

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ANÁLISE DE QUASIESPÉCIES DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E  
IMPLICAÇÃO NA TRANSMISSÃO INTRAUTERINA**

**TAMIRIS TATIANE DIAS**

Salvador – Brasil

2013

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**ANÁLISE DE QUASIESPÉCIES DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E  
IMPLICAÇÃO NA TRANSMISSÃO INTRAUTERINA**

**TAMIRIS TATIANE DIAS**

Orientador: Dr. Luciano Kalabric Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

D541a Dias, Tamiris Tatiane  
Análise de quasiespécies do vírus da hepatite C (HCV) e implicação na  
transmissão intrauterina. [manuscrito] / Tamiris Tatiane Dias. - 2013.  
84 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

Dissertação ( Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa, 2013.

Orientador: Drº. Luciano Kalabric Silva.

1. Hepacivirus 2. Hepatite C. 3. Transmissão vertical de doenças infecciosas. 4.  
Clonagem molecular 5. Alinhamento de sequência 6. Análise de sequência I.Título.

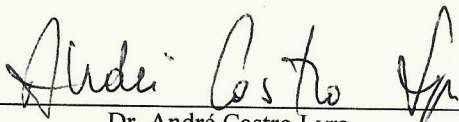
CDU 616.36-002

**“ANÁLISE DE QUASIESPÉCIE DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E IMPLICAÇÃO NA  
TRANSMISSÃO INTRAUTERINA”**

**TAMIRIS TATIANE DIAS**


FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. André Castro Lyra  
Professor  
UFBA



---

Dr<sup>a</sup> Maria Lourdes Farre Vallve  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Aos meus pais.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus e aos meus pais por tudo que fizeram e têm feito por mim.

Agradeço à Fiocruz e ao meu orientador que me acolheram para que eu pudesse seguir o meu sonho.

Agradeço às pessoas que direta e indiretamente me ajudaram a alcançá-lo.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

DIAS, Tamiris Tatiane. Análise de quasiespécies do vírus da hepatite c (HCV) e implicação na transmissão intrauterina. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## RESUMO

**Introdução:** A transmissão materno-infantil (TMI) é a causa mais comum de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) entre as crianças. **Objetivo:** Esse estudo teve como objetivo avaliar fatores virais implicados na TMI do HCV. **Materiais e métodos:** Quatro gestantes e um par mãe-recém-nascido (RN), todos infectados pelo HCV, foram incluídos neste estudo. Sequências das regiões 5'UTR, E1, HVR1, E2 e NS5B foram obtidas através de sequenciamento direto do produto do PCR e clonagem. A diversidade quasiespécie foi analisada utilizando-se diferentes parâmetros (taxa de clonotipos, frequência de mutações, Pn e entropia de Shannon normalizada), comparando (1) grupos TMI+ e TMI-, e (2) par mãe-RN. Um *framework* foi usado para avaliar a associação entre a frequência dos nucleotídeos e a TMI. **Resultados:** Dois casos de TMI foram identificados, mas apenas a amostra de um RN estava disponível. As cargas virais de todos os sujeitos estavam acima do limite de quantificação. Ambos os casos de TMI pertenciam ao genótipo 1a apenas este subtipo foi analisado subsequentemente. O sequenciamento direto dos produtos de PCR não representou, de maneira confiável, a complexidade quasiespécie e não foi utilizado. Não houve clonotipos coincidentes entre os grupos TMI+ e TMI-, exceto pela região 5'UTR. Em nível de aminoácido, mãe e RN compartilharam apenas do clonotipo predominante. Todos os clonotipos minoritários foram exclusivos. Foi observada maior diversidade quasiespécie nas regiões E2 e NS5B. A HVR1 apresentou a menor diversidade dentro da região codificante. A diversidade quasiespécie do grupo TMI+ foi sempre maior do que aquela vista no grupo TMI-; no entanto, não houve significância estatística. Trinta e cinco mutações na região codificante foram associadas significativamente com a TMI. Dados do par mãe-RN sugerem que a transmissão intrauterina ocorreu em um momento inicial da gestação e que o vírus provavelmente atravessou o tecido placentário, levando a um gargalo de garrafa. **Conclusões:** A diversidade quasiespécie não foi associada à TMI, mas a presença de mutações ao longo da região codificante sugere que o genoma completo contribui para a capacidade de transmissão intrauterina. São necessários estudos adicionais para determinar se essas variantes podem ser úteis para prever a TMI.

