



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

JOÃO PEDRO MARQUES RODRIGUES BARROS

Mecanismos Fisiopatológicos da Hepatite C:
Alvos Terapêuticos

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE FISIOPATOLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:

PROFESSOR DOUTOR RUI VASCO QUINTAIS GRADIZ

PROFESSORA DOUTORA ANABELA MOTA PINTO

Março de 2017

ÍNDICE

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS	7
I. INTRODUÇÃO.....	9
II. MATERIAIS E MÉTODOS	11
III. RESULTADOS.....	12
1. ESTRUTURA DO VÍRUS	12
1.1. <i>PROTEÍNAS ESTRUTURAS</i>	14
1.1.1. Proteína Core.....	14
1.1.2. Glicoproteínas do envelope (E1, E2).....	14
1.2. <i>PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAS</i>	16
1.2.1. p7.....	16
1.2.2. NS2.....	16
1.2.3. NS3.....	16
1.2.4. NS4A.....	17
1.2.5. NS4B	17
1.2.6. NS5A.....	17
1.2.7. NS5B	18
2. CICLO DE VIDA.....	19
2.1. <i>ENTRADA</i>	19
2.2. <i>TRADUÇÃO E PROCESSAMENTO DE POLIPROTEÍNAS</i>	22
2.3. <i>REPLICAÇÃO</i>	25
2.4. <i>MONTAGEM E LIBERTAÇÃO DO VÍRUS</i>	28
3. RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA AO HCV.....	30

3.1.	<i>IMUNIDADE INATA</i>	30
3.2.	<i>IMUNIDADE ADAPTATIVA</i>	35
4.	MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E PATOGENIA	39
4.1.	<i>TRANSMISSÃO</i>	39
4.2.	<i>EPIDEMIOLOGIA</i>	40
4.3.	<i>HEPATITE C AGUDA</i>	42
4.4.	<i>HEPATITE C CRÓNICA</i>	43
4.4.1.	Fatores de risco de progressão para doença crónica	43
4.4.2.	Fibrose	46
4.4.3.	Esteatose hepática e insulino-resistência	48
4.4.4.	Hepatocarcinoma	53
4.4.5.	Manifestações Extra-hepáticas da doença	54
5.	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	58
5.1.	<i>DIAGNÓSTICO</i>	58
5.2.	<i>TRATAMENTO</i>	60
5.2.1.	Avaliação pré-tratamento	60
5.2.2.	Indicações para tratamento	64
5.2.3.	Fármacos e regimes de tratamento atuais	64
6.	DESAFIOS PARA O FUTURO	71
6.1.	<i>GRUPOS DIFÍCEIS DE TRATAR</i>	71
6.1.1.	Mutações de Resistência Viral	71
6.1.2.	Insuficiência renal	72
6.1.3.	Genótipo 3	73
6.1.4.	Genótipos 2, 4, 5 e 6 com cirrose	73
6.1.5.	Doença hepática descompensada	73

6.1.6.	Mulheres grávidas e crianças	74
6.1.7.	Pacientes co-infetados	75
6.2.	<i>TERAPÊUTICA FUTURA</i>	76
6.2.1.	Doença renal crônica.....	76
6.2.2.	Genótipo 3	77
6.2.3.	Genótipo 2, 4, 5 e 6 com cirrose	78
6.2.4.	Cirrose descompensada	79
6.2.5.	Mutações de Resistência Viral	80
6.2.6.	Regimes e Fármacos em Estudo.....	80
6.2.7.	Vacina.....	82
6.2.8.	Fases de ensaios clínicos.....	83
IV.	CONCLUSÃO	84
V.	AGRADECIMENTOS	85
VI.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	86
VII.	ÍNDICE DE TABELAS	87
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

RESUMO

O presente trabalho pretende fazer uma revisão dos conceitos relativos aos mecanismos fisiopatológicos da Hepatite C, partindo de uma perspectiva da virologia molecular para depois analisar diversos alvos terapêuticos. É feita uma descrição da estrutura e ciclo de vida do vírus, resposta imuno-inflamatória do hospedeiro e mecanismos pelos quais o vírus consegue ultrapassar essa resposta. Seguidamente, são abordados os seus mecanismos de transmissão e epidemiologia. Descreve-se a infeção aguda e crónica do vírus, incluindo os fatores de risco de progressão para doença crónica e são explicitados os mecanismos pelos quais ocorrem a fibrose, esteatose hepática e insulino-resistência associadas à infeção crónica. Apresentam-se ainda os mecanismos pelos quais pode haver progressão para hepatocarcinoma e são identificadas as manifestações extra-hepáticas da doença. Posteriormente é explicado como é feito o diagnóstico e analisados alguns aspetos mais relevantes relacionados com o tratamento, nomeadamente os seus objetivos, a avaliação pré-terapêutica, que doentes têm indicações para tratamento, os fármacos e regimes terapêuticos atualmente disponíveis. Salientam-se ainda quais os principais desafios para o futuro, descrevendo-se primeiro os grupos de doentes difíceis de tratar e principais dificuldades ainda existentes, referindo-se posteriormente aquilo que está a ser feito para responder a essas questões, designadamente quais os fármacos que se encontram em ensaios clínicos e o trabalho que está a ser realizado com o objetivo da criação de uma vacina.

ABSTRACT

The present work consists in a review of the concepts related to the pathophysiological mechanisms of hepatitis C, starting from a molecular virology perspective to a description of several therapeutical targets. It is given a description of the structure, viral life cycle, immune response of the host, and the mechanisms by which the virus is able to overcome this response. Next, its mechanisms of transmission and epidemiology are discussed. Acute and chronic infection of the virus, including risk factors for the development of chronic disease, are described and the mechanisms for which fibrosis, hepatic steatosis and insulin resistance associated with chronic infection occur. Mechanisms by which hepatocarcinoma may progress are identified and the extrahepatic manifestations of the disease are also presented. Subsequently it is explained how it is done the diagnosis and it is made an analysis of some aspects related to the treatment, including which are its objectives, the pre-therapeutic evaluation that is done, with the indications for treatment, the drugs and the therapeutic regimens used. The main challenges for the future are highlighted and unloaded, describing the difficult to treat patients group and the main difficulties that still exist, referring subsequently to what is being done to answer these questions, including current clinical trials, and what it is being performed with the goal of creating a vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

ABC: *ATP binding cassette*

ALT: alanina aminotransferase

apoA1: *apolipoprotein A1*

CERT: *ceramide transfer protein*

CG: crioglobulinas

CLDN1: claudina 1

CTL: linfócitos T citotóxicos

CTP: escala de Child-Turcotte-Pugh

CypA: ciclofilina A

DAA: *direct acting antiviral*

DC: célula dendrítica

DGAT1: diacilglicerol aciltransferase-1

DMV: *double membrane vesicles*

Ds: *double-stranded*

E6AP: *E6-associated protein*

ECM: matriz extracelular

EGFR: recetor do fator de crescimento epidérmico

EIA: *enzyme immune assay*

eIF: fator de iniciação eucariótica

EphA2: efrina A2

ER: retículo endoplasmático

FBL2: *F-box and leucine-rich repeat protein 2*

FoxO1: *forkhead box protein O1*

GDP: *guanosine diphosphate*

GTP: *guanosine triphosphate*

HBV: vírus da Hepatite B

HCV: vírus da Hepatite C

HIV: vírus de imunodeficiência humana

HLA: antigénio leucocitário humano

HO-1: heme oxigenase 1

HSC: células estreladas

HVR: *hypervariable region*

IDU: *injection drug use*

IFN: interferão

IP: inibidores da protease

IRES: local de entrada interno de ribossoma

IRF-3: *interferon regulatory factor 3*

IRS: recetor de insulina

ISG: genes estimulados com interferão

JAK: *Janus kinase*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

LD: *lipid droplet*

MAVS: *mitochondrial anti-viral signaling protein*

MDA5: *melanoma differentiation antigen 5*

MELD: *Model for End-Stage Liver Disease*

MF: miofibroblastos

miR-122: *microRNA-122*

MMP: metaloproteinases da matriz

MPGN: glomerulonefrite membranoproliferativa

MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*

MTP: proteína de transferência de triglicerídeos microssomal

MyD88: gene de diferenciação mielóide 88

NDQ-1: NADH Desidrogenase quinona 1

NHL: linfoma não Hodgkin

NK: *natural killer cells*

Nox: NADPH oxidase

NPC1L1: *Niemann Pick C-1 like 1*

NTR: regiões não traduzidas

OCLN: ocludina	SMS1 & 2: <i>sphingomyelin synthases 1 and 2</i>
ORF: <i>open reading frame</i>	SOCS-3: <i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
OSBP: <i>oxysterol binding protein</i>	SP: <i>cellular signal peptidase</i>
PA28 γ: <i>proteasome activator 28 gamma</i>	SPP: <i>cellular signal peptide peptidase</i>
PAMP: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>	SRB1: recetor de classe B scavenger tipo I
PBMC: <i>peripheral blood mononuclear cells</i>	SREBP-1c: proteína de ligação ao elemento regulador do esterol
PCT: porfiria cutânea tarda	STAT: <i>signal transducer and activator of transcription</i>
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas	STING: <i>stimulator of interferon gene</i>
PI4KIIIa: <i>fosfatidilinositol 4-quinase IIIa</i>	SVR: <i>sustained viral response</i>
PPARα: <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>	TFG: taxa de filtração glomerular
RAV: variantes associadas à resistência	TGF-β: fator de crescimento transformante β
Rb: proteína de retinoblastoma	TIMP: inibidores tecidulares de metaloproteinases
RBV: ribavirina	TLR: <i>toll-like receptors</i>
RdRp: RNA polimerase dependente de RNA	TNF: fator de necrose tumoral
RIG-1: <i>RNA helicases retinoic acid inducible gene-1</i>	Treg: linfócitos T reguladores
RLR: recetores RIG-I like	TRIF: <i>TIR-domain containing adapter inducing IFN-beta</i>
ROS: espécies reativas de oxigénio	VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade
RTK: recetores de tirosina-cinase	
SK-I/S1P: <i>subtilisin/kexin-isozyme-1 or site-1 protease</i>	

I. INTRODUÇÃO

Globalmente, a morbidade e a mortalidade atribuíveis à infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) continuam a aumentar. Aproximadamente 700 000 pessoas morrem por cada ano de complicações relacionadas com o HCV, tais como cirrose, carcinoma hepatocelular (HCC) e insuficiência hepática. (1)

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número de mortes por Hepatite C foi de 333 000 em 1990, 499 000 em 2010 e 704 000 em 2013. O aumento do número de mortes reflete a alta incidência de Hepatite C em meados do século XX, que se pensa ter aumentado dramaticamente a partir da década de 1940, devido ao aumento do uso de procedimentos parentéricos e uso de drogas injetáveis. A incidência diminuiu nos anos 90 após a descoberta do HCV, resultando na introdução do rastreio de sangue para o vírus, melhorias no controlo de infecção e práticas de injeção mais seguras entre IDU (*Injection Drug Users*). Apesar da diminuição da incidência, um grande número de pessoas que foram infetadas há 30-60 anos estão agora a morrer de cirrose e HCC causados pela infecção crónica do vírus, uma vez que estas complicações muitas vezes levam décadas para se desenvolver. Prevê-se que o aumento do número de mortos continue durante várias décadas a menos que o tratamento seja ampliado consideravelmente. (1)

Nos últimos anos têm surgido novas opções terapêuticas para a Hepatite C, que vieram revolucionar o tratamento desta patologia.

Para melhor compreendermos a sua forma de atuação, é feita uma descrição da estrutura, do ciclo de vida, mecanismos fisiopatológicos e mecanismos de evasão do vírus ao sistema imuno-inflamatório do hospedeiro.

Seguidamente é feita uma revisão das opções terapêuticas atualmente disponíveis e dos alvos terapêuticos em que atuam. São também descritos quais os fármacos que se encontram em estudo e são apresentados os desafios para o futuro através da referência aos alvos terapêuticos por explorar, ao que está a ser feito para tentar responder aos grupos de doentes de difícil tratamento, metodologias utilizadas para combater as resistências já descobertas para os fármacos disponíveis e o trabalho que está a ser desenvolvido com vista ao desenvolvimento de uma vacina.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizada uma revisão da literatura com recurso à base de dados Pubmed, b-on e às *guidelines* da “American Association for the Study of Liver Diseases”, “European Association for the Study of the Liver” e “World Health Organization”. Foi também consultado o livro “Harrison’s Principles of Internal Medicine, 19th edition”. Os artigos considerados relevantes por autores de artigos de revisão sobre a Hepatite C foram investigados e estudados. A estratégia de procura da base de dados Pubmed e b-on baseou-se na combinação de vários termos MeSH: “chronic hepatitis c”, “agents, antiviral”, “chronic hepatitis”, “human, viral, hepatitis”, “ cells, hepatic stellate”, “liver cirrhosis”, “viral envelope proteins”. Procurou-se restringir a pesquisa a artigos em inglês publicados há menos de 5 anos. Os critérios de pesquisa e inclusão dos estudos basearam-se no número de vezes que os artigos foram citados noutros trabalhos, procurando utilizar os artigos mais recentes e mais referenciados.

III. RESULTADOS

1. ESTRUTURA DO VÍRUS

O Vírus da Hepatite C (HCV) é um vírus de RNA (ácido ribonucleico) de cadeia simples de carga positiva de aproximadamente 9 600 nucleótidos de comprimento. Aproximadamente 10^{12} partículas virais são geradas diariamente em pacientes cronicamente infetados com HCV. Devido à elevada propensão a erros da RNA polimerase, o HCV também apresenta uma notável diversidade genética o que lhe confere capacidade de evasão ao sistema imunitário, bem como de criar mutações de resistência a fármacos. Existem 6 genótipos de HCV principais (numerados de 1 a 6) que variam em mais de 30% entre si na sequência de nucleótidos.

O genoma do HCV tem uma estrutura de ‘*open reading frame*’ (ORF), que consiste numa porção da cadeia de RNA que tem o potencial de ser traduzida, flanqueada por regiões não traduzidas (NTRs) nas extremidades 5' e 3'. (2) A NTR 5' contém um local de entrada interno de ribossoma de tipo III (IRES) que é o local onde se inicia a tradução do RNA viral. A ORF codifica uma poliproteína de aproximadamente 3 000 aminoácidos. Esta poliproteína é clivada após a tradução em dez proteínas diferentes (Fig. 1). (3)

As proteínas estruturais, que formam a partícula viral, incluem a proteína *core* (C) e as glicoproteínas de envelope E1 e E2. As proteínas não estruturais incluem a viroporina p7, a protease NS2, o complexo NS3-4A que possui atividade de protease e helicase, as proteínas NS4B e NS5A e a RNA polimerase dependente de RNA NS5B (RdRp) (Fig. 1). (4)

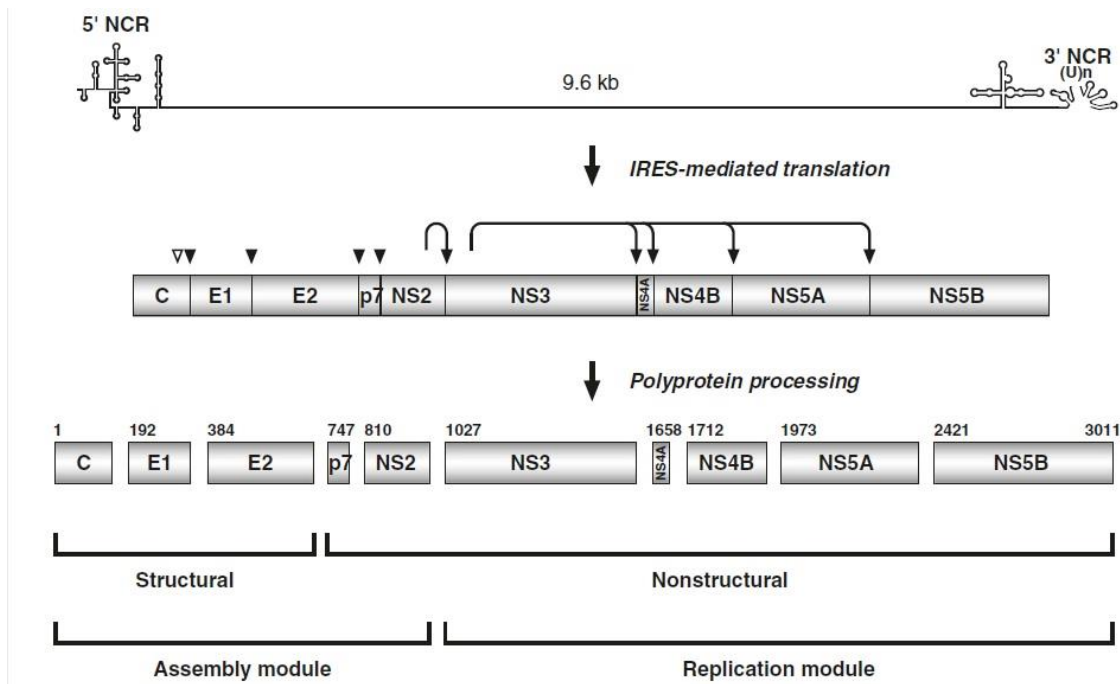


Figura 1: Organização genética e processamento de poliproteínas do HCV. O genoma de RNA de cadeia positiva de 9,6 kb é aqui representado. As estruturas secundárias de RNA simplificadas nas regiões não traduzidas 5' e 3' (NTR) assim como as regiões de codificação da proteína core e NS5B estão representadas. A tradução inicia-se no local de entrada do ribossoma interno (IRES) originando um precursor que consiste numa poliproteína que é processada originando assim as proteínas estruturais e não estruturais. Os números de aminoácidos são apresentados por cima de cada proteína. As pontas de seta pretas mostram os locais de clivagem pela peptidase do retículo endoplasmático. A ponta de seta branca indica uma clivagem adicional da proteína core por uma peptidase de sinal. As setas indicam clivagens pelas proteases NS2 e NS3-4A do HCV. Note-se que o processamento de poliproteínas, ilustrado aqui como um passo separado, ocorre durante e após a tradução. (4)

1.1. PROTEÍNAS ESTRUTURAIS

1.1.1. Proteína Core

A proteína core do HCV é a proteína que constitui a nucleocápside viral, que possui várias funcionalidades, incluindo ligação do HCV ao hepatócito, modulação imunológica, sinalização celular, potencial oncogénico e autofagia. (2) A proteína core tem uma função estrutural, uma vez que forma a cápside viral que contém o genoma do HCV. Além disso, a proteína core tem funções reguladoras participando na montagem de partículas de HCV e possui um papel na regulação da tradução do RNA do HCV. Além disso, investigações de expressão proteica mostram que a proteína core pode ser incluída em numerosas outras respostas celulares ao nível de sinalização celular, apoptose, metabolismo lipídico e carcinogénese. (5)

