHC. Em relação aos genótipos encontrados, os dados apresentados corroboram as informações prévias

publicadas em uma população maior de portadores de HCV no Brasil [6, 29, 68, 71]. Além de ser uma importante ferramenta para conhecer a origem e a dinâmica da infecção viral, sabe-se que alguns genótipos são mais agressivos que outros por, de alguma maneira, induzir a fibrose hepática e consequentemente acelerar o desenvolvimento do CHC.

Indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 tem pelo menos o dobro de chance de desenvolver hepatocarcinoma, inclusive alguns autores relatam que o desenvolvimento de CHC em pacientes infectados pelo HCV subtipo 1b pode ocorrer independente da presença de cirrose hepática e que esse processo pode ser desencadeado pela inflação crônica, necrose dos hepatócitos, regeneração e fibrose extensa [72, 73]. Outro fator amplamente conhecido é a capacidade do HCV resistir ao tratamento com Interferon. Sabe-se que o HCV genótipo 2 responde de duas a três vezes mais do que o genótipo 1. Essa falha no tratamento leva a um maior tempo de infecção e, em consequência disso, o risco de desenvolver cirrose hepática aumenta, bem como a progressão para CHC [71, 74]. O genótipo predominante entre os pacientes com CHC, neste estudo, foi o genótipo 1 (subtipo 1b), o que evidencia que este subtipo deva ser o foco da atenção no acompanhamento dos seus portadores, principalmente os pacientes com cirrose instalada.

Estudos mostram associação entre mutações na região core do HCV e o desenvolvimento de CHC [75]. Devido a sua capacidade de interferir em vias importantes da regulação do ciclo celular, a região core do HCV foi caracterizada por apresentar importante potencial oncogênico. Estas interações podem modificar todo o ciclo celular dos hepatócitos, deixando a maquinaria de

defesa celular exposta ao processo de carcinogênese [48].

Substituições de aminoácidos na proteína core do HCV nas posições 70 e 91 já foram associadas ao desenvolvimento de CHC, principalmente em relação ao HCV subtipo 1b. A região core do genoma do HCV é bem conservada, mas acaba apresentando certo grau de variabilidade entre os genótipos [53-56]. Os resultados do presente estudo mostraram que as substituições nas posições 70 e 91 foram encontradas em ambos os grupos de pacientes estudados. Além disso, estas foram mais frequentes em indivíduos infectados pelo HCV-1b, conforme já descrito na literatura.

Em estudo recente, Tasaka-Fujita e colaboradores (2015) [76], utilizando um sistema de cultura celular, avaliou o efeito dos polimorfismos da proteína do core (posições 70 e 91) nas etapas do ciclo replicativo do HCV e também na resposta imune do hospedeiro. O polimorfismo na posição 91 não apresentou diferenças significantes. Por outro lado, foi observada uma redução na produção de partículas virais nas culturas de células transfectadas com uma quimera viral contendo Glutamina na posição 70 (70Q) comparada àquelas que continham uma Arginina nessa mesma posição (70R). Além disso, os autores confirmaram que o acúmulo da proteína core com a variante 70Q resultou no aumento da fosforilação da proteína Kinase R (PKR) e, consequentemente, induziu a supressão da expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC de classe I). A redução na expressão do MHC de classe I inibiu a ação citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ (ativados via MHC I) favorecendo, desse modo, a persistência da infecção viral. Essa infecção persistente, ao longo do tempo, é um fator importante no

estabelecimento da cirrose e do carcinoma hepatocelular.

No presente estudo, a mutação R70Q não permitiu a distinção entre os dois grupos de pacientes avaliados. Uma possível explicação pode ser o fato de que todos os pacientes apresentam cirrose, ou seja, doença hepática avançada. Portanto, a presença dessa mutação pode estar associada ao desenvolvimento da cirrose e, conseqüentemente, ao carcinoma hepatocelular, em outras palavras, pode ser interpretada como um marcador viral relacionado ao dano hepático.