**Palavras-chave:** vírus da hepatite C, HCV, diversidade quasiespécie, transmissão materno-infantil, análise de associação.



DIAS, Tamiris Tatiane. Quasispecies analysis of hepatitis C virus in mother-to-child intrauterine transmission. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## ABSTRACT

**Introduction:** Mother-to-child-transmission (MTCT) is the most common cause of hepatitis C virus (HCV) infection in children. **Objective:** This study aimed to evaluate viral factors implicated in HCV MTCT. **Methods:** Four HCV-infected pregnant women and one HCV-infected mother-newborn pair were included in this study. Sequences were obtained from the regions 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B by direct PCR product sequencing and cloning. Quasispecies diversity was analyzed by different parameters (clonotype ratio, mutation frequency, Pn and normalized Shannon entropy), comparing (1) MTCT+ vs. MTCT- groups, and (2) mother-newborn pair. A framework was used to establish association between nucleotide frequency and MTCT. **Results:** Two cases of MTCT were identified, but a sample from only one newborn was available. Viral loads from all subjects were above the quantification limit. Both cases of MTCT belonged to genotype 1a and only this subtype was further analyzed. Direct sequencing from PCR products did not reliably represent the quasispecies complexity and was not used. There were no coincident clonotypes between MTCT+ and MTCT- groups, except for 5'UTR. At the amino acid level, mother and newborn shared only the master clonotype. All minor clonotypes were exclusive. Higher quasispecies diversity was observed within E2 and NS5B regions. HVR1 presented the lowest diversity within the coding region. Quasispecies diversity from the MTCT+ group was always greater than seen in the MTCT- group; however, no statistically significance was observed. Thirty-five mutations in the coding regions were significantly associated with MTCT. Data from the mother-newborn pair suggest that the intrauterine transmission occurred in an earlier time point of the pregnancy and that the virus probably crossed the placental tissue leading to a bottleneck. **Conclusions:** Quasispecies diversity was not associated with MTCT but the presence of mutations along the coding region suggests that the whole genome contributes to the ability of intrauterine transmission. Further studies are required to establish if these variants could be useful to predict MTCT.

**Keywords:** hepatitis C virus, HCV, quasispecies diversity, mother-to-child transmission, association analysis.

## Lista de Figuras

### Dissertação

Figura 1. Genoma do HCV, estrutura polipeptídica e funções proteicas. Traduzido e modificado de LLOYD *et al.* (2007). ..... 14

### Artigo

Figure 1. Clonotype distribution of clones from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B comparing MTCT+ and MTCT- mothers (genotype 1a, only), both at the nucleotide (nt) and the amino acid (aa) levels. MTCT, mother-to-child transmission. .... 48

Figure 2. Clonotype distribution of clones from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B comparing mother-newborn pair, both at the nucleotide (nt) and the amino acid (aa) levels. MTCT, mother-to-child transmission. .... 49

Figure 3. Nucleotide association test between viruses from MTCT+ and MTCT- mothers (genotype 1a, only) at the nucleotide level. Different regions were analyzed: 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B. *p* value (-log) for Chi-square ( $\chi^2$ ) was 1.3 and varied according to the region for FDR and Bonferroni's method. .... 50

### APÊNDICE III – Dados suplementares (*Supplementary data*)

Supplementary Figure 1. Genotyping of concatenated PCR products, including sequences from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B from the isolates using phylogenetic analysis through Neighbor-joining method, bootstrap (BS) value = 10.000. Only BS values above 70 are shown. .... 75

Supplementary Figure 2. Nucleotide association test between viruses from mother-newborn pair, at the nucleotide level. Different regions were analyzed: 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B. .... 76

## Lista de Tabelas

### Artigo

Table 1. Summary of laboratorial data. ....	42
Table 2. Quasispecies diversity at the nucleotide level from different HCV subgenomic regions. ....	43
Table 3. Quasispecies diversity at the amino acid level from different HCV subgenomic regions. ....	44
Table 4. Test for selective pressure, per sample per region.....	45
Table 5. Sites from HVR1 under positive selection. ....	46
Table 6. List of mutations associated to HCV MTCT per region.....	47