1.1.2. Glicoproteínas do envelope (E1, E2)

E1 / E2 do HCV são glicoproteínas de envelope glicosiladas que circundam as partículas virais. As glicoproteínas E1 e E2 do envelope assumem partes essenciais do ciclo de vida do HCV, incluindo a montagem da partícula infecciosa, a entrada do vírus e a fusão com a membrana dos endossomas. (4)

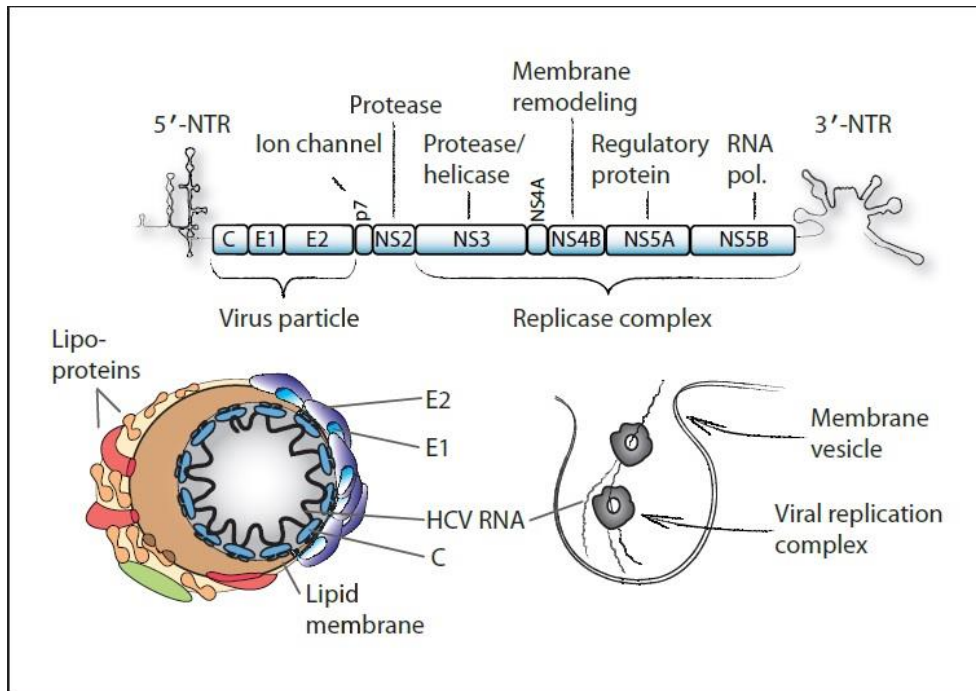


Figura 2: Organização do genoma do HCV. O RNA viral de cadeia positiva do HCV é representado em cima. As porções do genoma terminal 5' e 3' são regiões não traduzidas (NTRs) que se dobras em estruturas secundárias necessárias para a replicação e tradução do genoma. A poliproteína viral é representada a azul e codifica dez proteínas virais distintas que são libertadas por clivagem proteolítica mediada por proteases do hospedeiro e virais. As partículas de HCV incorporam tanto os fatores virais como as lipoproteínas derivadas do hospedeiro. (6)

1.2. PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS

1.2.1. p7

A proteína p7 (63 aminoácidos) está localizada entre as regiões E2 e NS2 do precursor da poliproteína. É uma proteína de membrana localizada no retículo endoplasmático onde forma um canal iônico. A proteína p7 não é crucial para a replicação do RNA, sendo que desempenha um papel essencial para a montagem e formação do vírus. (5) Uma possibilidade é que p7 atue suprimindo a acidificação de organelos intracelulares, protegendo assim as partículas víricas de mudanças conformacionais induzidas pelo ácido. Provavelmente a p7 atua em conjunto com a proteína core, E1 e E2, e NS2. (4)

1.2.2. NS2

NS2 é a autoprotease viral que desempenha um papel fundamental na montagem viral, mediando a clivagem entre NS2 e NS3. (2) Após a clivagem do NS3, o domínio protease de NS2 parece assumir uma parte fundamental no estágio inicial de montagem de novas partículas víricas, muito provavelmente através de interações com as glicoproteínas E1-E2 e complexos NS3 / NS4A. (5)

1.2.3. NS3

NS3 é uma proteína multifuncional de 70 kDa, com uma serina protease localizada no terço N-terminal e uma helicase nos dois terços C-terminais. (4) A protease NS3 desempenha um papel crítico no processamento do HCV, clivando a jusante de NS3 em 4 locais (entre NS3 / NS4A, NS4A / NS4B, NS4B / NS5A, NS5A / NS5B). (2) Para desenvolver a atividade completa da protease, o domínio de protease NS3 necessita de uma porção de NS4A. Durante a replicação viral, a porção C-terminal de NS3 tem atividade de helicase, catalisando a ligação e desenrolamento do genoma do RNA viral. (5)

1.2.4. NS4A

NS4A forma um complexo estável com NS3 e é um cofator para a protease NS3. (2) Esta pequena proteína também é responsável por um aumento significativo da estabilidade da proteína NS3. (5)

1.2.5. NS4B

NS4B é uma proteína de membrana que induz a formação da '*membranous web*', uma alteração de membrana específica que consiste na formação de vesículas membranosas que originam o complexo de replicação do RNA do HCV. NS4B interage com outras proteínas não-estruturais virais, tendo também um papel na montagem viral. (4)

1.2.6. NS5A

Pensa-se que múltiplos dímeros NS5A sejam responsáveis por transportar o RNA do HCV durante a replicação, embora o seu papel não seja ainda totalmente compreendido (4), uma vez que a NS5A está associada a várias outras proteínas celulares, o que torna difícil determinar as suas funções exatas. O NS5A do HCV parece desempenhar um papel chave na prevenção da apoptose mediada pelo *stress* oxidativo mantendo a célula hospedeira viva, permitindo assim que o vírus se continue a replicar. A NS5A é também um alvo interessante para o desenvolvimento de terapêuticas anti-HCV, devido às suas propriedades multifuncionais durante diferentes fases de replicação. (5)

1.2.7. NS5B

A replicação do HCV prossegue através da síntese de um RNA de cadeia negativa complementar utilizando o genoma do vírus inicial como molde, e a subsequente síntese de RNA de cadeia positiva a partir deste molde de RNA de cadeia negativa. A enzima chave responsável por estas etapas é a NS5B RdRp. (4) Durante a replicação do RNA do HCV, NS5B é um composto essencial do complexo de replicação de HCV dentro da ‘*membranous web*’ induzida pela NS4B. Semelhante a outras polimerases dependentes de RNA, a NS5B é uma enzima ‘*error-prone*’ que incorpora ribonucleótidos errados a uma taxa de aproximadamente 10^3 por nucleótido por geração. Ao contrário das polimerases celulares, o NS5B viral não tem um mecanismo de revisão que impeça a incorporação de ribonucleótidos errados. Estas propriedades enzimáticas em conjunto com a elevada taxa de replicação viral do HCV promovem a criação de uma grande variedade de quase-espécies virais e de resistências a fármacos. (5)

2. CICLO DE VIDA

2.1. ENTRADA

O modo de transmissão mais eficaz do HCV é o contacto direto sanguíneo, por exemplo através de transfusões de sangue, partilha de agulhas, transplante de órgãos e outros procedimentos invasivos. Além disso, as transmissões sexuais e de mãe para filho também foram descritas como responsáveis de transmissão de infeções por HCV. Quando o vírus entra na circulação sanguínea atinge a superfície basolateral das suas células hospedeiras, os hepatócitos. (5)

O ciclo de vida do HCV pode ser separado em quatro etapas: entrada do vírus; tradução de genomas e processamento de poliproteínas; replicação do genoma; e montagem e libertação de partículas a partir da célula hospedeira. O HCV, que é transmitido por via parentérica, entra no fígado através da corrente sanguínea. Nos sinusoides hepáticos, o vírus pode passar pelo endotélio fenestrado e entrar em contacto com a superfície basolateral de hepatócitos, células altamente especializadas do fígado parenquimatoso. A entrada na célula hospedeira do HCV é um processo complexo de múltiplos passos que requer numerosas proteínas de células hospedeiras. (6)

As partículas do HCV circulam fisicamente associadas com lipoproteínas tais como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), que contém componentes de proteína apolipoproteína (Apo) B-100 e apolipoproteínas E e C. O HCV chega aos hepatócitos ao entrar no espaço de Disse através do endotélio fenestrado entre células hepáticas endoteliais (Fig. 3). (7)

O ciclo de vida do HCV começa com a ligação de uma partícula vírica aos seus recetores específicos nos hepatócitos. Os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG), localizados na superfície dos hepatócitos, ligam-se à *hypervariable region 1* (HVR1) na glicoproteína E2 do HCV para iniciar a entrada do vírus no hepatócito (1-Figura 3). O recetor LDL (LDLR) liga-se com elevada afinidade da apolipoproteína E da partícula do HCV (2-Figura 3). Os recetores celulares conhecidos que iniciam a entrada dos vírus no hepatócito são o recetor de classe B scavenger tipo I (SRB1), a tetraespanina CD81, a proteína tight junction claudina-1 (CLDN1) e a ocludina (OCLN) (3, 5, 6, 7 - Figura 3). (8)

Os recetores de tirosina-cinases (RTK) incluindo o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e o recetor de efrina A2 (EphA2) medeiam a entrada do HCV (4-Figura 3) através de associações facilitadoras entre a CD81 e a CLDN1 que irão promover a fusão da membrana com as glicoproteínas do envelope viral. A CLDN1 é um componente de *tight-junctions* e que juntamente com o fator de entrada OCLN contribuem para o processo de entrada do HCV. (5,6-Figura 3). O fator de entrada recentemente identificado, Niemann Pick C-1 like 1 (NPC1L1), desempenha um papel importante na reabsorção de colesterol funcionando em equilíbrio com a secreção biliar de colesterol induzida pela proteína transporter ATP binding cassette (ABC) G5/8 e atua como cofator para a entrada de HCV (8-Figura 3). A fusão do envelope viral com membranas hospedeiras é o passo final da entrada do HCV (Fig. 3). (7)

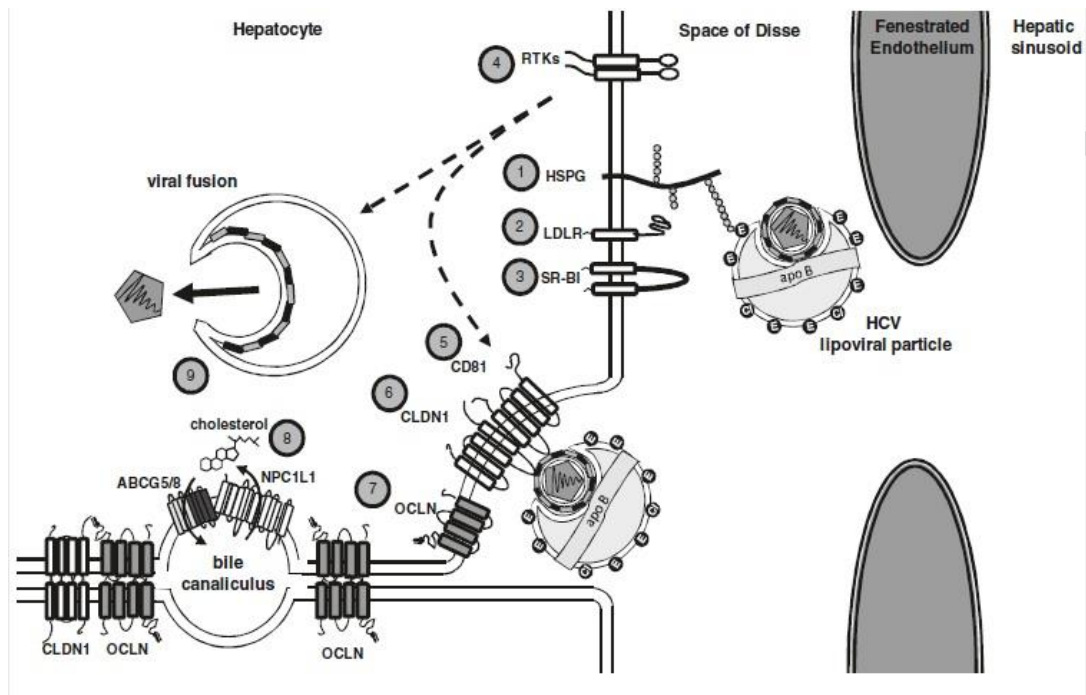


Figura 3: Entrada do HCV no hepatócito. HSPG: proteoglicanos de sulfato de heparano; LDLR: recetor de LDL; SRB1: recetor de classe B scavenger tipo I; RTK: recetor de tirosina-cinases; CD81: tetraespanina CD81; CLDN1: claudina 1; OCLN: ocludina; NPC1L1: *Niemann Pick C-1 like 1*; ABCG5/8: *ATP binding cassette G5/8*. (7)

2.2. TRADUÇÃO E PROCESSAMENTO DE POLIPROTEÍNAS

Após a ligação com o seu complexo recetor, o vírus entra no hepatócito e a nucleocápside é libertada no citoplasma. O vírus perde então a cápside e liberta o RNA genómico, que é utilizado tanto para a tradução como para a replicação da poliproteína no citoplasma. (9)

Ocorre então a tradução do vírus que é iniciada na porção 5' na região denominada IRES. O HCV, como muitos outros vírus, não possui um aparelho de tradução inerente e está então dependente de uma série de fatores das células hospedeiras para que ocorra a tradução. A falta de um aparelho próprio de tradução origina uma competição entre o RNAm (RNA mensageiro) do hospedeiro e o RNA viral para a utilização da maquinaria da célula hospedeira. Em resposta a esta competição, os vírus criaram um mecanismo que lhes confere uma vantagem relativamente ao hospedeiro que consiste na utilização desta região denominada IRES (Fig. 4). (10)

A ORF do genoma do HCV possui uma NTR em cada terminal. O 5'NTR consiste em quatro domínios distintos, I-IV. Os domínios II-IV formam a IRES envolvida na ligação ao ribossoma e iniciação subsequente da tradução. Estes domínios estruturais são responsáveis por fazer com que a subunidade 40S do ribossoma se ligue a esta região IRES para que se inicie a tradução (Fig. 4). (5)

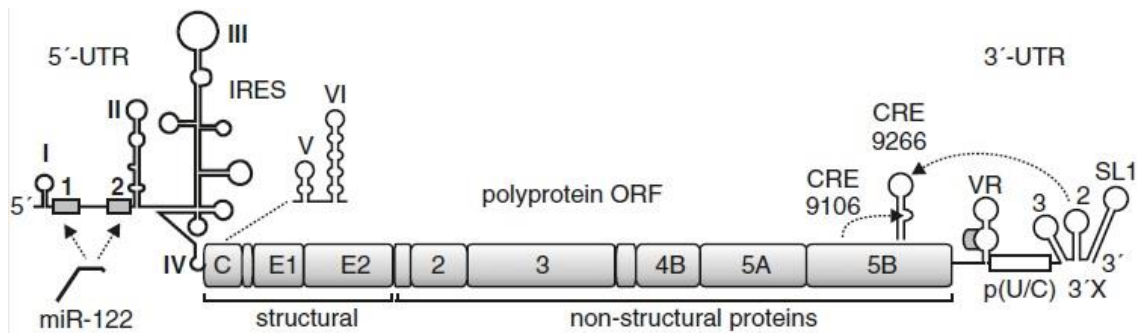


Figura 4: Estrutura do RNA do HCV com as 2 NTR (5' e 3'), a ORF central com a representação das proteínas estruturais e não estruturais e a IRES localizada na 5'-NTR com os seus domínios de I-IV. (11)

Para formar complexos ribossômicos de pré-iniciação que subsequentemente se reúnem em ribossomas 80S totalmente capazes de executar a tradução, a IRES do HCV requer apenas três fatores de iniciação: o fator de iniciação eucariótica (eIF) 3, eIF2 e eIF5 (Figura 5). (12)

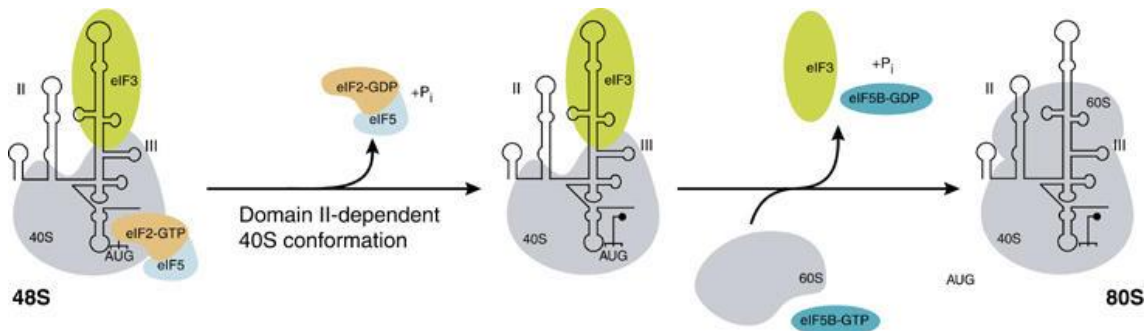


Figura 5: Formação do ribossoma na IRES para início da tradução. Estão representados os domínios II e III da IRES e a subunidade 40S e 60S do ribossoma. (12)

O domínio II de IRES do HCV modula a conformação da subunidade 40S do ribossoma para promover a hidrólise dependente de eIF5 de GTP (*guanosine triphosphate*) ligado a eIF2 e subsequente libertação de eIF2 / GDP (*guanosine diphosphate*). A libertação do fator eIF3 requer a hidrólise de eIF5 e GTP e ocorre durante a união da subunidade ribossomal 60S para formar o ribossoma 80S (Fig. 5). (12)

O genoma de RNA de cadeia positiva é traduzido no retículo endoplasmático por ribossomas hospedeiros gerando uma poliproteína. A poliproteína é então processada por proteases hospedeiras e virais nas dez proteínas estruturais (E1, E2, *core*) e não estruturais do HCV (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B). (6)

Além de vários outros fatores celulares que foram relatados como estando envolvidos na tradução do RNA do HCV, várias proteínas virais e regiões genômicas demonstraram aumentar ou inibir a síntese de proteínas virais. A poliproteína precursora é processada por pelo menos quatro peptidases distintas. A *celular signal peptidase* (SP) e a *celular signal peptide peptidase* (SPP) clivam na porção N-terminal a proteína *core*, E1, E2 e p7. (13)

Para além das duas peptidases celulares, o HCV codifica duas enzimas virais responsáveis pela clivagem das proteínas não estruturais de NS2 a NS5B dentro do precursor de poliproteína do HCV. A cisteína protease NS2 / NS3 dependente de zinco que consiste na proteína NS2 e na porção N-terminal de NS3 clivam autocataliticamente a junção entre NS2 e NS3, enquanto a serina protease NS3 cliva as restantes proteínas funcionais. Para a sua atividade a peptidase NS3 necessita de NS4A como um cofator. (5)