Sugere-se que o rastreamento da mutação R70Q em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, especificamente subtipo 1b, possa ser uma ferramenta importante no monitoramento clínico do avanço da fibrose hepática. Estudos incluindo amostras longitudinais de pacientes infectados pelo HCV subtipo 1b com diferentes padrões de lesão hepática devem ser realizados para que seja confirmada essa associação.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- ✓ Fatores como idade avançada, níveis séricos de alfafetoproteína e albumina podem sugerir presença de CHC, mas não devem ser avaliados isoladamente;
- ✓ Não foi possível diferenciar os grupos de pacientes a partir do perfil de mutações da região core do HCV nas posições 70 e 91;
- ✓ Pacientes infectados pelo HCV genótipo 1b apresentaram maior número de substituições nas posições 70 e 91 da região core;
- ✓ O rastreamento da mutação R70Q em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, especificamente subtipo 1b, pode ser uma ferramenta importante no monitoramento clínico do avanço da fibrose hepática.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Miura, M., et al., *Deep-sequencing analysis of the association between the quasispecies nature of the hepatitis C virus core region and disease progression*. J Virol, 2013. **87**(23): p. 12541-51.
2. WHO, *Hepatitis C global prevalence*. Weekly Epidemiological Record, 1999. **72**:341-344
3. WHO, *World Health Organization: Hepatitis C*. 2014. **Fact sheet**(164).
4. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
5. Alter, M.J., *Epidemiology of hepatitis C virus infection*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(17): p. 2436-41.
6. Lampe, E., et al., *Genetic diversity of HCV in Brazil*. Antivir Ther, 2013. **18**(3 Pt B): p. 435-44.
7. Ming V. Lin, L.Y.K., and Raymond T. Chung, *Hepatitis C Virus–Associated Cancer*. Pathology: Mechanisms of Disease, 2014. **10**.
8. Simmonds, P., *The origin of hepatitis C virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **369**: p. 1-15.
9. Cristina, J. and R. Colina, *Evidence of structural genomic region recombination in Hepatitis C virus*. Virol J, 2006. **3**: p. 53.
10. Mauss, S., D. Hueppe, and U. Alshuth, *Reply. Short Guide to Hepatitis C*. Hepatology, 2013. **60**(3): p. 1110.
11. Pawlotsky, J.M., *Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications*. Clin Liver Dis, 2003. **7**(1): p. 45-66.
12. Koretz, R.L., et al., *Non-A, non-B posttransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis*. Hepatology, 1993. **17**(3): p. 361-5.
13. Chu, C.M., C.T. Yeh, and Y.F. Liaw, *Viral superinfection in previously unrecognized chronic carriers of hepatitis B virus with superimposed acute fulminant versus nonfulminant hepatitis*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(1): p. 235-7.
14. Farci, P., et al., *Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure*. N Engl J Med, 1996. **335**(9): p. 631-4.
15. Hajarizadeh, B., J. Grebely, and G.J. Dore, *Epidemiology and natural history of HCV infection*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(9): p. 553-62.
16. Alberti, A., L. Chemello, and L. Benvegna, *Natural history of hepatitis C*. J Hepatol, 1999. **31 Suppl 1**: p. 17-24.
17. Alter, M.J., *Prevention of spread of hepatitis C*. Hepatology, 2002. **36**(5 Suppl 1): p. S93-8.
18. Alter, M.J., et al., *The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team*. N Engl J Med, 1992. **327**(27): p. 1899-905.
19. Gerlach, J.C., et al., *Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study*. Transplantation, 2003. **76**(5): p. 781-6.