### APÊNDICE III – Dados suplementares (*Supplementary data*)

Supplementary Table 1. Comparison of quasispecies parameters between MTCT-mothers, from genotypes 1a and 1b, at the nucleotide and the amino acid levels. ...	72
Supplementary Table 2. Comparison of quasispecies parameters between subgenomic regions at the nucleotide level.....	73
Supplementary Table 3. Comparison of quasispecies parameters between MTCT+ and MTCT- mothers, all from genotype 1a, at the nucleotide and the amino acid levels. ....	74

## Lista de Abreviaturas e Siglas

#CT	número de clonotipos
3'UTR	região 3' não-traduzida (do inglês, <i>3' untranslated region</i> )
5'UTR	região 5' não-traduzida (do inglês, <i>5' untranslated region</i> )
anti-HCV	anticorpos específicos para o HCV
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CT	clonotipo (do inglês, <i>clonotype</i> )
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
E1	envelope 1
E2	envelope 2
FDR	taxa de falsas descobertas (do inglês, <i>false discovery rate</i> )
HCV	vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i> )
HCV-RNA	RNA do vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>human immunodeficiency virus</i> )
HVR	região hipervariável (do inglês, <i>hypervariable region</i> )
HVR1	região hipervariável 1 (do inglês, <i>hypervariable region 1</i> )
HVR2	região hipervariável 2 (do inglês, <i>hypervariable region 2</i> )
IFN	interferon
ISDR	região determinante da sensibilidade ao interferon (do inglês, <i>interferon-sensitive determining region</i> )
IU	unidade internacional (do inglês, <i>international unit</i> )
Kb	kilobases (1000 bases)
LACEN-BA	Laboratório Central de Saúde Pública Gonçalo Moniz
LRT	teste de razão de verossimilhança (do inglês, <i>likelihood ratio test</i> )
Mf	frequência de mutações (do inglês, <i>mutation frequency</i> )
MRPJMMN	Maternidade Referência Professor José Maria de Magalhães Netto
MTCT	transmissão materno-infantil (do inglês, <i>mother-to-child transmission</i> )
N	número total de clones (do inglês, <i>total number of clones</i> )

NA	não aplicável (do inglês, <i>not applicable</i> )
nbPT1	bebê da mãe PT1 (do inglês, <i>newborn from PT1</i> )
ND	não determinado (do inglês, <i>not determined</i> )
NS	não estrutural (do inglês, <i>non-structural</i> ), NS2 a NS5
nt	nucleotídeo
NT	transmissão negativa; mãe que não transmitiu o HCV para o bebê (do inglês, <i>negative transmission</i> ), NT3
ORF	fase de leitura aberta (do inglês, <i>open reading frame</i> )
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
PT	transmissão positiva; mãe que transmitiu o HCV para o bebê (do inglês, <i>positive transmission</i> ), PT1 e PT2
Renorbio	Rede Nordeste de Biotecnologia
RN	recém-nascido
Sn	entropia normalizada de Shannon (do inglês, <i>normalized Shannon entropy</i> )
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TMI	transmissão materno-infantil
UTR	região não-traduzida (do inglês, <i>untranslated region</i> )

## Sumário

1	Introdução .....	13
2	Revisão da literatura .....	14
2.1	O vírus da hepatite C (HCV) e a sua variabilidade genética .....	14
2.2	A hepatite C .....	17
2.3	Epidemiologia da hepatite C .....	17
2.3.1	Prevalência do HCV em gestantes .....	18
2.4	Transmissão materno-infantil (TMI) do HCV.....	19
3	Hipóteses .....	20
4	Objetivos .....	21
4.1	Objetivo geral.....	21
4.2	Objetivos específicos .....	21
5	Artigo.....	22
6	Discussão.....	51
7	Limitações do estudo .....	55
8	Apoio Financeiro .....	56
9	Referências bibliográficas .....	57
	APÊNDICE I - Termo de consentimento livre e esclarecido da gestante/parturiente e da criança.....	67
	APÊNDICE II - Carta de encaminhamento do paciente para buscar assistência médica.....	70
	APÊNDICE III – Dados suplementares (Supplementary data) .....	72
	ANEXO I – Carta de aceite da maternidade.....	77
	ANEXO II – Carta de aceite do LACEN-BA.....	79
	ANEXO III – Termo de compromisso da FIOCRUZ-BA .....	81
	ANEXO IV - Carta de aprovação do CEP-FIOCRUZ-BA .....	83

## 1 Introdução

O vírus da hepatite C (HCV) é de grande importância para a saúde pública devido a sua prevalência e elevado risco de desenvolvimento de doença crônica de fígado. Após anos de infecção pode evoluir para formas graves de doença hepática, tais como cirrose e câncer hepatocelular; além de ser a principal indicação de transplante hepático.