2.3. REPLICAÇÃO

A replicação do HCV ocorre dentro do complexo de replicação contendo as proteínas não estruturais virais e as proteínas celulares. (8)

O HCV requer a maioria das proteínas não estruturais mencionadas anteriormente para que ocorra a replicação. Em particular, NS3-NS5B são essenciais na formação do complexo de replicação associado à membrana intracelular, o que permite a produção de proteínas virais e RNA num compartimento distinto. (10)

A enzima chave para a replicação do RNA viral é a NS5B, uma RNA-polimerase dependente de RNA (RdRp) do HCV. Além desta, vários outros fatores tanto celulares como virais foram relatados como fazendo parte do complexo de replicação de RNA do HCV. (5)

O domínio helicase da proteína NS3 tem várias funções importantes para a replicação viral, incluindo fazer a ligação com o RNA e fazer o desenrolamento de regiões de RNA de estrutura secundária extensa. O NS4B inicia a formação do complexo de replicação que suporta a replicação do HCV. A proteína NS5A também desempenha um importante papel regulador na replicação do vírus. (9)

A expressão de proteínas não estruturais virais, particularmente da NS4B, resulta na indução de acumulações de vesículas, que foram designadas por '*membranous web*'. A análise de imunofluorescência da localização de proteínas não estruturais virais revelou uma distribuição semelhante a um retículo endoplasmático com estruturas pontilhadas distintas nestas células de replicação sendo que nestas regiões também se localiza o RNA viral recentemente sintetizado. Ao nível ultra-estrutural, estas estruturas em forma de ponto correspondem a acumulações de vesículas, que coram positivamente para proteínas não estruturais virais. É assumido que estas vesículas individuais dentro desta rede membranosa representem os sítios de replicação do RNA viral. (14)

É ainda assumido que as vesículas são invaginações de membrana do retículo endoplasmático (ER), que estão ligadas ao citoplasma por um pequeno poro permitindo a troca de pequenas moléculas impermeáveis à membrana, tais como nucleótidos para a síntese de RNA. (14)

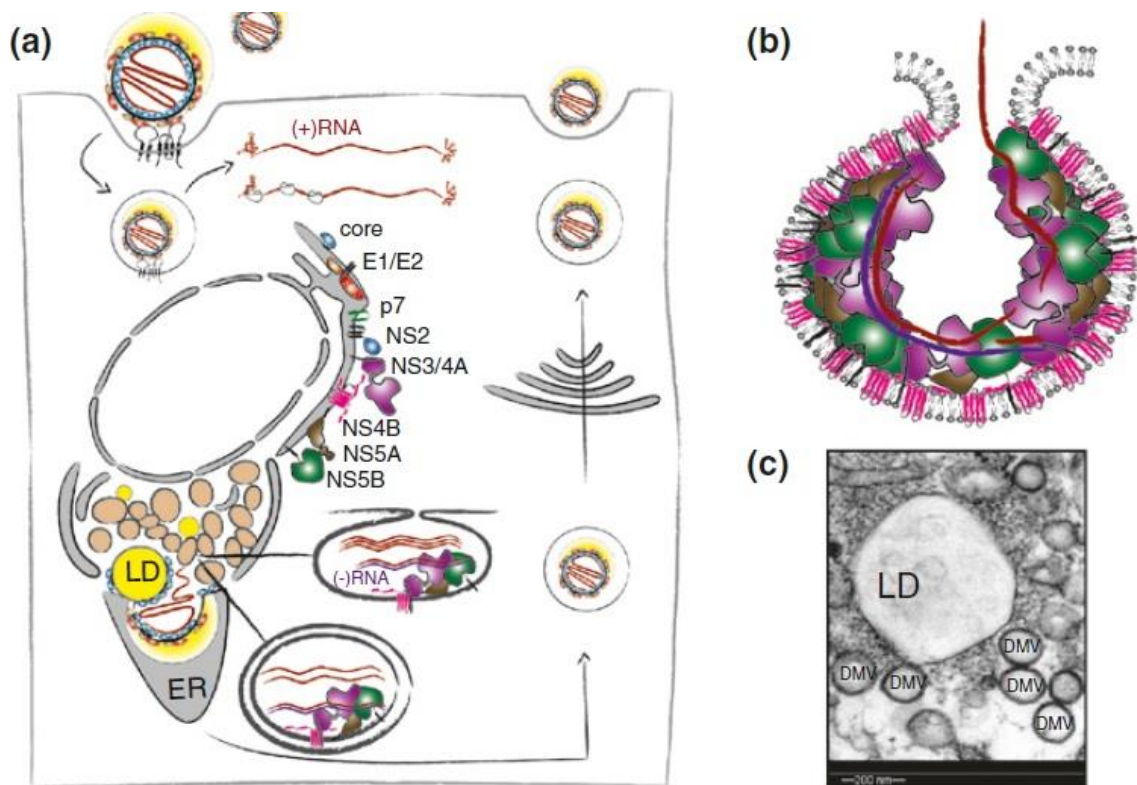


Figura 6: (a): Representação esquemática do ciclo de replicação do HCV. Estão indicadas diferentes subestruturas potenciais que abrigam os locais de replicação com base em evidências bioquímicas como mostrado em (b) e em *double membrane vesicles* (DMVs) detetadas recentemente por microscopia eletrônica (c). (b): modelo do complexo de replicação do HCV baseado em evidências bioquímicas. Várias cópias das proteínas não estruturais servem como componentes de uma estrutura vesicular, contendo provavelmente apenas um intermediário de replicação de carga negativa e várias novas cadeias de carga positiva recém-formadas. Um poro deve permitir o acesso de nucleótidos e à saída de RNA. (c): microscopia eletrônica de DMVs em células infectadas com HCV 16h após a infecção. *Lipid droplet* (LD). (14)

Esta '*membranous web*' serve como plataforma para os próximos passos de replicação viral de RNA. A RdRp utiliza o RNA de HCV de cadeia positiva genômica previamente libertado como um molde para a síntese de um RNA de cadeia negativa intermediária. Por sua vez, novamente com o auxílio da helicase NS3, a molécula de RNA negativa recentemente sintetizada serve como molde para a síntese de numerosos RNA de cadeia positiva. Esta cadeia positiva recém-formada pode vir a constituir novas partículas víricas de HCV ou então vir a ser novamente traduzida para gerar mais poliproteínas. (13)

Os fatores hospedeiros auxiliam na formação da '*membranous web*', na qual várias proteínas virais incluindo proteínas não estruturais NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B e fatores de hospedeiro montam o complexo de replicação do HCV. Entre os fatores de replicação do VHC mais proeminentes estão a ciclofilina A (CypA), a fosfatidilinositol 4-quinase IIIa (PI4KIIIa) e o microRNA-122 (miR-122). (6)

2.4. MONTAGEM E LIBERTAÇÃO DO VÍRUS

O início da montagem requer a libertação de cadeias de RNA replicadas a partir de locais especializados na '*membranous web*'. Estas cadeias devem então entrar em contacto com a proteína do *core* viral para formar as cápsides. (10)

Existem interações entre o HCV e os fatores reguladores dos lípidos durante a replicação e montagem do HCV. Em associação com PI4KIIIa, as proteínas virais induzem a formação da '*membranous web*' que forma complexos de replicação em associação com as *lipid droplets* (LD). (15)

A montagem das novas partículas víricas ocorre em LDs enriquecidas com proteínas *core* e com triglicéridos transportados pela diacilglicerol aciltransferase-1 (DGAT1). A proteína TIP47 é responsável por transportar o RNA do HCV de carga positiva recém-formado na *membranous web* juntamente com a proteína NS5A para as LD. A ApoE é responsável pela ligação com a proteína NS5A. O passo final da montagem da cápside consiste na fusão das membranas e passagem para o lúmen do retículo endoplasmático local onde também se dá a síntese das VLDL (Fig. 7). (15)

O HCV sai da célula utilizando a via de secreção das VLDL. Por este facto, as partículas víricas do HCV circulam na corrente sanguínea em complexo, ou seja, juntamente com lipoproteínas do hospedeiro. (6)

A síntese do VLDL é mediada pela *microsomal triglyceride transfer protein* (MTP) que é responsável pela transferência de lípidos para a apoB e para a apoE ligada a LD que se vão fundir e originar as VLDL. Há outros fatores envolvidos no metabolismo lipídico e na replicação, montagem e produção do HCV como o micro-RNA 122 (miR-122), as *sphingomyelin synthases 1 and 2* (SMS1 & 2), *F-box and leucine-rich repeat protein 2* (FBL2), *subtilisin/kexin-isozyme-1 or site-1 protease* (SK-I/S1P), *ceramide transfer protein* (CERT), *oxysterol binding protein* (OSBP), e a *apolipoprotein A1* (apoA1) (Fig. 7). (15)

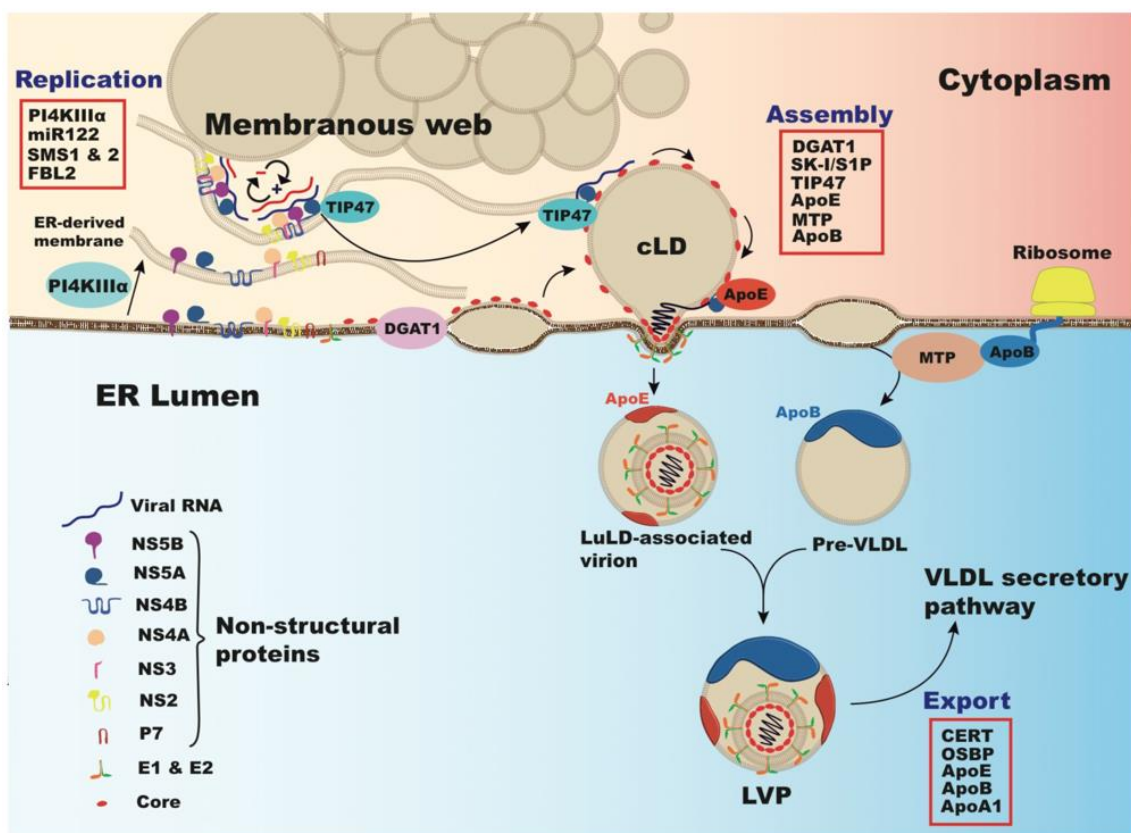


Figura 7: Formação e libertação do vírus. PI4KIIIα: *Phosphatidylinositol 4-kinase III α*; cLD: *cytosolic lipid droplets*; DGAT1: *diacylglycerol acyltransferase-1*; TIP47: *Tail interacting Protein of 47 kDa*; MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*; miR122: *micro-RNA 122*; SMS1&2: *sphingomyelin synthases 1 and 2*; FBL2: *F-box and leucine-rich repeat protein 2*; SK-I/S1P: *subtilisin/kexin-isozyme-1 or site-1 protease*; CERT: *ceramide transfer protein*; OSBP: *oxysterol binding protein*; apoA1: *apolipoprotein A1*. (15)

3. RESPOSTA IMUNO-INFLAMATÓRIA AO HCV

3.1. IMUNIDADE INATA

Para se defender contra agentes invasores patogénicos, as células do hospedeiro contam com recetores citoplasmáticos e membranares para detetar ácidos nucleicos ou proteínas virais. Dentro destes recetores estão incluídos a família dos *toll-like receptors* (TLR), os recetores RIG-I like (RLR) e os sensores de RNA viral. Todas estas famílias de recetores estão implicadas no reconhecimento de muitos vírus por parte do hospedeiro. A jusante destes sensores estão as proteínas adaptativas que dão início a múltiplas cascatas de sinalização celular. Os TLRs possuem o gene de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e o *TIR-domain containing adapter inducing IFN-beta* (TRIF) como moléculas efetoras. Os RLRs utilizam o *mitochondrial antiviral signaling protein* (MAVS) que se localiza na membrana mitocondrial das células do hospedeiro, e vários sensores de ácidos nucleicos incluindo o *stimulator of interferon genes* (STING). (16)

A replicação do genoma do HCV origina intermediários de *double-stranded* (ds) RNA, os principais *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dos vírus de RNA. O facto da replicação do RNA ocorrer na ‘*membranous web*’ não só facilita a ação da RNA polimerase NS5B como também protege os intermediários ds RNA da resposta imunitária do hospedeiro. (17)

O RNA viral utiliza o sistema RIG-I resultando na sinalização via MAVS que ativa o fator de transcrição *Interferon regulatory factor 3* (IRF-3) e promove a transcrição de interferão (IFN) do tipo 1. Simultaneamente, o dsRNA contacta com o recetor TLR3 sendo que este utiliza a proteína TRIF para ativar o IRF-3. (Fig. 8) (18)

As infecções virais são percebidas pela via dos receptores TLR ou pela ligação do RNA viral às *RNA helicases retinoic acid inducible gene-1* (RIG-1) e *melanoma differentiation antigen 5* (MDA5). Ambas as vias convergem na ativação dos fatores de transcrição chave NF-KB e IRF 3 e 7. A ativação do IRF-3 e do NF-KB promove a transcrição de IFN tipo I e III. Todos os tipos de IFN induzem uma resposta antiviral pela ativação da transcrição de centenas de genes. (19)

Os hepatócitos são assim participantes ativos nas respostas imunitárias inatas autônomas das células que podem suprimir agentes patogênicos e também pela ativação das vias de morte celular. (18)

As respostas imunes inatas são a primeira linha de defesa contra infecções virais e os IFNs são as citocinas centrais responsáveis pela indução de um estado antiviral nas células e pela ativação e regulação dos componentes celulares da imunidade inata. Os IFNs de Tipo I (compreendendo vários IFN- α e um IFN- β) e IFNs de tipo III (IFN κ 1, - κ 2 e - κ 3, também designados por IL29, IL28A e IL28B) são produzidos por células infectadas com vírus e por células chave do sistema imune inato: macrófagos e células dendríticas (DCs) (Fig. 8). (20)

Os IFNs de tipo I e de tipo III induzidos por vírus podem subsequentemente ativar a expressão de um número de genes estimulados com IFN (ISGs) antivirais através da via de sinalização *Janus Kinase / Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT). Como o HCV é um vírus capaz de causar infecção persistente, ele desenvolve múltiplas estratégias para antagonizar a indução de sinalização imune inata, bem como a ação antiviral de efetores inatos (Fig. 8). (17)

Uma vez produzidos, os IFNs são secretados pela célula e agem de forma autócrina ou parácrina para promover a sinalização antiviral. Os IFN de Tipo I ligam-se a um recetor constituído por IFNAR1 e IFNAR2, enquanto que os IFN de tipo III se ligam a um recetor IL10-R2 (também conhecido como IL10RB) e IL28RA. A ligação de IFN ao recetor resulta no recrutamento das cinases JAK1 e TYK2. A ativação de cinases leva à fosforilação e subsequente dimerização de STAT1 e STAT2. Os heterodímeros STAT1 / STAT2 associam-se com IRF9 para formar o complexo ISGF3, resultando na transcrição de numerosos genes estimulados com interferão (ISGs). Estes genes facilitam tanto a depuração do vírus a partir de células infetadas como a proteção de células vizinhas, não infetadas, de partículas virais futuras. Eles também recrutam células imunológicas efetoras para o local de infeção e promovem a resposta imune adaptativa (Fig. 8). (16)

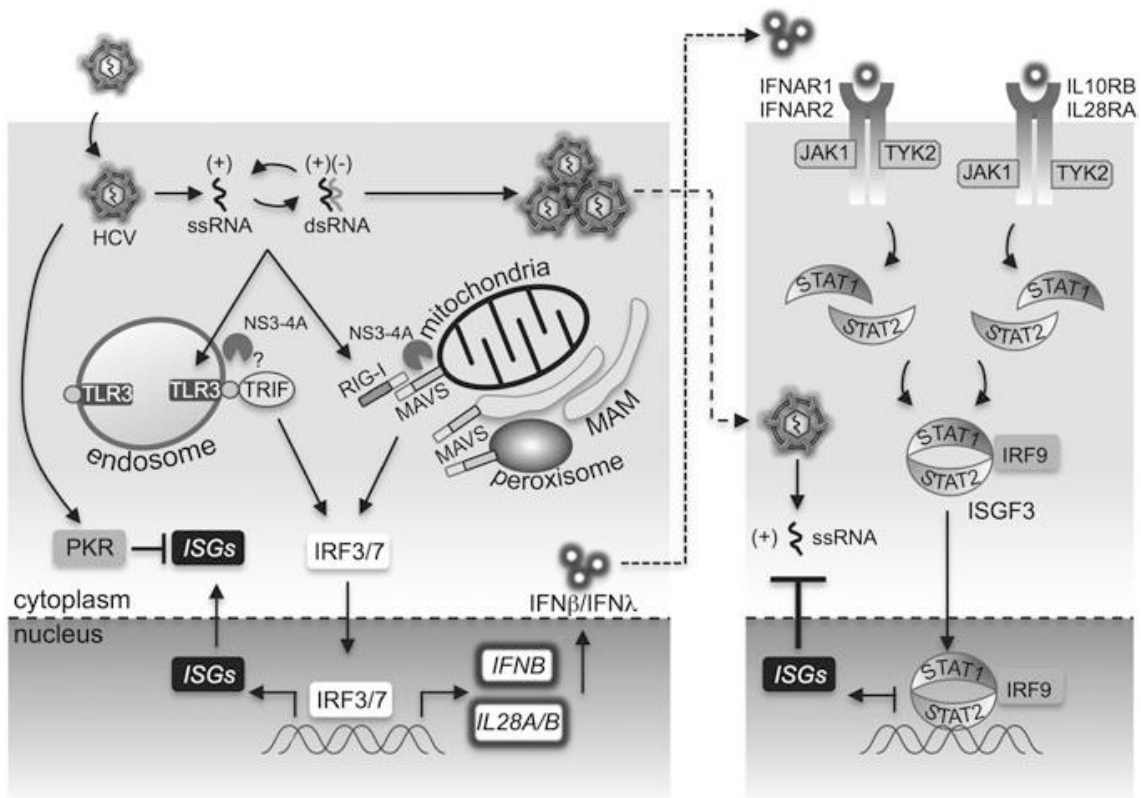


Figura 8: Resposta imunitária inata ao HCV. ssRNA: *single-stranded RNA*; dsRNA: *double-stranded RNA*; TLR3: toll-like receptor 3; TRIF: *TIR-domain containing adapter inducing IFN-beta*; RIG-I: *retinoic acid inducible gene-1*; MAVS: *mitochondrial anti-viral signaling protein*; IRF3/7: *Interferon regulatory factor 3/7*; ISG: *Interferon-Stimulated Gene*; PKR: *Protein kinase R*; JAK: *Janus Kinase*; STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*; TYK: *Tyrosine Kinase*. (16)

O HCV desenvolveu mecanismos para neutralizar a resposta imune do hospedeiro. De facto, a confirmação de que o RIG-I constituía um sensor primário de HCV baseou-se principalmente na análise da inativação da sinalização RIG-I através da clivagem de MAVS pela protease NS3-4A do HCV. A NS3-4A tem atividade de serina protease a qual contribui para o processamento de poliproteína do HCV e é necessária para a replicação do vírus. A atividade de protease da NS3-4A também cliva o MAVS das membranas mitocondriais em que normalmente se encontra, evitando deste modo a sinalização mediada por RIG-I e IRF3 (Fig. 8). (16)

Um estudo recente mostrou que o HCV era capaz de antagonizar as vias de IFN a jusante promovendo a fosforilação da proteína cinase dependente de RNA (PKR), um efector constitutivamente expresso e induzido por interferão com ampla atividade antiviral. Em células infectadas com HCV, a fosforilação de PKR resulta em subsequente inativação do fator de iniciação da tradução eucariótica eIF2a. O resultado é uma diminuição na tradução de RNAm de ISG antiviral com aumento concomitante na resistência do HCV aos efeitos do IFN (Fig. 8).