20. Kenny-Walsh, E., *Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin*. Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med, 1999. **340**(16): p. 1228-33.
21. Gordon, M.Y., et al., *Treatment with interferon-alpha preferentially reduces the capacity for amplification of granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from patients with chronic myeloid leukemia but spares normal CFU-GM*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 710-5.
22. Khaliq, S., S. Jahan, and S. Hassan, *Hepatitis C virus p7: molecular function and importance in hepatitis C virus life cycle and potential antiviral target*. Liver Int, 2011. **31**(5): p. 606-17.
23. Lavanchy, D., *The global burden of hepatitis C*. Liver Int, 2009. **29 Suppl 1**: p. 74-81.
24. Matos, M.A., et al., *Epidemiological study of hepatitis A, B and C in the largest Afro-Brazilian isolated community*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2009. **103**(9): p. 899-905.
25. Zhou, J.J., et al., *Hepatitis C virus core protein regulates NANOG expression via the stat3 pathway*. FEBS Lett, 2014. **588**(4): p. 566-73.
26. Stewart, B.W., et al., *Defence of IARC monographs*. Lancet, 2003. **361**(9365): p. 1300.
27. Pimenta, J.R.M., Paulo Sergio, *Carcinoma hepatocelular: um panorama clínico / Hepatocellular carcinoma: a clinical outlook*. Rev. Soc. Bras. Clín. Méd, 2010. **8**.
28. Fattovich, G., et al., *Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S35-50.
29. Kikuchi, L., et al., *Clinical and epidemiological aspects of hepatocellular carcinoma in Brazil*. Antivir Ther, 2013 **18**(3 Pt B): p. 445-9.
30. Bosch, F.X., et al., *Epidemiology of hepatocellular carcinoma*. Clin Liver Dis, 2005. **9**(2): p. 191-211, v.
31. El-Serag, H.B., *Hepatocellular carcinoma: recent trends in the United States*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S27-34.
32. Kensler, T.W., et al., *Chemoprevention of hepatocellular carcinoma in aflatoxin endemic areas*. Gastroenterology, 2004. **127**(5 Suppl 1): p. S310-8.
33. Donato, F., et al., *A case-control study on family history of liver cancer as a risk factor for hepatocellular carcinoma in North Italy. Brescia HCC Study*. Cancer Causes Control, 1999. **10**(5): p. 417-21.
34. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus*. Hepatology, 2002. **36**(5): p. 1206-13.
35. Tagger, A., et al., *Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study*. Int J Cancer, 1999. **81**(5): p. 695-9.
36. El-Serag, H.B., H. Hampel, and F. Javadi, *The association between diabetes and hepatocellular carcinoma: a systematic review of epidemiologic evidence*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006. **4**(3): p. 369-80.

37. Ohata, K., et al., *Hepatic steatosis is a risk factor for hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C virus infection*. Cancer, 2003. **97**(12): p. 3036-43.
38. Pekow , B.A., Zheng H, Chung RT., *Hepatic steatosis is associated with increased frequency of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C-related cirrhosis*. Cancer, 2007. **15**(109).
39. Silini, E., et al., *Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a case-control study*. Gastroenterology, 1996. **111**(1): p. 199-205.
40. Zein, N.N., et al., *Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C genotype 1b*. Am J Gastroenterol, 1996. **91**(12): p. 2560-2.
41. Alencar, R.S., et al., *Low occurrence of occult hepatitis B virus infection and high frequency of hepatitis C virus genotype 3 in hepatocellular carcinoma in Brazil*. Braz J Med Biol Res, 2008. **41**(3): p. 235-40.
42. Idrees, M., et al., *Hepatitis C virus genotype 3a infection and hepatocellular carcinoma: Pakistan experience*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(40): p. 5080-5.
43. Khan, A., et al., *Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan*. J Med Virol, 2009. **81**(7): p. 1189-97.
44. Cotrim, H., et al., *A case-control study on the association of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in northeast Brazil*. Rev Saude Publica, 1992. **26**(5): p. 301-5.
45. Goncalves, C.S., F.E. Pereira, and P. Zago Mda, *[Hepatocellular carcinoma]*. Arq Gastroenterol, 1988. **25**(4): p. 207-17.
46. Niederau, C., et al., *Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study*. Hepatology, 1998. **28**(6): p. 1687-95.
47. Fung, J., C.L. Lai, and M.F. Yuen, *Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis*. Clin Microbiol Infect, 2009. **15**(11): p. 964-70.
48. Jeong, S.W., J.Y. Jang, and R.T. Chung, *Hepatitis C virus and hepatocarcinogenesis*. Clin Mol Hepatol, 2012. **18**(4): p. 347-56.
49. Arzumanyan, A., H.M. Reis, and M.A. Feitelson, *Pathogenic mechanisms in HBV- and HCV-associated hepatocellular carcinoma*. Nat Rev Cancer, 2013. **13**(2): p. 123-35.
50. Lai, M.M. and C.F. Ware, *Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **242**: p. 117-34.
51. Nakamura, H., et al., *HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt*. Hepatol Res, 2011. **41**(5): p. 455-62.
52. Moriya, K., et al., *The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice*. Nat Med, 1998. **4**(9): p. 1065-7.
53. Akuta, N., et al., *A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response*. J Med Virol, 2009. **81**(3): p. 452-8.