Apesar de ser considerada rara, a transmissão materno-infantil (TMI) é a principal via de transmissão do HCV em crianças, e, apesar disso, são controversas as recomendações em relação a sua prevenção durante a gestação, no momento do parto ou quanto à abstenção do aleitamento materno. O tratamento duplo, interferon e ribavirina, é contraindicado para gestantes e crianças até o 2º ano de vida devido as suas propriedades teratogênicas e tóxicas.

Num estudo preliminar realizado por nossa equipe, a taxa de TMI foi de 33,3% (2/6), considerada alta quando comparada a de outros estudos semelhantes. Entretanto, uma das gestantes apresentava coinfeção com HIV, que tem sido associada a taxas mais elevadas. Neste estudo, pretendemos avaliar fatores virais possivelmente associados à TMI. Devido à elevada taxa de mutação do HCV, a análise quasiespécie foi realizada para tentar evidenciar o modo e tempo de transmissão do vírus.

## 2 Revisão da literatura

### 2.1 O vírus da hepatite C (HCV) e a sua variabilidade genética

O HCV pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* (CHOO et al., 1989). Seu genoma é RNA de fita simples de polaridade positiva, mede cerca de 9,6 kilobases (Kb) e possui uma única fase de leitura aberta (*open reading frame*, ORF), flanqueada por duas regiões terminais não-traduzidas 5' e 3' (5' e 3' *untranslated region*, UTR) (Figura 1). Esta ORF codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos, que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em (1) proteínas estruturais do core e glicoproteínas de envelope 1 (E1) e envelope 2 (E2); e (2) proteínas não-estruturais: P7 e NS2 a NS5, sendo estas responsáveis pela replicação viral (KATO, 2000; STRAUSS, 2001; LLOYD et al., 2007)

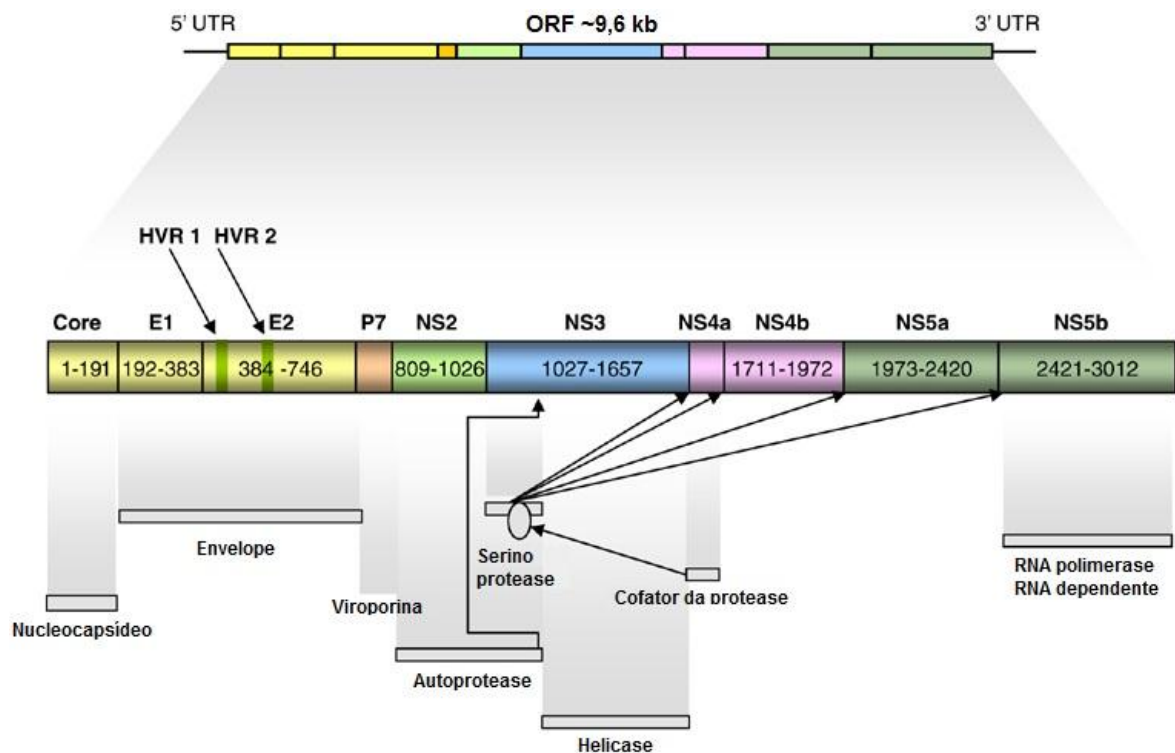


Figura 1. Genoma do HCV, estrutura polipeptídica e funções proteicas. Traduzido e modificado de LLOYD et al. (2007).