(16)

Os ISGs antivirais são considerados os principais efetores da resposta imunitária. Nos últimos anos, foram feitos progressos no sentido de identificar e caracterizar quais entre as muitas centenas de ISGs contribuem para a supressão da infecção pelo HCV. (16) Verificou-se que os ISG anti-HCV atuam em diferentes fases do ciclo de vida do HCV, incluindo a entrada, a tradução e a replicação de RNA. Deve-se notar, entretanto, que o mecanismo de ação para muitos dos ISGs anti-VHC relatados ainda está para ser descoberto. (19)

Há uma hipótese amplamente aceita de que o sistema IFN funciona de forma conjunta, com múltiplos ISGs contribuindo para a resposta antiviral. De facto, quando os ISG anti-HCV são laboratorialmente selecionados, os seus efeitos combinados são tipicamente maiores do que o efeito de qualquer dos genes sozinhos. (16)

3.2. IMUNIDADE ADAPTATIVA

A resposta imune adaptativa desempenha um papel central na infecção pelo vírus da Hepatite C. De facto, a depuração viral espontânea está associada a uma resposta de anticorpos neutralizantes precoce, bem como respostas de células T CD4+ e CD8 + específicas para HCV vigorosas e sustentadas. Na infecção persistente por HCV, contudo, todos os componentes da resposta imune adaptativa antiviral falham devido a diferentes estratégias de evasão viral. (21)

Apenas uma minoria dos indivíduos infetados com HCV conseguem a eliminação espontânea do vírus, que é o resultado da atividade de células T CD4+ e CD8 + intra-hepáticas e do sangue periférico, específicas para antígenos estruturais e não estruturais de HCV. (22)

A barreira definitiva para o controlo da infecção pelo HCV é a imunidade adaptativa. Esta resposta tem dois componentes para combater o HCV: a resposta imune celular e a resposta humoral.

A resposta imunitária celular efetua-se por linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8+ específicos para o vírus e linfócitos T helper CD4+, que desempenham um papel efetor e regulador, respetivamente. Estas células T participam na eliminação viral do HCV pela morte direta de células infetadas ou pela produção de fatores solúveis que são capazes de eliminar o vírus de uma forma citolítica ou não citolítica. (23)

A imunidade humoral consiste na produção de anticorpos contra epítopos das proteínas estruturais e não estruturais do HCV. A maioria, no entanto, não tem atividade antiviral relevante, e apenas uma pequena fração de anticorpos é capaz de inibir o vírus. (20)

Os anticorpos dirigem-se a epítomos localizados principalmente dentro das glicoproteínas do envelope E1 e E2. Um dos epítomos neutralizantes mais estudados está localizado na região hipervariável 1 (HVR1) de E2. No entanto existe uma elevada variabilidade de quase-espécies virais nesta região, que é uma consequência da replicação pela *'error-prone'* RNA polimerase NS5B. Este mecanismo tem sido um dos principais motivos pelos quais ocorre evasão viral da resposta imune humoral do hospedeiro. (21)

A resolução precoce da infecção por HCV foi associada a um desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, enquanto a infecção persistente foi associada a uma indução retardada desses anticorpos. É importante notar, no entanto, que a depuração viral também pode ocorrer na ausência de anticorpos neutralizantes e mesmo em pacientes agamaglobulinémicos, indicando que os anticorpos neutralizantes não têm necessariamente um papel essencial na depuração do HCV. (21)

Durante a infecção aguda por HCV ocorrem múltiplas respostas por células T CD4+ e CD8+ com a produção de IFN- γ intra-hepático. A função protetora dos linfócitos T CD4+ parece ser devida à produção de citocinas antivirais mas também pela sua função estimuladora e promotora das repostas por linfócitos T CD8+. A eliminação do vírus foi observada e está relacionada com a proliferação de linfócitos T CD4+ com produção de IL-2 e IFN- γ . Tem que haver uma resposta sustentada inicial dos linfócitos T CD4+ para que ocorra a eliminação precoce do vírus. Na infecção crónica pelo vírus da Hepatite C não se verificam estas respostas por parte das células T CD4+. (23)

Estes dados suportam o conceito de que as células T CD8+ específicas do HCV são as principais células efetoras antivirais, enquanto as células T CD4+ específicas do HCV têm importantes funções auxiliares e ajudam a prevenir a fuga do vírus à resposta das células T CD8+. (16)

Os fatores mais importantes que contribuem para a eliminação espontânea do HCV são tanto o número como a atividade de células T CD8+ específicas para o vírus. A sua função antiviral é baseada na citotoxicidade contra células infectadas com HCV e na secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibidoras de vírus, em particular o IFN- γ . Durante a fase aguda precoce, em indivíduos que eliminam o vírus, a função secretora destas células é temporariamente inibida, seguida pela sua restauração. Simultaneamente, as células T CD4+ específicas para o HCV estimulam as células T CD8+ através da secreção de citocinas como a IL-6, IFN- γ , TNF. (22)

A citotoxicidade pode ser mediada por recetores tais como o FAS (proteína transmembranar pertencente à família dos fatores de necrose tumoral) e seu ligando FAS-L ou por fatores secretores parácrinos tais como a perforina. As células T CD8+ específicas para o HCV contribuem também para o controlo viral por mecanismos não citolíticos, por exemplo, através da secreção de citocinas antivirais tais como interferão-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). (16)

A polimerase de HCV tem alta taxa de replicação o que permite uma fuga viral rápida a partir de respostas imunes humorais e celulares emergentes, levando a infeção persistente. Essa alta taxa de replicação do vírus e a falta de um mecanismo de controlo na RNA polimerase NS5B que induz a criação de mutações constituem os principais mecanismos de evasão à resposta imunitária adaptativa do hospedeiro. (23)

As interações de glicoproteínas do HCV com lipoproteínas e com o recetor scavenger B1 (SR-B1) protegem as partículas do HCV dos anticorpos neutralizantes. Outro importante mecanismo de evasão de anticorpos neutralizantes é a transmissão direta célula-célula que pode contribuir fortemente para a propagação viral no fígado infectado. (21)

Os mecanismos essenciais da disfunção de células T ou anergia de células T específicas de HCV são: (1) maturação anormal de células T CD8+. Conseqüentemente, as células T CD8+ específicas para HCV apresentam-se num estado imaturo, sendo menos citotóxicas e exibindo síntese diminuída de IFN- γ ; (2) atividade desregulada de células T reguladoras que modulam a atividade de células T CD4+ e CD8 + segregando IL-10; e (3) imunossupressão por proteínas virais e material genético responsável pela atividade diminuída de células dendríticas, T e NK (*natural killer cells*), e (4) alto nível de expressão de *programmed death 1 receptor* em células T CD8+ resultando no esgotamento de células específicas de memória (Fig. 9). (22)

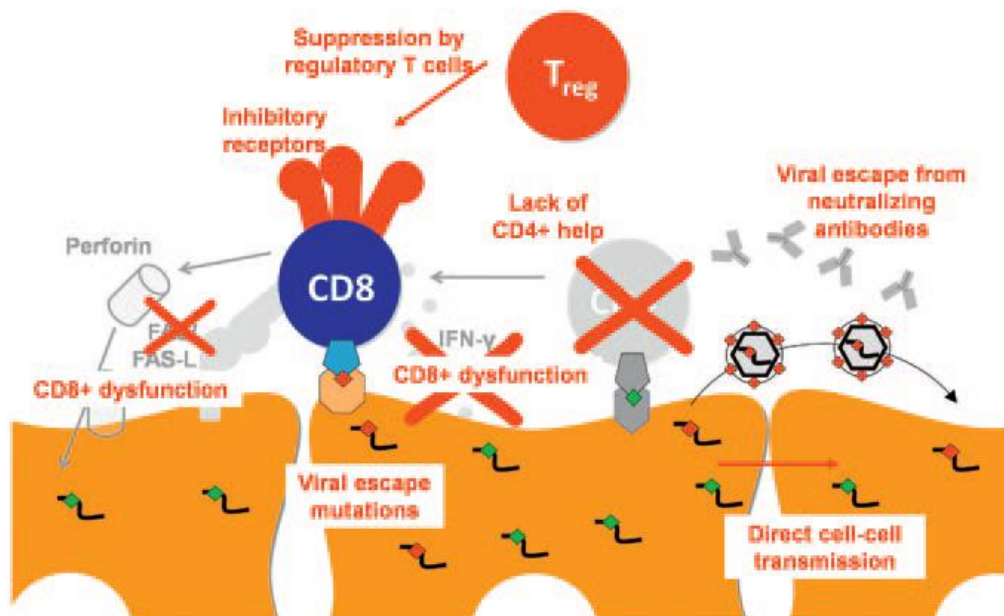


Figura 9: Mecanismos de disfunção da resposta imune adaptativa. FAS: proteína transmembranar pertencente à família dos fatores de necrose tumoral e o seu ligando FAS-L; IFN- γ : *interferon gamma*; Treg: linfócito T regulador. (21)

4. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS E PATOGENIA

4.1. TRANSMISSÃO

Com cerca de 170 milhões de indivíduos infetados em todo o mundo, representando 3% da população mundial, o HCV é a principal causa de hepatite crónica. A transmissão do HCV ocorre principalmente através do contacto de produtos sanguíneos. Qualquer prática ou atividade que envolva exposição a sangue contaminado pode potencialmente levar à infeção por HCV. A maioria dos doentes com infeção crónica por HCV foi infetada através de transfusão com sangue ou produtos sanguíneos contaminados com HCV, via *injection drug use* (IDU) ou através de exposição sexual, embora a transmissão por contacto sexual seja baixa. A transmissão vertical do HCV de uma mãe infetada para o seu filho pode ocorrer durante o parto. No entanto, a transmissão ocorre apenas entre as mulheres que são RNA HCV positivo no momento do parto, e o risco de transmissão neste cenário é relativamente baixo. Apenas cerca de 5% dos recém-nascidos de mães positivas para HCV são infetados. (24)

4.2. EPIDEMIOLOGIA

Os 6 genótipos principais do HCV diferem uns dos outros em 30-33% ao nível de nucleótidos, enquanto os subtipos dentro de um genótipo diferem entre 20-25%, e os isolados ou quase-espécies dentro de um subtipo têm sido estimados em diferir em menos de 10%. (25)

A distribuição de genótipos e subtipos de HCV varia substancialmente em diferentes partes do mundo. O genótipo 1 é o mais comum, representando 46,2% de todas as infeções por HCV, seguido pelo genótipo 3 (30,1%). A diversidade de genótipos também varia sendo que a maior diversidade é observada na China e no Sul da Ásia Oriental, enquanto em alguns países, como o Egito e a Mongólia, quase todas as infeções pelo HCV são devidas a um único genótipo (Fig. 10). (1)

O Subtipo 1a está distribuído pelos Estados Unidos e Norte da Europa, enquanto o subtipo 1b está amplamente distribuído em todo o mundo e é um subtipo principal no Japão. Os subtipos 1a e 1b estão presentes na maioria dos pacientes infetados. O genótipo 2 está presente essencialmente nas mesmas regiões do genótipo 1, no entanto o número de indivíduos afetados é menor. O subtipo 3a está amplamente distribuído no sul da Ásia e Oceânia, enquanto o subtipo 3b é encontrado principalmente na Ásia Oriental. O genótipo 4 está distribuído principalmente no Médio Oriente, África central e Europa. Este genótipo contém muitos subtipos, com poucos exemplos de cada um. O genótipo 5a está presente maioritariamente na região Sul de África mas os dados relativamente à distribuição deste genótipo são ainda algo limitados. O genótipo 6 está distribuído principalmente por todo o leste e sudeste da Ásia. Um novo genótipo, que foi identificado num imigrante no Canadá proveniente do Congo, foi classificado como subtipo 7a. Evidências filogenéticas indicam que se trata de um novo genótipo, embora ainda não tenham sido publicadas informações detalhadas. (25)

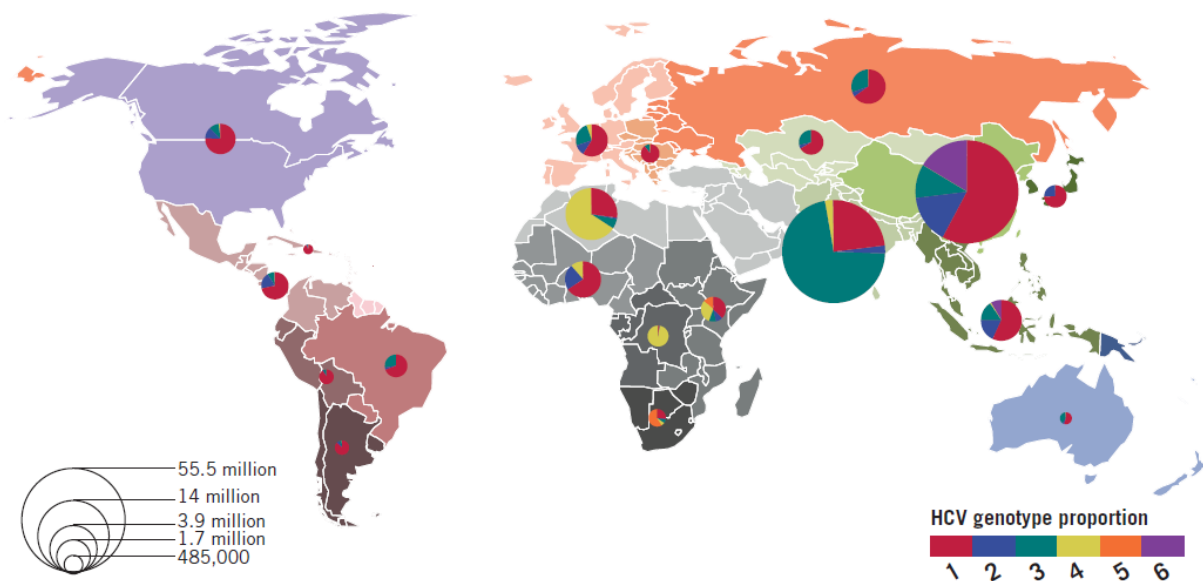


Figura 10: Distribuição mundial dos vários genótipos da Hepatite C. (1)

A maioria dos pacientes que se apresentam como novos casos nos países desenvolvidos é IDU e homossexual. Estimativas da incidência anual indicam que três a quatro milhões de pessoas são infectadas por ano e 700 000 pessoas morrem anualmente de causas relacionadas com o HCV. A doença aguda é clinicamente leve e tipicamente não reconhecida e, portanto, é apenas raramente diagnosticada, particularmente naqueles que progridem para a hepatite crónica. Após seis meses de persistência de RNA de HCV no sangue, a infeção é definida como crónica. (26)

4.3. HEPATITE C AGUDA

A Hepatite C aguda apresenta-se geralmente sem sintomas e a maioria das pessoas desconhece a infecção. Aproximadamente 15 a 30% são sintomáticos sendo que os sintomas mais comuns são fadiga, letargia, mialgia e anorexia. Menos de 1% dos casos apresentam icterícia. O RNA do vírus da Hepatite C é normalmente detetável cerca de 2 semanas após a infecção e o anticorpo específico para o HCV cerca de 12 semanas após a exposição. Os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) geralmente aumentam cerca de 8-10 semanas após a infecção, com o pico de ALT variando entre 10 a 20 vezes o limite superior do normal. Curiosamente, à medida que a doença progride, os níveis séricos de RNA do HCV podem flutuar, e até mesmo tornarem-se negativos, reaparecendo posteriormente. (27)

Em alguns pacientes, a infecção pelo HCV é uma doença autolimitada, e o RNA do HCV torna-se indetetável na maioria desses casos cerca de três a quatro meses após o início da infecção aguda. Infelizmente, a depuração espontânea do HCV ocorre apenas numa minoria de casos estimando-se que cerca de 70% dos pacientes adultos progridem para uma infecção crónica. (28)

As taxas de resolução espontânea da Hepatite C aguda podem ser maiores, 45-50%, em determinadas populações, por exemplo, em indivíduos que apresentam icterícia em comparação com indivíduos assintomáticos, em pessoas infetadas em idade mais jovem e mulheres. Mais recentemente, certos polimorfismos próximos ao gene IL28B, que codifica para o interferão lambda, um interferão tipo III, mostraram estar associados a taxas mais elevadas de depuração espontânea da infecção pelo HCV. Fatores virais também parecem afetar a resolução da infecção, e em pessoas com recuperação de Hepatite C aguda foi encontrada uma menor diversidade genética do vírus, em comparação com aqueles que evoluíram para infecção crónica. (27)