54. Akuta, N., et al., *Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels.* J Hepatol, 2007. **46**(3): p. 403-10.
55. Akuta, N., et al., *Predictive factors of virological non-response to interferon-ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load.* J Med Virol, 2006. **78**(1): p. 83-90.
56. Akuta, N., et al., *Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy.* Intervirology, 2005. **48**(6): p. 372-80.
57. Lole, K.S., et al., *Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination.* J Virol, 1999. **73**(1): p. 152-60.
58. Donlin, M.J., et al., *Pretreatment sequence diversity differences in the full-length hepatitis C virus open reading frame correlate with early response to therapy.* J Virol, 2007. **81**(15): p. 8211-24.
59. Child, C.G. and J.G. Turcotte, *Surgery and portal hypertension.* Major Probl Clin Surg, 1964. **1**: p. 1-85.
60. Pugh, R.N., et al., *Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices.* Br J Surg, 1973. **60**(8): p. 646-9.
61. Sanger, F., et al., *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.* Nature, 1977. **265**(5596): p. 687-95.
62. Togawa, B., *PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis.* 2003.
63. Hall, T.A., *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT.* Oxford University Press, 1999(41): p. 95-98.
64. Kuiken, C., et al., *The Los Alamos hepatitis C sequence database.* Bioinformatics, 2005. **21**(3): p. 379-84.
65. Chen, S.L. and T.R. Morgan, *The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection.* Int J Med Sci, 2006. **3**(2): p. 47-52.
66. El-Serag, H.B. and K.L. Rudolph, *Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis.* Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2557-76.
67. Poynard, T., P. Bedossa, and P. Opolon, *Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups.* Lancet, 1997. **349**(9055): p. 825-32.
68. Paranagua-Vezozzo, D.C., et al., *Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort.* Ann Hepatol, 2014. **13**(4): p. 386-93.
69. Liver, E.A.f.t.S.o.t., *EASL-EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma.* J Hepatol, 2012. **56**(4): p. 908-43.

70. Singal, A.G., et al., *Effectiveness of hepatocellular carcinoma surveillance in patients with cirrhosis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **21**(5): p. 793-9.
71. Campiotto, S., et al., *Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(1): p. 41-9.
72. Bruno, S., et al., *Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1350-6.
73. Raimondi, S., et al., *Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis*. J Hepatol, 2009. **50**(6): p. 1142-54.
74. Pecic, V., et al., *Hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis*. J Buon, 2011. **16**(2): p. 277-81.
75. Ahmad, J., F.J. Eng, and A.D. Branch, *HCV and HCC: clinical update and a review of HCC-associated viral mutations in the core gene*. Semin Liver Dis, 2011 **31**(4): p. 347-55.
76. Tasaka-Fujita, M., et al., *Amino Acid Polymorphisms in Hepatitis C Virus Core Affect Infectious Virus Production and Major Histocompatibility Complex Class I Molecule Expression*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13994.