4.4. HEPATITE C CRÓNICA

A infecção persistente por HCV está tipicamente associada a alterações inflamatórias crónicas no fígado. À medida que a doença progride, ao longo de um período de anos a décadas, a arquitetura do fígado é alterada e a sua função inexoravelmente diminuída. As alterações fibróticas estão geralmente confinadas à região peri-portal no início do processo da doença, mas com a progressão da doença há extensão para a área centrolobular com a formação de “pontes” fibróticas entre regiões porta adjacentes. Numa proporção significativa de pacientes infetados, o processo culmina em cirrose franca. A cirrose geralmente desenvolve-se silenciosamente, tornando-se sintomática apenas num estadio tardio do seu desenvolvimento, e é inerentemente pro-carcinogénica. Os indivíduos com cirrose associada à Hepatite C apresentam assim um risco particularmente elevado de desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC). O *stress* oxidativo é um aspecto importante da patogénese do HCV e pode resultar diretamente da expressão de proteínas virais, bem como da inflamação relacionada com o reconhecimento imunológico do vírus. Do mesmo modo, as alterações no metabolismo intra-hepático dos lípidos, a esteatose e resistência à insulina têm sido atribuídas como consequências do vírus. (29)

4.4.1. Fatores de risco de progressão para doença crónica

Muitos fatores do hospedeiro, virusais e ambientais, têm sido identificados como responsáveis por definir o resultado da progressão da Hepatite C. A maioria dos fatores hospedeiros e virusais não é modificável e há poucas medidas para atenuar o seu efeito. Em contraste, todos os fatores ambientais são modificáveis e os clínicos devem aconselhar os pacientes a evitar esses fatores, com a possível exceção da cafeína. (27)

A taxa de progressão para infecção crónica pelo HCV é afetada por muitos fatores, incluindo a idade no momento da infecção, sexo, etnia e o desenvolvimento de icterícia durante a infecção aguda. (30)

Os fatores virais incluem o genótipo e as mutações virais. (24)

Os fatores de hospedeiro incluem a raça, idade, sexo, co-infecção com o vírus de imunodeficiência humana (HIV) ou vírus da Hepatite B (HBV), obesidade, álcool, antígeno leucocitário humano (HLA) e interleucina-28 (IL-28) e o genótipo. A taxa de cronicidade na infecção por HCV parece ser menor em indivíduos mais jovens. (7) A depuração do HCV é menos comum em pessoas de raça negra. As mulheres tendem a eliminar o HCV mais rapidamente, têm uma taxa mais baixa de progressão da doença, e uma menor taxa de mortalidade de doença hepática associada ao HCV do que os homens. (24)

Estudos epidemiológicos identificaram a idade avançada, presença de diabetes, obesidade, índice de massa corporal, hiperlipidemia, consumo de álcool, níveis elevados de ALT, inflamação hepática, fibrose e genótipo 3, como fatores associados à presença de esteatose em biópsia realizada nos pacientes com Hepatite C crónica. A esteatose em pessoas com Hepatite C crónica está fortemente relacionada com a síndrome metabólica, mas também com a infecção pelo próprio vírus, particularmente o genótipo 3 do HCV. A acumulação de gordura no fígado mostrou afetar negativamente o resultado da Hepatite C crónica. A esteatose hepática tem sido sugerida como um promotor para o desenvolvimento de fibrose e acelerar a progressão para a cirrose e aumentar o risco de HCC. (27)

A Hepatite B aguda num doente com Hepatite C crónica pode ser mais grave. A Hepatite B crónica pode estar associada a uma diminuição da replicação do HCV em oposição aos doentes monoinfetados com HCV, embora o HCV predomine normalmente. No entanto, a lesão hepática é geralmente pior e a progressão é mais rápida em doentes com a co-infecção HBV/HCV. (31)

Transaminases hepáticas elevadas são amplamente utilizadas como um marcador para a inflamação intra-hepática. Portanto, não é surpreendente que os níveis séricos elevados de ALT durante a Hepatite C crónica estejam associados a um risco aumentado de progressão da fibrose hepática. Menores taxas de progressão da fibrose foram observadas em pacientes com níveis normais de ALT. No entanto, enzimas hepáticas normais não excluem a possibilidade de progressão da fibrose. (28)

O álcool aumenta a replicação do HCV, acelera a lesão hepática e a progressão para infeção crónica. Mesmo quantidades moderadas de álcool aumentam o risco de fibrose. Consequentemente, em doentes alcoólicos com cirrose e insuficiência hepática foi descrita uma elevada prevalência de anticorpos anti-HCV. Assim, o consumo de álcool deve ser evitado em todos os pacientes com Hepatite C crónica, já que não é conhecido um valor mínimo de ingestão de álcool que possamos considerar seguro. (24)

O consumo de café tem sido associado a um menor risco de doença hepática avançada, cirrose e carcinoma hepatocelular em pacientes com doença hepática crónica. Entre os indivíduos com Hepatite C crónica, o consumo diário de cafeína superior a 408 mg/dia (equivalente a 3 chávenas/dia) foi associado a um risco menor de progressão de doença. Ainda não está claro se é o café, a cafeína ou algum outro componente do café que é responsável pelos efeitos benéficos sobre a doença hepática. (27)

4.4.2. Fibrose

A fibrose é um processo complexo que envolve muitas vias e tipos celulares (macrófagos, células NK, células estreladas (HSC, *hepatic stellate cells*). Existem muitas vias pró-fibrogénicas em diversos tecidos (fígado, pulmões, coração) as quais representam respostas à lesão tecidual. O HCV leva a lesão no hepatócito e à iniciação de cascatas inflamatórias que acabam por resultar na deposição excessiva de matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) no espaço de Disse. Os mediadores, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformante β (TGF- β) e a interleucina-13, gerados pela lesão celular e as células imunitárias recrutadas, incluindo as células *natural killer* (NK), linfócitos T reguladores (Treg) e células de Kupffer, ativam precursores mesenquimatosos e estimulam a sua diferenciação em miofibroblastos (MF). As HSC também se podem tornar ativas após a fagocitose de corpos apoptóticos de hepatócitos infetados pelo HCV (Fig. 11). (32)

As HSC quiescentes que se encontram no fígado transformam-se em miofibroblastos proliferativos e contrácteis. Os MFs predominam na matriz extracelular hepática e derivam principalmente de HSCs. (29)

A ativação das HSC depende da sinalização por células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos e plaquetas. A deposição de proteínas da matriz extracelular é constantemente contrariada pela sua degradação havendo habitualmente um equilíbrio. Na fibrose hepática progressiva, este equilíbrio é desviado a favor do excesso de deposição de matriz extracelular. As metaloproteinases da matriz (MMP) e seus reguladores, os inibidores tecidulares de metaloproteinases (TIMPs) controlam a deposição e degradação da matriz. (33)

Os TIMPs são inibidores que se ligam a MMPs impedindo a degradação da matriz extracelular e diminuindo a apoptose de HSC. Os polimorfismos do TIMP-1 e TIMP-2 correlacionam-se com a progressão mais rápida da fibrose em pacientes com HCV. (32)

Múltiplas vias conduzem à ativação das HSC incluindo as células T *natural killer* (NKT), e as citocinas IL-8 e TGF- β 1 segregadas por Tregs, e TGF- β 1 e IL-1 β segregadas pelas células de Kupffer. O TGF- β 1 secretado por hepatócitos infectados amplifica a ativação das HSC. Isto promove a proliferação e migração das HSC. Existe também uma maior deposição de matriz extracelular. A perda de fenestrações inerente a este fenómeno fibrótico impede o fluxo de plasma para os hepatócitos (Fig. 11). (32)

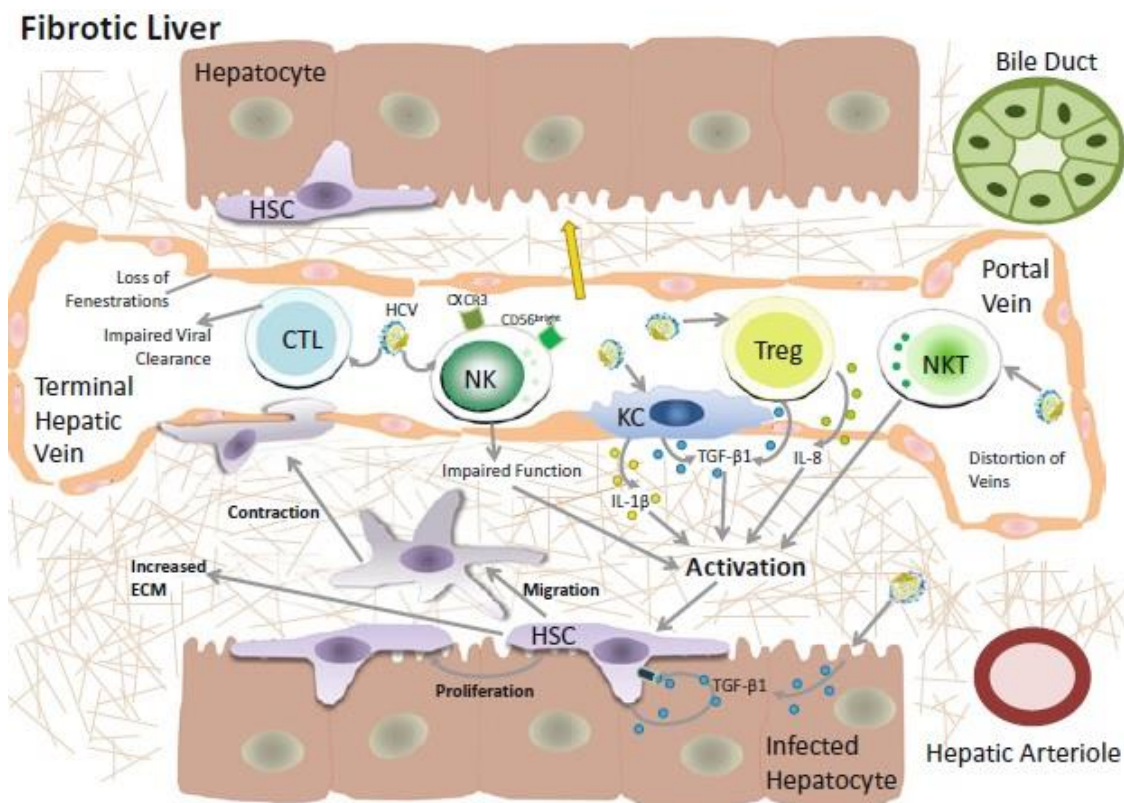


Figura 11: Mecanismo fisiopatológicos da fibrose. CTL: linfócito T citotóxico; NK: *natural killer*; KC: célula de Kupffer; Treg: linfócito T regulador; NKT: célula T *natural killer*; HSC: célula estrelada; CXCR3: recetor de quimiocina CXC3. (32)

4.4.3. Esteatose hepática e insulino-resistência

A resistência à insulina aumenta a libertação periférica e a captação hepática de ácidos gordos, resultando na acumulação de lípidos no fígado. Outra via responsável pelo desenvolvimento desta insulino-resistência envolve a supressão da atividade da proteína de transferência de triglicerídeos microsossomal (MTP) pela proteína *core* do HCV. Isso, por sua vez, reduz a secreção de VLDL do fígado, aumentando os níveis de triglicerídeos no fígado. Outra via envolve a proteína de ligação ao elemento regulador do esterol (SREBP-1c), que regula os níveis de produção de triglicerídeos e fosfolípidos. Assim, a conjugação de todas estas vias resulta no desenvolvimento de esteatose hepática em pacientes com Hepatite C. A esteatose exacerba a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e acelera a progressão da doença hepática. (34)

A esteatose resulta numa maior lipogénese, maior estabilidade das LD, diminuição da secreção de lipoproteínas e alteração da função mitocondrial. A proteína *core* que se localiza nas LDs retarda o seu *turnover* e provoca dessa forma a sua acumulação no citoplasma (Fig. 12). O aumento da transativação de SREBP-1 pela proteína *core* ocorre através de uma forma dependente do *proteasome activator 28 gamma* (PA28 γ) no núcleo, e da ativação dependente de fosforilação ativada por ROS de SREBP-1 através da via PI3K-Akt-mTOR. (Fig. 12). O PA28 γ também suprime a degradação dependente do proteassoma da proteína *core* pela E6-associated protein (E6AP), mantendo uma abundância elevada de proteína de núcleo no citoplasma (Fig. 12). O *stress* oxidativo induzido pela proteína *core* ocorre através de lesão mitocondrial por interações com a membrana externa mitocondrial, por ativação de NADPH oxidase (Nox) dependente ou independente de TGF- β 1, ou por ativação persistente de *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR α) (Fig. 12). A redução da oxidação de ácidos gordos resultante da lesão mitocondrial também contribui para o aumento da sua acumulação (Fig. 12). (29)

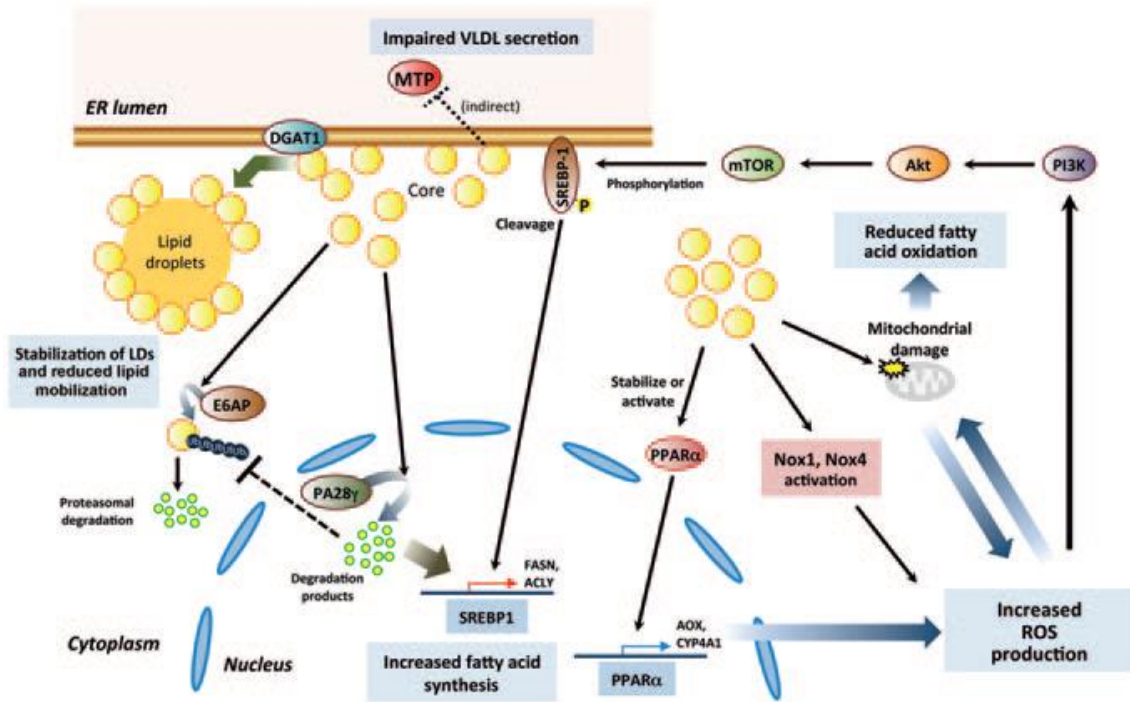


Figura 12: Mecanismo da esteatose induzida pelo HCV. MTP: *microsomal triglyceride transfer protein*; DGAT1: *Diacylglycerol O-acyltransferase 1*; E6AP: *E6-associated protein*; PA28 γ : *proteasome activator 28 gamma*; SREBP1: *Sterol regulatory element-binding protein 1*; PPAR α : *peroxisome proliferator-activated receptor*; Nox: *NADPH oxidase*; ROS: *reactive oxygen species*; PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*; Akt: *serine/threonine-specific protein kinase*; mTOR: *mechanistic target of rapamycin*. (29)

O fator de necrose tumoral (TNF)- α , cujos níveis se correlacionam estreitamente com as extensões de inflamação hepática e fibrose em pacientes crônicos com Hepatite C aumenta a captação de glicose nos tecidos periféricos e promove a gliconeogênese no fígado, levando à indução de resistência a insulina. (34)

A via de sinalização da insulina decorre normalmente através da via recetor de insulina (IRS)-PI3K-Akt que conduz à inibição da transcrição mediada pela *Forkhead box protein O1* (FoxO1) facilitando a translocação citosólica do fator de transcrição do núcleo após a sua fosforilação em Ser319 (Fig. 13). A proteína *core* pode interferir com a sinalização de IRS-1/2 através do aumento da degradação proteasomal mediada pela *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS-3), por regulação positiva da síntese de TNF α na forma dependente de PA28 γ ou por indução de produção persistente de ROS devido a lesão mitocondrial resultando na ativação de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (Fig. 13). Por sua vez, JNK fosforila 14-3-3, que se vai ligar ao FoxO1, facilitando o seu movimento para o núcleo e subsequente ativação da transcrição mediada por FoxO1, o que conduz à gliconeogênese. Assim, a transcrição de FoxO1 é regulada principalmente por uma via independente de Akt no contexto de infeção por HCV. O TNF α diminui a fosforilação de tirosina de IRS-1 aumentando a expressão de PTP-1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) e a atividade de S6K1 (*Ribosomal protein S6 kinase beta-1*) mediada por JNK1 / 2 e IKK β (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*), que fosforila IRS-1 e assim interfere com a transdução de sinal mediada pela fosforilação da tirosina (pY) (Fig. 13). A fosforilação da tirosina do IR é normalmente mantida em níveis baixos por ROS endógenos produzidos por mitocôndrias ou NADPH oxidases, que oxidam a cadeia beta do IR e induzem a sua autofosforilação. A disfunção das mitocôndrias associada à infeção pelo HCV pode desativar estas funções reguladoras normais (Fig. 13). (29)

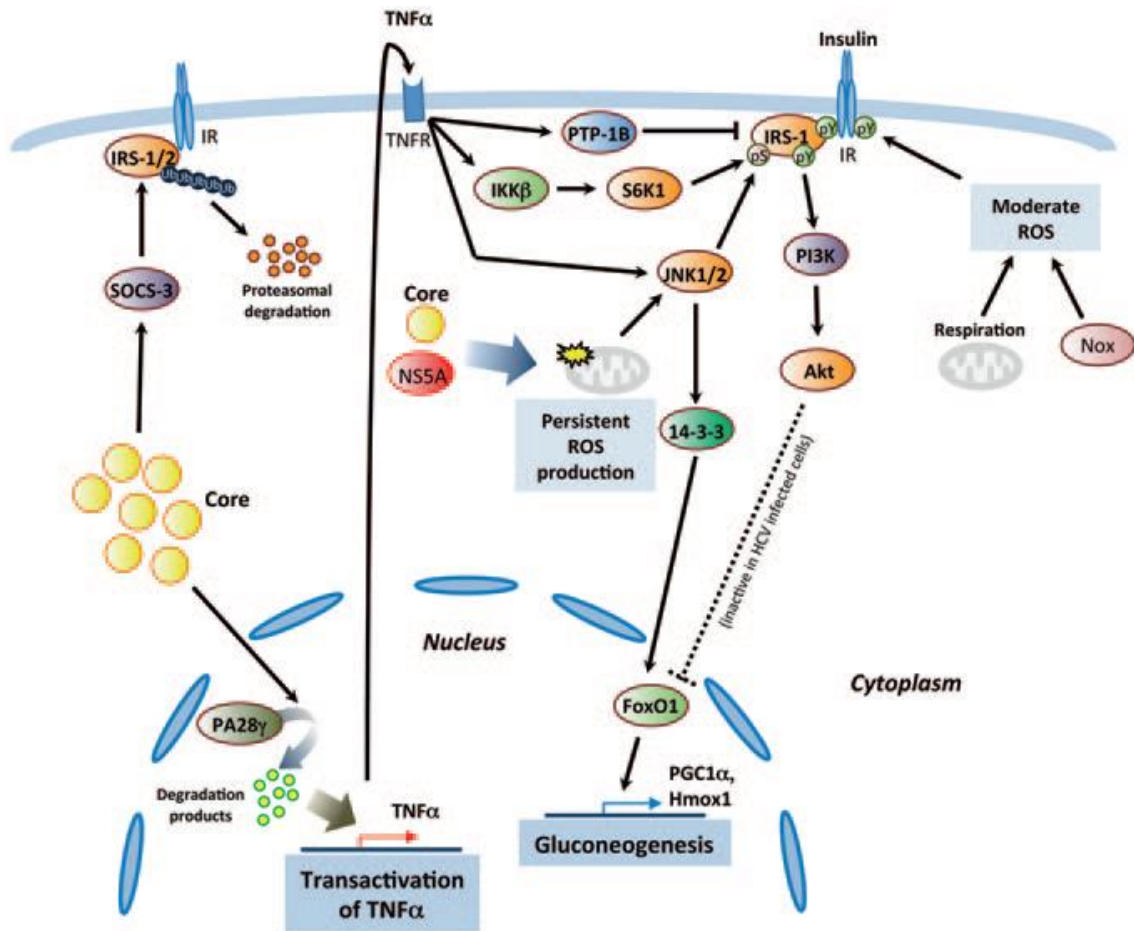


Figura 13: Interações com a sinalização da insulina. IRS: recetor de insulina; SOCS-3: *Suppressor of cytokine signaling 3*; FoxO1: *Forkhead box protein O1*; JNK: *c-Jun N-terminal kinase*; PTP-1B: *protein-tyrosine phosphatase 1B*; S6K1: *Ribosomal protein S6 kinase beta-1*; IKK β : *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*. (29)

O *stress* oxidativo é causado pela proteína core do HCV que perturba a função da membrana mitocondrial e gera subsequentemente ROS. A nível molecular, um dos mecanismos caracterizados explica que o *core* do HCV interage com a proibitina, e assim interfere com a sua atividade de manutenção dos potenciais *redox* na cadeia de transferência de eletrões mitocondrial. Por outro lado, o sistema antioxidante celular é comprometido pela proteína *core* viral, que afeta especialmente antioxidantes chave como heme oxigenase 1 (HO-1) e NADH Desidrogenase quinona 1 (NDQ-1). Assim, a infeção hepática por HCV não só estimula a produção de ROS mas também antagoniza o sistema antioxidante, exacerbando o *stress* oxidativo que facilita o desenvolvimento de HCC. (35)

4.4.4. Hepatocarcinoma

Na população infetada pelo HCV poucas pessoas progridem para cirrose e HCC nos estadios finais. A história familiar de hepatocarcinoma induzido por hepatite viral está significativamente associada ao aumento do risco de HCC, especialmente em familiares de primeiro grau. Estes factos enfatizam a importância do envolvimento regulador dos antecedentes genéticos do hospedeiro na progressão da doença associada ao HCV e na formação de HCC. Por exemplo, a mutação somática do gene *TP53*, um gene supressor tumoral, é um dos eventos mais frequentemente observados no HCC. O *stress* oxidativo a longo prazo, e a produção de ROS, podem induzir danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, que favorecem a ocorrência de mutações no gene *TP53* que aumentam o risco de hepatocarcinogénese. No entanto, o sexo feminino, as respostas imunitárias reativas, os anticorpos neutralizantes do soro e a genética do hospedeiro, têm sido associados à remoção bem-sucedida e espontânea da infeção aguda por HCV. Por exemplo, um dos fatores genéticos interveniente nessa remoção e que se encontra bem caracterizado é o gene *IL28B*, cujo polimorfismo genético localizado a montante da ORF está fortemente correlacionado com a depuração espontânea de HCV. O gene *IL28B* codifica um interferão de tipo III conduzindo a respostas antivirais mais ativas para a erradicação do HCV. (35)

Outra proteína celular habitualmente mutada nos pacientes com HCC é a proteína supressora de tumor de retinoblastoma (Rb). A associação de Rb com NS5B resulta no recrutamento da ubiquitina ligase E6AP, aumentando a degradação do Rb mediada pelo sistema ubiquitina-proteossoma. Esta degradação do Rb pode ser importante para o desenvolvimento de HCC, uma vez que a perda de Rb é um evento chave para promover a tumorigénese. A proteína Rb é importante na regulação do ciclo celular e requerida para certos pontos de controlo do ciclo celular, pelo que a sua perda, como resultado da expressão de NS5B, pode tornar o hepatócito infetado mais vulnerável a lesões no DNA. (29)

A ingestão de álcool aumenta o nível de *stress* oxidativo no fígado, explicando potencialmente a sinergia entre o álcool e a infecção pelo HCV na carcinogénese hepática. Como discutido anteriormente, a esteatose também se correlaciona com um risco aumentado de HCC no doente infetado com HCV representando um contributo importante para o *stress* oxidativo.

Assim, é muito provável que o surgimento do HCC represente o resultado dos processos patogénicos descritos anteriormente que levam a disfunções no metabolismo lipídico, esteatose, inflamação e fibrose. (29)

4.4.5. Manifestações Extra-hepáticas da doença

Em muitos pacientes infetados com HCV, a crioglobulinémia é subclínica, mas a incidência desta complicação extra-hepática, a crioglobulinémia mista essencial (EMC), é maior nos pacientes infetados com o HCV. Aproximadamente 80-90% dos pacientes EMC estão infetados com HCV. Os sintomas clínicos da EMC incluem púrpura, artralgia e insuficiência renal, com etiologia numa glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN). (34)

As crioglobulinas (CGs) são classificadas em três tipos com base na clonalidade. As CGs tipo II e tipo III, constituídas por imunoglobulinas monoclonais e/ou policlonais, são prevalentes em pacientes com infecção crónica pelo HCV, enquanto as CGs tipo I, constituídas exclusivamente por componentes monoclonais, são predominantemente encontradas em pacientes com doenças linfoproliferativas (mieloma múltiplo, linfoma B, macroglobulinemia de Waldenström). (36)

A supressão da replicação viral resulta numa melhoria significativa na crioglobulinémia e na vasculite associada, o que suporta a existência de uma relação causal entre a infecção e a EMC. Para o tratamento dos pacientes com vasculite grave, incluindo GN com insuficiência renal, é utilizado o anticorpo anti-CD20 rituximab. (29)

Uma variedade de estudos epidemiológicos sugerem que os pacientes que são seropositivos para anti-HCV estão em risco significativamente aumentado de desenvolver linfoma não Hodgkin (NHL), particularmente NHL de células B. Este risco é maior em pacientes infetados com HCV com EMC e vasculite. (29)

O papel do HCV na génese do linfoma pode ser explicado pelos efeitos diretos da replicação do vírus em células B normais ou por ser um processo inflamatório que induz um aumento da proliferação de células B. (36)

A glomerulonefrite constitui uma rara complicação extra-hepática da infeção crónica por HCV. As manifestações predominantes são GN proliferativa membranosa crioglobulinémica ou não crioglobulinémica e GN mesangioproliferativa. Muito menos comum é a nefropatia membranosa. A lesão glomerular é causada principalmente por uma deposição de imunocomplexos circulantes constituídos por anticorpos anti-HCV, antígenos de HCV e fatores do complemento. Proteínas de HCV em estruturas glomerulares e tubulointersticiais são imuno-histologicamente detetáveis em aproximadamente 70% dos pacientes com HCV crónico. (36)

Vários distúrbios cutâneos têm sido esporadicamente associados à infeção crónica por HCV. Estudos epidemiológicos confirmaram a existência de uma forte correlação entre a forma esporádica de porfiria cutânea tarda (PCT) e o HCV, embora a presença de HCV em pacientes com PCT pareça estar sujeita a fortes fatores endémicos. De facto, a prevalência de HCV em doentes com PCT é superior a 50% em Itália, e é de apenas 8% na Alemanha. (36) A PCT é uma doença adquirida, os pacientes exibem fotossensibilidade e lesões hepáticas causadas pela atividade reduzida da uroporfirinogénio descarboxilase do fígado. (34)

Evidências de uma associação estreita entre o HCV e o líquen plano foram fornecidas por estudos realizados no Japão e no Sul da Europa, mas estas observações não se aplicam a todas as regiões geográficas. O HLA-DR6 foi reconhecido como um fator predisponente importante para o desenvolvimento de líquen plano em doentes com HCV. Uma hipótese sugere que a flutuação geográfica do HLA-DR6 é responsável pela prevalência diversa do líquen plano entre os pacientes com HCV. (36)

A síndrome de Sjögren manifesta-se por um conjunto de sinais e sintomas caracterizado por insuficiente produção de lágrimas pelas glândulas lacrimais e insuficiente produção de saliva pelas glândulas salivares, causada pela infiltração de linfócitos, o que por sua vez provoca xerostomia e xeroftalmia. Uma associação entre a síndrome de Sjögren e certas infecções virais é conhecida desde há muito tempo e alguns estudos indicam que até 45% dos pacientes positivos para anticorpos anti-HCV poderão ter síndrome de Sjögren. (34)

Distúrbios neuropsiquiátricos leves e perda da função cognitiva também ocorrem em alguns pacientes com Hepatite C crónica na ausência de encefalopatia hepática devido a causas metabólicas ou depressão franca. (29)

O vírus tem um efeito neurotóxico direto entrando no SNC através das *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs). Este efeito neurotóxico direto pode ser acompanhado por um efeito neurotóxico indireto induzido por uma inflamação sistémica que se traduz no aumento das citocinas pró-inflamatórias durante muitos anos de infeção. Estas citocinas podem atravessar a barreira hematoencefálica e contribuir para distúrbios cognitivos. Estudos mais recentes indicam que as células endoteliais microvasculares cerebrais servem como um local preferencial de tropismo e replicação do HCV e que a alteração da barreira hematoencefálica pode levar à ativação da microglia e à entrada de citocinas inflamatórias. (36)

Dos pacientes com HCV, 35-68% sofrem de fadiga crónica, comprometimento cognitivo sub-clínico e desaceleração psicomotora. Os sintomas de depressão são evidentes em 2-30% dos pacientes infetados e alguns estudos sugerem uma neurotransmissão alterada. Além disso, a deficiência significativa de triptofano é detetável em pacientes com infeção crónica pelo HCV. A deficiência de serotonina derivada do triptofano é suscetível de favorecer uma ocorrência de transtornos depressivos. (36)

5. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

5.1. DIAGNÓSTICO

Quando se suspeita de Hepatite C aguda, a presença de anticorpos anti-HCV e RNA de HCV deve ser testada. O teste de anti-HCV sozinho é insuficiente para o diagnóstico de Hepatite C aguda porque os anticorpos específicos de HCV aparecem apenas semanas (até 6 meses) após a transmissão viral. Em contraste, as concentrações serológicas de RNA de HCV mensuráveis surgem nos primeiros dias após a infeção. No entanto, o RNA do HCV pode flutuar durante a Hepatite C aguda, tornando necessário um segundo teste de RNA, várias semanas mais tarde, em todos os doentes com uma suspeita de Hepatite C aguda. (37)

A Hepatite C crónica deve ser considerada em todos os doentes com sinais clínicos, morfológicos ou biológicos de doença hepática crónica. Quando se suspeita de Hepatite C crónica, o rastreio de anticorpos contra HCV por *enzyme immune assay* (EIA) de 2ª ou 3ª geração é adequado, porque a sua sensibilidade é superior a 99%. Os resultados falsos negativos podem ocorrer raramente em doentes imunodeprimidos (co-infetados por HIV) e em doentes em diálise. Quando os anticorpos anti-HCV são detetados, a presença de RNA de HCV tem de ser determinada por forma a discriminar entre a Hepatite C crónica e a infeção HCV resolvida. (37)

Recomenda-se a realização de um teste de HCV para pessoas nascidas entre 1945 e 1965, sem verificação prévia do risco. Outras pessoas devem ser rastreadas quanto aos fatores de risco para a infecção pelo HCV, e um teste único deve ser realizado em todas as pessoas com comportamentos, exposições e condições associadas a um risco aumentado de infecção por HCV. O uso de drogas injetáveis (atuais ou prévias, incluindo aqueles que injetaram apenas uma vez) ou o uso de drogas ilícitas intranasais são considerados comportamentos de risco. Entre as exposições ao risco, as pessoas em hemodiálise de longa duração, as pessoas com exposição percutânea / parenteral em ambiente não regulado, os profissionais de saúde, de emergência médica e de segurança pública, após a exposição a sangue infetado com HCV, recetores anteriores de transfusões ou transplantes de órgãos, incluindo pessoas que receberam sangue de um doador que posteriormente testou positivamente para infecção por HCV, que receberam transfusão de sangue ou componentes sanguíneos ou foram submetidos a transplante de órgãos antes de julho de 1992, ou que receberam fatores de coagulação produzidos antes de 1987. (38)

5.2. TRATAMENTO

O objetivo do tratamento do HCV é a *sustained viral response* (SVR), definida como a ausência de RNA de HCV detetável pelo menos 12 semanas após a conclusão do tratamento. A SVR é um marcador para a cura da infecção pelo HCV e demonstrou ser durável, em estudos prospectivos, em mais de 99% dos pacientes seguidos por 5 anos ou mais. (38)

5.2.1. Avaliação pré-tratamento

Na avaliação pré-tratamento, a relação causal entre infecção por HCV e doença hepática deve ser estabelecida, a gravidade da doença hepática deve ser avaliada, e os parâmetros virológicos de base que serão úteis para adaptar a terapia devem ser determinados. É necessário procurar outras causas de doença hepática ou fatores que sejam suscetíveis de afetar a história natural ou progressão da doença e opções terapêuticas. Todos os pacientes devem ser testados para outros vírus hepatotrópicos, particularmente o HBV e o HIV. O consumo de álcool deve ser confirmado e quantificado, e deve ser dado aconselhamento específico para parar qualquer consumo. Devem ser avaliadas as possíveis comorbidades, incluindo alcoolismo, doença cardíaca, insuficiência renal, autoimunidade, doenças hepáticas genéticas ou metabólicas (por exemplo, hemocromatose hereditária, *diabetes mellitus* ou obesidade), e a possibilidade de hepatotoxicidade induzida por fármacos. (39)

As considerações de pré-tratamento mais importantes para a seleção do regime de *direct acting antiviral* (DAA) são (1) genótipo e subtipo; (2) a presença ou ausência de cirrose e, se cirrose, então uma determinação do seu grau pela escala de Child-Turcotte-Pugh (CTP); e (3) qualquer histórico prévio de experiência de tratamento.

A cirrose hepática pode ser estadiada clinicamente. Um sistema de estadiamento confiável é a classificação de Child-Pugh modificada, com um sistema de pontuação de 5-15: scores de 5 e 6 representam Child-Pugh classe A (consistente com cirrose compensada), scores de 7-9 representam classe B, e pontuações de 10-15 representam a classe C. A pontuação de Child-Pugh é um preditor razoavelmente confiável de sobrevivência em muitas doenças hepáticas e prevê a probabilidade de complicações maiores da cirrose, como sangramento de varizes e peritonite bacteriana espontânea. (40)

Tabela 1: Sistema de classificação de Child-Pugh.

		Pontuação		
Critério	Unidades	1	2	3
Bilirrubina Sérica	µmol/L	<34	34-51	>51
	mg/dL	<2.0	2.0-3.0	>3.0
Albumina Sérica	g/L	>35	30-35	<30
	g/dL	>3.5	3.0-3.5	<3.0
Tempo de Protrombina	segundos prolongados	<4	4-6	>6
	ou INR	<1.7	1.7-2.3	>2.3
Ascite		Ausência	Facilmente controlável	Difícilmente controlável
Encefalopatia hepática		Ausência	Mínima	Avançada

A pontuação é calculada adicionando as pontuações para os cinco fatores e pode variar de 5 a 15. A classe Child-Pugh resultante pode ser A (uma pontuação de 5-6), B (7-9) ou C (≥ 10). A descompensação indica cirrose, com um score Child-Pugh de ≥ 7 (classe B). INR: *International Normalized Ratio*. (40)

Os seguintes testes laboratoriais são recomendados a qualquer momento antes do início da terapia antiviral: genótipo e subtipo de HCV e avaliação quantitativa do RNA do HCV (carga viral de HCV). Os doentes programados para receber um inibidor da protease NS3 do HCV (paritaprevir, simeprevir, grazoprevir) devem ser previamente avaliados sobre a existência de uma história de doença hepática descompensada e sobre a gravidade da doença hepática, utilizando a escala CTP. Os doentes com história atual ou prévia de doença hepática descompensada ou com uma pontuação CTP atual de 7 ou superior não devem receber tratamento com regimes que contenham inibidores da protease NS3. Deve ser efetuado o teste da presença de variantes associadas à resistência (RAV) antes do início do tratamento. (38)

Uma avaliação precisa da fibrose é fundamental, uma vez que o grau de fibrose hepática é um dos mais robustos fatores prognósticos usados para prever a progressão da doença e os desfechos clínicos. Indivíduos com fibrose grave necessitam de monitorização de vigilância para hepatocarcinoma, varizes esofágicas e função hepática. Em alguns casos, a duração recomendada do tratamento é também mais longa. Embora a biópsia hepática seja o *gold standard* diagnóstico, o facto de ser um método invasivo, e existir a possibilidade de erro por variabilidade do observador, estas questões limitam o desempenho do teste. Os testes não-invasivos para avaliar o grau de fibrose em pacientes com infeção crónica pelo HCV incluem modelos que incorporam biomarcadores séricos indiretos (testes de rotina), biomarcadores diretos do soro (componentes da matriz extracelular produzida pelas HSCs ativadas) e a elastografia. A abordagem mais eficiente para a avaliação da fibrose é combinar biomarcadores diretos e elastografia transitória do fígado. Uma biópsia deve ser considerada para qualquer paciente que tenha resultados discordantes entre as 2 modalidades que afetem a tomada de decisão clínica. Por exemplo, um demonstrando cirrose e o outro não. (38)

5.2.2. Indicações para tratamento

Todos os doentes com doença hepática crónica compensada ou descompensada relacionada com o HCV não tratados ou tratados previamente, que estejam dispostos a ser tratados e não tenham contra-indicações ao tratamento, devem ser considerados para terapêutica (39), com exceção dos que têm uma expectativa de vida curta que não possa ser remediada pelo tratamento por transplante ou por outra terapia dirigida. Os doentes com esperança de vida curta devido a doença hepática devem ser tratados em consulta com um especialista. (38)

5.2.3. Fármacos e regimes de tratamento atuais

Os DAAs (*direct-acting antiviral*) em desenvolvimento ou em uso clínico visam principalmente atividades enzimáticas de proteínas não estruturais virais com o objetivo de promover a inibição da replicação do RNA viral intracelular no ciclo de vida do HCV. Entre as proteínas NS, a protease NS3-4A, o complexo de replicação NS5A e a polimerase NS5B são atualmente as proteínas enzimáticas alvo. Uma vez que os DAAs são especificamente concebidos para o HCV, a sua atividade antiviral é significativa e os eventos adversos são poucos em comparação com a terapia com IFN convencional. Por outro lado, uma vez que cada DAA tem como alvo uma função enzimática viral única, o HCV pode escapar aos antivirais DAA através do desenvolvimento de mutações resistentes no seu genoma que se traduzam em alteração das suas estruturas proteicas. Nesse sentido, os DAAs têm geralmente baixa barreira genética e, uma vez que essas resistências aparecem precocemente com a utilização dos DAAs em monoterapia, os regimes de terapia utilizados devem basear-se na combinação com outros DAA, embora habitualmente as variantes resistentes a DAA desapareçam gradualmente após a sua descontinuação. (41)

A clivagem da poliproteína do HCV (Fig. 1) nas junções NS3 / NS4A, NS4A / NS4B, NS4B / NS5A e NS5A / NS5B é catalisada pela serina protease NS3 / 4A. A protease NS2 / 3 viral autocliva-se e permite que a protease NS3 realize a sua atividade de clivagem em todos os outros locais da porção NS da poliproteína. (42)

Há muito tempo se supõe que os inibidores da protease (IP) têm como alvo a síntese de RNA por inibição da clivagem de poliproteína e, deste modo, interrompendo o fornecimento de novas proteínas não estruturais necessárias para gerar novos complexos de replicação. O NS3 é um componente essencial de um complexo macromolecular formado por múltiplas proteínas não estruturais e a inibição da síntese de RNA sugere que os PI bloqueiam uma função essencial da NS3 dentro deste complexo que é necessária para a síntese de RNA. Uma vez que a NS3 é uma enzima bifuncional que consiste em domínios distintos de protease e helicase ligados, a ligação de PIs ao local ativo da protease pode restringir as atividades de helicase de NS3 dentro do complexo de replicação. A atividade da helicase é essencial para a replicação do RNA do HCV. O domínio da protease regula a atividade da helicase e é necessário para a ligação e desenrolamento eficazes do RNA *double stranded* (ds) pela NS3. A ligação de um PI ao domínio de protease pode impedir interações da NS3 com o molde de RNA ou com outras proteínas NS dentro do complexo, necessárias à síntese de RNA. (43)

Os PI boceprevir, telaprevir e simeprevir demonstraram conseguirem restaurar os níveis de MAVS não clivados, mais rapidamente do que os inibidores dirigidos a NS5A e NS5B. É provável que os PI também possam restaurar a sinalização TLR3-dependente. (43)

Os inibidores NS5A (daclatasvir, ledipasvir, ombitasvir e elbasvir) atuam como um inibidor da proteína NS5A que tem capacidade para formar complexo de replicação com outros componentes virais bem como com fatores hospedeiros nos hepatócitos. Devido à forte atividade antiviral, os inibidores de NS5A são um dos fármacos principais a serem utilizados em combinação com outros DAAs. Por outro lado, foi gradualmente revelado que uma proporção substancial de pacientes (8-30%) com genótipo-1b têm naturalmente mutações NS5A-resistentes, e que estas variantes afetam e diminuem o resultado do tratamento com o regime de daclatasvir (inibidor de NS5A) mais asunaprevir (PI). Além disso, foi referido que as mutações NS5A não reduzem significativamente a aptidão à replicação do vírus e, por conseguinte, as mutações NS5A foram relatadas como persistentes mesmo após a descontinuação destes inibidores NS5A. (41)

É importante notar que os perfis de resistência dos inibidores de NS5A não se sobrepõem com outros DAAs para que possam ser utilizados eficazmente em combinações livres do interferão com outras classes de antivirais tais como PI ou inibidores de polimerase. As terapias de combinação atualmente aprovadas incluem combinações de inibidores de NS5A com o inibidor de nucleótido análogo NS5B, como por exemplo ledipasvir ou daclatasvir com sofosbuvir, ou em terapia tripla com um inibidor de protease potenciado com ritonavir e um inibidor de NS5B não nucleosídico, como por exemplo ombitasvir com pariteprevir e dasabuvir. A NS5A é multifuncional e é necessária para a replicação do RNA viral, a montagem do vírus e a modulação das vias de sinalização celular. (43)

Os inibidores de NS5A não bloqueiam a síntese de RNA a partir de complexos de replicação pré-existentes, mas evitam a formação de novos complexos. NS5A interage com muitas proteínas celulares. Entre estas, a sua interação com a cinase lipídica celular, fosfatidilinositol 4-cinase IIIa (PI4KIIIa) é crítica para a replicação do vírus e estabelecimento da *membranous web*. A NS5A interage com e estimula a atividade de PI4KIIIa resultando em níveis localmente aumentados do produto fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) nas membranas intracelulares de células infetadas. A atividade de PI4KIIIa mostrou regular o movimento de colesterol para a *membranous web*, contribuindo possivelmente para a sua integridade. Os inibidores de NS5A podem bloquear eficientemente a libertação do vírus cerca de 6-9 horas após a sua administração. Após tratamento com inibidores NS5A, as células persistentemente infetadas reduzem rapidamente a quantidade de vírus intracelular e partículas de HCV contendo RNA, sugerindo que estes inibidores bloqueiam a montagem do vírus. (43)

A RdRp, NS5B, é a enzima que catalisa a síntese do genoma do HCV e é, portanto, um alvo principal para o desenvolvimento de compostos antivirais. (43) Existem duas classes diferentes de inibidores da polimerase em uso clínico: inibidores de nucleótidos (NIs) e inibidores não nucleotídicos (NNIs). Os NIs imitam nucleótidos naturais e são incorporados no RNA alongado, causando a terminação da cadeia (sofosbuvir). Uma vez que o sítio ativo da polimerase NS5B é altamente conservado em diferentes genótipos, estes fármacos podem ser utilizados nos diferentes genótipos do HCV. Devido à baixa capacidade de replicação em variantes resistentes, a barreira genética, ou seja o número de mutações necessárias para que se criem resistências aos NI é elevada. Os NNIs (dasabuvir e beclabuvir) suprimem a atividade da polimerase NS5B através da ligação a sítios alostéricos da NS5B distantes do local ativo. A polimerase NS5B possui pelo menos 5 locais alostéricos diferentes que podem ser alvo de NNIs. Uma vez que esses sítios alostéricos não são estritamente conservados em todos os genótipos, a potência antiviral é mais significativa no genótipo 1 HCV, mas mais fraca em outros genótipos. Devido à baixa barreira genética, NNIs são programados para ser usado em multi-combinação com outras classes de DAAs. (39)

Anteriormente, o tratamento para o HCV estava limitado à terapia baseada em interferão, visando a imunomodulação para inibir a replicação do HCV. Estes foram utilizados em conjunto com a ribavirina (RBV) com tolerabilidade e sucesso limitados. A introdução da primeira geração de inibidores da protease (boceprevir e telaprevir) melhorou as taxas de SVR em adultos com infecção pelo genótipo 1 do HCV. Subsequentemente o sofosbuvir (SOF) e o simeprevir (SIM) foram aprovados em 2013. Isto foi seguido pela combinação de ledipasvir-sofosbuvir (LDV / SOF) e ombitasvir-paritaprevir-ritonavir-dasabuvir. Em seguida, o daclatasvir (DCV) e a combinação de ombitasvir-paritaprevir-ritonavir foram aprovados para o tratamento dos genótipos 3 e 4, respetivamente. Mais recentemente, a associação elbasvir-grazoprevir (EBV / GZR) foi aprovada para o tratamento dos genótipos 1 e 4. (44)

Tabela 2: classificação dos diferentes fármacos atualmente utilizados e aprovados no tratamento da Hepatite C.

Inibidores da protease NS3/4A	Inibidores da protease NS5A	Inibidores da polimerase NS5B	Promotor dos inibidores da protease	Análogo da guanosina
Boceprevir	Ledipasvir	Sofosbuvir Dasabuvir	Ritonavir	Ribavirina
Telaprevir	Ombitasvir			
Simeprevir	Daclatasvir			
Paritaprevir	Elbasvir			
Grazoprevir				

Tabela 3: Regimes de tratamento atuais para os diferentes genótipos. (39)

Regime	Genótipo 1	Genótipo 2	Genótipo 3	Genótipo 4	Genótipos 5 e 6
Sofosbuvir + ribavirina	Não	Sub-ótimo	Sub-ótimo	Não	Não
Sofosbuvir/ledipasvir ± ribavirina	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Sofosbuvir/velpatasvir	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir + dasabuvir ± ribavirina	Sim	Não	Não	Não	Não
Ombitasvir/paritaprevir/ritonavir ± ribavirina	Não	Não	Não	Sim	Não
Grazoprevir/elbasvir ± ribavirina	Sim	Não	Não	Sim	Não
Sofosbuvir + daclatasvir ± ribavirina	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Sofosbuvir + simeprevir ± ribavirina	Sub-ótimo	Não	Não	Sim	Não

6. DESAFIOS PARA O FUTURO

Mais de 90% dos pacientes com Hepatite C crônica podem atualmente ser tratados com regimes orais sem IFN, os chamados regimes DAAs, já mencionados. Entre os desafios restantes no tratamento do HCV está o tratamento daqueles que falharam nos regimes anteriores, os DAAs *failures*. (45)

6.1. GRUPOS DIFÍCEIS DE TRATAR

6.1.1. Mutações de Resistência Viral

A resistência viral ao tratamento com DAAs é devida à seleção de variantes víricas que permitem a substituição de um aminoácido na região do alvo terapêutico viral, tornando o vírus menos suscetível à atividade inibitória do fármaco. A grande capacidade de replicação do HCV e uma semi-vida de apenas 2-3 horas, juntamente com erros no mecanismo de replicação viral, predispõem ao aparecimento constante de um elevado número de variantes virais geneticamente diferentes, que podem conferir resistência. Nem todas as mutações têm a mesma probabilidade de gerar resistência. Isso depende da qualidade ou tipo de alteração de nucleótidos associada à mutação. As variantes associadas à resistência têm geralmente uma capacidade de replicação mais baixa do que as estirpes selvagens, que são dominantes. A pressão seletiva de um fármaco elimina rapidamente a variante selvagem, tornando a variante com resistência a estirpe dominante. A exposição persistente a um fármaco pode dar origem a mutações compensatórias ou secundárias que tornam a replicação nesta variante mutante mais eficaz, conduzindo assim a uma sensibilidade reduzida ao fármaco. O tipo de alteração de nucleótidos e número de mutações necessárias para conferir resistência a um determinado fármaco vão definir o valor da barreira genética do fármaco às resistências. Os DAAs com uma barreira genética baixa podem requerer apenas transições e/ou uma ou duas substituições de aminoácidos, enquanto que aqueles com uma barreira genética elevada podem requerer três ou mais alterações de

nucleótidos. Clinicamente, a falha terapêutica com DAAs tem sido associada a regimes de curto prazo, pobre adesão ao tratamento e a não associação com ribavirina. Os fatores envolvidos na resposta imunitária ou na distribuição do fármaco às células alvo, bem como fatores genéticos ou o grau de fibrose hepática no início do tratamento, podem todos favorecer o aparecimento de resistência. Por exemplo, uma das principais causas do aparecimento de variantes de escape virais, e a conseqüente falha da terapia antiviral, é a exaustão de células T CD8+ específicas causada pela exposição contínua ao vírus. (46)

6.1.2. Insuficiência renal

Um outro desafio é o tratamento de pacientes com insuficiência renal, uma vez que os regimes baseados em sofosbuvir são limitados a pacientes com taxa de filtração glomerular (TFG) >30 ml/min. O denominado regime 3D (paritaprevir potenciado com ritonavir, ombitasvir e dasabuvir) ± RBV pode ser utilizado em doentes com uma TFG <30. (45)

O metabolito principal do sofosbuvir, GS-331007, é totalmente eliminado por via renal e apenas parcialmente removido pela diálise. Em doentes com taxas de filtração glomerular estimadas abaixo de 30 ml/min, os níveis de GS-331007 acumulam-se em níveis extremamente elevados. Alguns estudos sugeriram que o uso de sofosbuvir em pacientes com TFG <30 ml / minuto pode piorar a função renal e causar outros eventos adversos. A combinação grazoprevir mais elbasvir também está aprovada para pacientes com insuficiência renal, incluindo pacientes com doença renal terminal e em diálise. (45)

6.1.3. Genótipo 3

Mesmo com o regime pan-genotípico mais recentemente aprovado de sofosbuvir/velpatasvir, a maior taxa de recaída em pacientes com doença hepática compensada foi em pacientes com infecção por genótipo 3. Globalmente, a infecção pelo genótipo 3 é responsável por 20% das infecções por HCV. O HCV de genótipo 3 foi identificado como um vírus mais fibrogénico e metabolicamente ativo. A infecção pelo genótipo 3 do HCV tem aumentado a prevalência de esteatose, cirrose e carcinoma hepatocelular. O motivo pelo qual os pacientes infetados com genótipo 3 têm maiores taxas de recaída com os DAAs não é claro, mas está certamente relacionado com a indução de esteatose, resistência à insulina e doença hepática grave mediada pelo vírus. (47)

6.1.4. Genótipos 2, 4, 5 e 6 com cirrose

Embora os regimes DAA atualmente aprovados tenham atividade contra todos estes genótipos, os dados dos ensaios clínicos, em particular nos doentes com cirrose, são limitados. Para os doentes com genótipo 2 existem dados muito limitados para doentes com cirrose, e a duração ótima do tratamento permanece em dúvida com as taxas de SVR que variam na prática clínica. Mais uma vez, o subconjunto relativamente limitado de estirpes virais estudadas até à data torna difícil generalizar e prever taxas de resposta em contextos mais diversos, do mundo real. (48)

6.1.5. Doença hepática descompensada

Talvez o maior desafio restante seja o tratamento de pacientes com cirrose descompensada. Dois regimes – ledipasvir mais sofosbuvir e daclatasvir mais sofosbuvir – estão aprovados para doença hepática descompensada; cada um deles associa RBV durante 12 semanas e sem RBV durante 24 semanas, tanto para o genótipo 1 e 4, daclatasvir mais sofosbuvir também para o genótipo 3. Estes regimes são eficazes e seguros nesta população de doentes, mas só pode ser dado se existir uma TFG >30 ml/min, uma limitação relacionada com o sofosbuvir. (45)

As taxas de SVR são geralmente abaixo de 90% e algumas preocupações de segurança têm sido levantadas com um pequeno número de casos de pacientes que agravam a descompensação após a terapia com sofosbuvir, alguns dos quais levaram ao recurso ao transplante hepático e/ou à morte. Mesmo para os pacientes que fazem com segurança a terapia completa e conseguem a SVR, não está claro quais os pacientes que irão melhorar e quais permanecerão num estado descompensado. É evidente que os doentes com cirrose descompensada continuam a ser um grupo significativo de doentes com um tratamento não satisfatório com os fármacos atuais, e os critérios que identifiquem os grupos de doentes que são suscetíveis de beneficiar da eliminação viral e recuperar a função hepática são urgentemente necessários. O risco de eliminar o vírus e deixar os doentes não elegíveis para transplante, mas com uma qualidade de vida reduzida é real, e análises em larga escala para abordar esta questão crítica devem ser realizadas. (48)

6.1.6. Mulheres grávidas e crianças

Grandes avanços foram feitos na expansão do benefício de tratamento com DAAs para infetados com o HCV em diversos grupos de doentes. No entanto, crianças e mulheres grávidas permanecem grupos mal estudados. Até à data, não existem estudos publicados de grávidas em regimes DAAs. (47) A orientação mais recente da American Association for the Study of the Liver (AASLD) sobre o HCV, por exemplo, não fornece recomendações específicas para o tratamento de crianças. Todavia, existem atualmente ensaios sobre a utilização de DAAs em crianças pelo que se esperam algumas conclusões sobre este grupo. O tratamento durante a gravidez poderia ser benéfico na medida em que poderia diminuir o risco estimado de 5% de transmissão perinatal. No entanto, os dados de segurança dos DAAs na gravidez são limitados e a maioria das mulheres jovens tem uma doença hepática num estadio pouco avançado e pode adiar o tratamento até a uma altura posterior ao parto. (49)

6.1.7. Pacientes co-infetados

Os pacientes co-infetados com HIV têm progressão mais rápida da fibrose do que os pacientes com monoinfeção pelo HCV, e foram considerados como uma população "difícil de tratar" na era das terapias baseadas em IFN. No entanto, as taxas de SVR com os regimes de DAAs atualmente disponíveis são comparáveis e as orientações de tratamento do HCV pela AASLD recomendam a mesma abordagem de tratamento para pacientes co-infetados com HIV-HCV como para pacientes com monoinfeção de HCV.

A prevalência de co-infecção HBV-HCV é menor que a co-infecção HIV-HCV, mas a prevalência é de até 10% globalmente. Os doentes com co-infecção HBV-HCV tendem a ter uma progressão mais rápida da doença hepática, incluindo taxas mais elevadas de descompensação e carcinoma hepatocelular. Embora os regimes de tratamento recomendados para o HCV sejam os mesmos para esta população de doentes, é importante reconhecer que a replicação do HBV pode aumentar após a erradicação bem sucedida da infecção crônica pelo HCV. Assim, é importante monitorizar os níveis de DNA do HBV durante e após a conclusão da terapia com HCV em pacientes com co-infecção HBV-HCV. (49)

6.2. TERAPÊUTICA FUTURA

6.2.1. Doença renal crônica

Tal como referido previamente a combinação grazoprevir mais elbasvir está aprovada para pacientes com insuficiência renal, inclusive para pacientes com doença renal terminal e em diálise. (45)

Ambos os fármacos são completamente metabolizados hepaticamente, e os dados farmacocinéticos mostraram-se seguros em doentes com doença renal avançada, incluindo aqueles em hemodiálise. A segunda geração do inibidor da protease ABT-493 e o inibidor da NS5A ABT-530 também são eliminados por via renal e são ativos contra todos os genótipos, incluindo o genótipo 3, dando a esperança de que os regimes que não necessitem da utilização do sofosbuvir em doentes com DRC (Doença Renal Crônica) venham a estar disponíveis num futuro relativamente próximo. Para pacientes que necessitam de terapia com base em sofosbuvir, pequenos estudos e séries de casos documentaram alta eficácia e boa segurança em pacientes com DRC avançada, incluindo aqueles que se encontram em diálise. Apesar de ter sido relatado em alguns estudos uma degradação da função renal durante o tratamento, e um estudo farmacocinético recente envolvendo doentes em hemodiálise a receber diariamente uma dose completa de sofosbuvir mostrou uma acumulação limitada de GS-331007, com 53% de remoção com diálise. Esses dados sugerem que os pacientes com DRC avançada que necessitem de tratamento urgente com sofosbuvir podem ser tratados, mas é necessária uma monitorização cuidadosa e a segurança pode ser menos preocupante naqueles que já estão em diálise. (48)

6.2.2. Genótipo 3

Outra população difícil de tratar são os pacientes com infecção pelo genótipo 3 do HCV. No entanto, parece que a próxima geração de DAAs pode superar este problema. Uma das novas combinações, que inclui o novo inibidor pan-genotípico NS5A velpatasvir e sofosbuvir, completou o programa de fase III e foi aprovada nos EUA (Estados Unidos da América) e EU (União Europeia) em meados de 2016. (45)

Um estudo de fase III inclui um NS3/4A PI, ABT-493, e um inibidor NS5A, ABT-530, em combinação. O ABT-493 é um PI com potência nanomolar atuante em HCV do genótipo 3. O ABT-530 é um inibidor pan-genotípico de NS5A com potência picomolar, também para o genótipo 3. Estudos iniciais de fase II deste regime em doentes infetados com o genótipo 3, relataram uma SVR de 97% com apenas 8 semanas de tratamento em doentes sem cirrose, e 100% de RVS com 12 semanas em doentes com cirrose, independentemente do uso de ribavirina. Existe uma grande esperança de que esta combinação de fármacos venha dinamizar ainda mais a abordagem ao tratamento com HCV, embora seja provável que no futuro se venha a verificar uma otimização da terapia para subgrupos particularmente difíceis de tratar. (47)

O grazoprevir é ativo contra o genótipo 3, mas são necessárias doses de 200mg ou mais para uma eficácia ótima e estas doses mais elevadas têm sido associadas a hepatotoxicidade. Na dose aprovada de 100mg, o genótipo 3 não fica bem coberto. Para alargar a atividade, o grazoprevir foi estudado em associação com o elbasvir ou, alternativamente, com o MK-8408, outro inibidor pan-genotípico NS5A de segunda geração, em combinação com o sofosbuvir. Com este regime de três fármacos administrado durante 12 semanas, estudos com amostras pequenas confirmaram a eficácia contra o genótipo 3 com 14 de 14 doentes não cirróticos e 10 de 11 doentes com cirrose compensada, conseguindo-se atingir uma SVR. Estes dados fornecem uma prova de que o grazoprevir combinado com um inibidor de NS5A e um inibidor de polimerase de nucleótido será amplamente ativo, incluindo o genótipo 3. Estudos de fase III e grazoprevir e MK-8408 combinados com MK-3682, um novo análogo dos nucleótidos, estão atualmente em curso. (48)

6.2.3. Genótipo 2, 4, 5 e 6 com cirrose

A combinação de sofosbuvir/velpatasvir foi avaliada nos genótipos de 1 a 6. Coletivamente, a combinação de sofosbuvir/velpatasvir oferece a promessa de um regime pan-genotípico altamente eficaz que pode ser usado como um "*one-size-fits-all*", incluindo pacientes com cirrose compensada, ultrapassando a necessidade de genotipagem pré-tratamento. Os outros regimes pan-genotípicos em desenvolvimento, incluindo ABT-493/ABT-530 e grazoprevir/MK-8048/MK-3682, também se mostraram promissores em pequenos estudos incluindo pacientes com cirrose compensada. (48)

6.2.4. Cirrose descompensada

Para os pacientes com cirrose descompensada, estudos atuais com sofosbuvir e inibidores de NS5A confirmaram a segurança geral destes regimes e mostraram que em alguns pacientes há uma melhoria nos scores MELD (Model for End-Stage Liver Disease) com resultados muito encorajadores, sugerindo que a eliminação viral é possível na maioria dos pacientes. (48)

O score MELD é um sistema utilizado para prever o prognóstico de pacientes com doença hepática e hipertensão portal. Este score é calculado a partir de três variáveis não invasivas: o tempo de protrombina, expresso como o índice normalizado internacional (INR), o nível sérico de bilirrubina e a concentração sérica de creatinina. (40)

Todavia, a seleção destes pacientes continua a ser um desafio significativo. Entender quais os pacientes que beneficiarão da depuração viral nesta fase avançada da doença é uma das principais prioridades de pesquisa, já que alguns indivíduos seriam melhor tratados se adiassem o tratamento para uma fase posterior ao transplante hepático. (48)

6.2.5. Mutações de Resistência Viral

As sequências virais com polimorfismos pré-existentes podem representar um desafio terapêutico, e com os regimes atuais, a RAV (*Resistance-associated variants*) clinicamente mais relevante é a RAV NS5A. Os polimorfismos NS5A basais que conferem resistência são significativamente mais comuns do que os identificados nos genes NS3/4A ou NS5B. Atualmente, a FDA (*Food and Drug Administration*) recomenda testes a RAVs NS5A antes do início da terapêutica apenas com o regime de elbasvir/grazoprevir e apenas na infecção genótipo-1a. No entanto, o Painel de Orientação do AASLD HCV também recomenda testes de NS5A para vários subgrupos de pacientes com infecção genótipo 3 que são tratados com daclatasvir mais sofosbuvir ou sofosbuvir/velpatasvir, e considera também a aplicação do teste de RAVs NS5A a pacientes infectados com genótipo 1 que tenham falhado o tratamento prévio, e com cirrose, que irão receber o tratamento com ledipasvir/sofosbuvir. (46)

6.2.6. Regimes e Fármacos em Estudo

Há um número considerável de regimes de combinação atualmente em desenvolvimento de fase III (Tabela 4) que se espera venham a estar disponíveis em 2017. Todos eles serão pan-genotípicos, livres de RBV, e serão eficazes em doentes de genótipo 1a que falharam com um regime de DAAs contendo um inibidor de NS5A. Os regimes podem envolver combinações duplas de inibidores de protease pan-genotípicos muito potentes e inibidores de NS5A ou combinações triplas de inibidores de protease, inibidores NS5A e inibidores da polimerase NS5B. (50)

Para a infecção pelo genótipo 1, a combinação de um único comprimido de ledipasvir (inibidor NS5A) com sofosbuvir (inibidor da polimerase nucleotídica NS5b) mostrou taxas de cura superiores a 95%. (50)

Tabela 4: Fármacos em estudo. (50)

	GZR + RZV + MK-3682	RZV + MK-3682	SOF + VEL + GS-9857	ABT-493+ABT530
Manufacturer	Merck (Kenilworth, NJ, USA)	Merck (Kenilworth, NJ, USA)	Gilead (Foster City, CA, USA)	AbbVie (Lake Bluff, IL, USA)
Number of drugs	Triplet	Doublet	Triplet	Doublet
Drug classes	PI + NS5A + NS5b	NS5A + NS5b	NS5b + NS5A + PI	PI + NS5A
Requires RBV?	No	No	No	No
Duration of therapy	4–12 weeks	4–12 weeks	12 weeks	8–12 weeks
Genotype efficacy	Pangenotypic	Pangenotypic	Pangenotypic	Pangenotypic
DAA-failure with NS5A RASs	Effective, but may require addition of RBV	Effective, but may require addition of RBV	Effective	Effective

ABT-493, gleaprevir; ABT-530, pibrentasvir; DAA, direct-acting antivirals; GS-9857, voxilaprevir; GZR, grazoprevir; NS5A, NS5A inhibitor; NS5b, NS5b nucleos(t)ide polymerase inhibitor; PI, NS3/4A protease inhibitor; RAS, resistance-associated substitutions; RBV, ribavirin; RZV, ruzasvir; SOF, sofosbuvir; VEL, velpatasvir

6.2.7. Vacina

A eficácia dos DAAs irá provavelmente diminuir substancialmente a carga global da infeção pelo HCV e potencialmente eliminar a transmissão viral. No entanto, os regimes de DAAs por si só provavelmente não são suficientes para facilitar a erradicação deste vírus. A infeção por HCV é assintomática e o número de indivíduos que são persistentemente infetados pode ser subestimado. Muitos dos infetados não têm conhecimento do seu estado de infeção. (45)

Uma vacina preventiva é necessária para parar a transmissão do HCV a indivíduos não infetados, e para aqueles que são curados com DAAs mas continuam em risco de re-exposição ao vírus. No entanto, o desenvolvimento de uma vacina é complicado pela nossa má compreensão das respostas imunes adaptativas ao vírus. Estudos em humanos e chimpanzés mostraram que a resolução da infeção primária pode reduzir significativamente a probabilidade de desenvolver infeção persistente em subsequentes reexposições. Trabalhos recentes mostraram que a vacinação de animais com um adenovírus recombinante que expressa as proteínas não estruturais do HCV conduz a uma menor amplitude e duração da viremia. Como resultado desta observação importante, uma vacina similar está agora em ensaio clínico de fase II. Os resultados em voluntários *naive* já mostraram que a vacina provoca uma forte imunidade de células T, revelando-se muito promissora na proteção contra o desenvolvimento de HCV. Infelizmente, actualmente, o investimento por parte de indústrias farmacêuticas produtoras de vacinas em programas de desenvolvimento de vacinas contra o HCV é escasso. (45)

6.2.8. Fases de ensaios clínicos

Fase I: Os investigadores testam um novo medicamento ou tratamento num pequeno grupo de pessoas pela primeira vez para avaliar a sua segurança, determinar uma gama de dosagem segura e identificar os efeitos secundários.

Fase II: A droga ou tratamento é dado a um grupo maior de pessoas para ver se é eficaz e para avaliar ainda mais a sua segurança.

Fase III: A droga ou tratamento é administrado a grandes grupos de pessoas para confirmar a sua eficácia, monitorizar os efeitos colaterais, compará-lo aos tratamentos comumente utilizados e recolher informações que permitirão que o fármaco ou o tratamento sejam usados com segurança.

Fase IV: Os estudos são feitos após o fármaco ou tratamento ser comercializado para reunir informações sobre o efeito da droga em várias populações e quaisquer efeitos colaterais associados com o uso a longo prazo. (51)

IV. CONCLUSÃO

Após revisão extensa da literatura desta área pode-se concluir que o tratamento da Hepatite C tem sofrido uma evolução enorme. É o resultado de um grande esforço intelectual, científico e financeiro de diversas comunidades acadêmicas e dos setores industriais o que permitiu a criação de fármacos que permitiram atingir resultados inéditos no tratamento desta patologia. Com a atual e futura geração de fármacos será possível curar uma grande maioria dos pacientes infectados com o vírus da Hepatite C, especialmente se fármacos de preços mais baixos começarem a surgir. Futuramente deverão ser implementados planos nacionais de rastreio e diagnóstico com efetiva capacidade de resposta terapêutica para os doentes, promovendo a educação dos grupos de doentes que se encontram em elevado risco de re-exposição.

Apesar de todos estes avanços, podemos concluir que ainda existem vários grupos de doentes que ainda não têm uma alternativa terapêutica eficaz pelo que é fundamental que se continue a promover o trabalho científico nesta área.

Este trabalho pretende então fazer um ponto de situação relativamente às diversas ofertas terapêuticas atualmente disponíveis e salientar algumas questões que ainda necessitam de ser abordadas, realçando as dificuldades que ainda existem e o que está a ser feito para lhes responder.

V. **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Rui Gradiz, pela disponibilidade, acompanhamento, orientação científica, pedagógica e análise crítica desta tese.

À Professora Doutora Anabela Mota Pinto, pelo desafio de elaborar este artigo e pelo voto de confiança.

À família, Mãe e Pai, sempre presentes no meu percurso e crescimento académicos.

À minha namorada, Rosa, por todo o apoio e motivação constante.

VI. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organização genética e processamento de poliproteínas do HCV	13
Figura 2: Organização do genoma do HCV	15
Figura 3: Entrada do HCV no hepatócito	21
Figura 4: Estrutura do RNA do HCV	23
Figura 5: Formação do ribossoma na IRES para início da tradução	23
Figura 6: Representação esquemática do ciclo de replicação do HCV	26
Figura 7: Formação e libertação do vírus	29
Figura 8: Resposta imunitária inata ao HCV	33
Figura 9: Mecanismos de disfunção da resposta imune adaptativa	38
Figura 10: Distribuição mundial dos vários genótipos da Hepatite C.....	41
Figura 11: Mecanismo fisiopatológicos da fibrose	47
Figura 12: Mecanismo da esteatose induzida pelo HCV	49
Figura 13: Interações com a sinalização da insulina	51

VII. ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	62
Tabela 2	69
Tabela 3	70
Tabela 4	81

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organization WH. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with chronic hepatitis c infection. 2016. p. 138.
2. Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol*. 2013;19(1):17-25.
3. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):482-96.
4. Moradpour D, Penin F. Hepatitis C virus proteins: from structure to function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:113-42.
5. Kupfer B. HCV Virology. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - A clinical textbook*. 7th ed 2016.
6. Gerold G, Pietschmann T. The HCV life cycle: in vitro tissue culture systems and therapeutic targets. *Dig Dis*. 2014;32(5):525-37.
7. Zeisel MB, Felmlee DJ, Baumert TF. Hepatitis C virus entry. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:87-112.
8. Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S3-s13.
9. Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol*. 2015;7(10):1377-89.
10. Shah KB, Shah PS, Gandhi UD, Dawd SS. Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments In: Stambouli DO, editor. *Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments* 1ed. USA: OMICS Group eBooks; 2014. p. 27-9.
11. Niepmann M. Hepatitis C virus RNA translation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:143-66.
12. Locker N, Easton LE, Lukavsky PJ. HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *Embo j*. 2007;26(3):795-805.
13. Mauss S, Berg T, Rockstroh J, Sarrazin C, Wedemeyer H. *Hepatology - A clinical textbook*. In: Kupfer B, editor. *HCV Virology*. 7 ed: Medizin Fokus Verlag; 2016. p. 105-23.
14. Lohmann V. Hepatitis C virus RNA replication. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:167-98.
15. Felmlee DJ, Hafirassou ML, Lefevre M, Baumert TF, Schuster C. Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease. *Viruses*. 2013;5(5):1292-324.
16. Schoggins JW, Rice CM. Innate immune responses to hepatitis C virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:219-42.
17. Xu Y, Zhong J. Innate immunity against hepatitis C virus. *Curr Opin Immunol*. 2016;42:98-104.
18. Crispe IN. Hepatocytes as Immunological Agents. *J Immunol*. 2016;196(1):17-21.
19. Li K, Lemon S. Innate Immune Recognition of Hepatitis C Virus 2013.
20. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S14-25.

21. Neumann-Haefelin C, Thimme R. Adaptive immune responses in hepatitis C virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:243-62.
22. Kazmierczak J, Caraballo Cortes K, Bukowska-Osko I, Radkowski M. Virus-Specific Cellular Response in Hepatitis C Virus Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2016;64(2):101-10.
23. Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, Garcia-Garzon S, Lazaro A, Miquel J, et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(13):3418-30.
24. Stambouli O. *Hepatitis C Virus: Molecular Pathways and Treatments USA: OMICS Group eBooks*; 2014.
25. Shin-I T, Sugiyama M, Mizokami M. *Hepatitis C Virus Genotypes and Their Evolution 2016*.
26. Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*. 2014;61(1 Suppl):S58-68.
27. Ghany MG, Liang TJ. *Natural History of Chronic Hepatitis C 2016*.
28. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2012;26(4):401-12.
29. Yamane D, McGivern DR, Masaki T, Lemon SM. Liver injury and disease pathogenesis in chronic hepatitis C. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;369:263-88.
30. Sarin SK, Kumar M. *Natural history of HCV infection 2012*.
31. Boesecke C, Wasmuth J-C. Hepatitis C. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - a clinical textbook*. 7th ed2016.
32. Sheiko MA, Rosen HR. *Hepatic Fibrosis in Hepatitis C 2016*.
33. Grunhage F. Assessment of Hepatic Fibrosis and Steatosis. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - a clinical textbook*. 7th ed2016.
34. Koike K. *The Multifaceted Features of HCV Infection Beyond the Liver 2016*.
35. Wang S-H, Yeh S-H, Chen P-J. *Hepatocellular Carcinoma and Hepatitis C Virus*.
36. Bohlig A. Extrahepatic Manifestations of Chronic HCV. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - a clinical textbook*. 7th ed2016.
37. Lange C. Hepatitis C: Diagnostic Tests. In: Verlag MF, editor. *Hepatology - a clinical textbook*. 7th ed2016.
38. AASLD-IDS. HCV testing and linkage to care. Recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C. . 2016.
39. EASL. Recommendations on Treatment of Hepatitis C. *Journal of Hepatology* 2016.
40. Kasper D, Hauser S, Fauci A. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th ed. Hill M, editor2016.
41. Maekawa S, Enomoto N. *Viral Variation and Response to Therapy 2016*.
42. Tremblay N, Park AY, Lamarre D. HCV NS3/4A Protease Inhibitors and the Road to Effective Direct-Acting Antiviral Therapies.
43. Williford SE, McGivern DR. Mechanism of Action of Direct-Acting Antivirals: New Insights into the HCV Life Cycle 2016.
44. Zhang J. Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Review of Current Direct-Acting Antiviral Treatment Strategies. *North American Journal of Medical Sciences*; 2016.

45. Moradpour D, Grakoui A, Manns MP. Future landscape of hepatitis C research - Basic, translational and clinical perspectives. *J Hepatol.* 2016;65(1 Suppl):S143-55.
46. Jimenez-Perez M, Gonzalez-Grande R, Espana Contreras P, Pinazo Martinez I, de la Cruz Lombardo J, Olmedo Martin R. Treatment of chronic hepatitis C with direct-acting antivirals: The role of resistance. *World J Gastroenterol.* 2016;22(29):6573-81.
47. Naggie S. Oral Combination Therapies for Hepatitis C Virus Infection: Successes, Challenges, and Unmet Needs. *Annual Review of Medicine;* 2017
48. Feld JJ, Foster GR. Second generation direct-acting antivirals - Do we expect major improvements? *J Hepatol.* 2016;65(1 Suppl):S130-42.
49. Konerman MA, Lok ASF. Hepatitis C Treatment and Barriers to Eradication 2016.
50. Kardashian AA. Novel emerging treatments for hepatitis C infection: a fast-moving pipeline. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2017.
51. Medicine USNLo. [Available from: <https://www.nlm.nih.gov/services/ctphases.html>].