O genoma do HCV é bastante heterogêneo. Sequências nucleotídicas do genoma completo variam 30% ou mais entre amostras de genótipos diferentes; amostras de subtipos diferentes variam de 20 a 25% entre si, e até 10% dentro de um mesmo subtipo (SMITH & SIMMONDS, 1997; SIMMONDS et al., 2005).

A ampla variação genômica observada entre os isolados do HCV permite



classificá-lo em seis genótipos, de 1 a 6, e diversos subtipos (a, b, c...) (SIMMONDS *et al.*, 1993). Recentemente, foi proposta a inclusão do genótipo 7 (MURPHY *et al.*, 2007).

Inicialmente, a descrição genotípica foi importante apenas para estudos epidemiológicos do HCV, porém, mais tarde, foi evidenciado que a resposta às drogas antivirais disponíveis era genótipo-específica (MANGIA *et al.*, 2004; ZEUZEM, 2004; HONG *et al.*, 2005; HAYASHI & TAKEHARA, 2006; SHIFFMAN *et al.*, 2007; PANG *et al.*, 2009).

Apesar da diversidade genômica e a sua influência no desfecho terapêutico, permanece indefinida a sua significância clínica em relação à história natural da doença, a transmissão, a infectividade e a patogênese virais (FARCI & PURCELL, 2000). Além disso, os relatos de associação entre os genótipos do HCV e a transmissão materno infantil (TMI), motivo desta pesquisa, são controversos (SYRIOPOULOU, VASSILIKI *et al.*, 2005; BEVILACQUA *et al.*, 2009). A possibilidade de que mutações em diferentes regiões subgenômicas possam estar associadas com esta via não está excluída.

Devido às diferenças funcionais das proteínas virais e às diferentes pressões imunológicas exercidas em cada região, a variabilidade genética não está distribuída homogeneamente por todo o genoma do HCV (TORRES-PUENTE *et al.*, 2008). Os genes E1, E2 e NS5 têm sido apontadas como as regiões mais variáveis do genoma do HCV, em particular as regiões hipervariáveis 1 e 2 (HVR1 e HVR2), inseridas no gene E2 (WEINER *et al.*, 1991; KATO *et al.*, 1992; SIMMONDS, 2004; SIMMONDS *et al.*, 2005).

A variabilidade genética de outras regiões também tem sido estudada, tais como a região determinante da sensibilidade ao interferon (*interferon-sensitive determining region*, ISDR) e o domínio V3 da proteína NS5A. Ambas as regiões foram sugeridas como importantes para a responsividade ao interferon (GALE *et al.*, 1997; DUVERLIE *et al.*, 1998; GALE *et al.*, 1998; DURANTE MANGONI *et al.*, 2003).

A variabilidade genética do RNA viral (HCV-RNA) foi estimada em  $1 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos/sítio/ano para a região estrutural (GRAY *et al.*, 2011). As taxas de substituições mais altas foram encontradas nas HVRs, podendo chegar a  $6,9 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos/sítio/ano (ABE *et al.*, 1992; GRAY *et al.*, 2011). Isto decorre de falhas da própria polimerase viral, que não apresenta um domínio exonuclease que permitiria a correção de erros durante o processo de

transcrição e replicação virais (BUKH *et al.*, 1995; KATO *et al.*, 2005). Como consequência, o vírus circula em um indivíduo infectado como uma população heterogênea de sequências intimamente relacionadas denominadas quasiespécies (STEINHAEUER & HOLLAND, 1987; KATO *et al.*, 1992; MARTELL *et al.*, 1992).

A natureza quasiespécie do HCV pode ter importantes consequências biológicas, como (1) permitir que o vírus escape do sistema imunológico e estabeleça a infecção crônica (WEINER *et al.*, 1992; WEINER *et al.*, 1995; PAWLOTSKY, 1998; FARCI & PURCELL, 2000); (2) influenciar o desfecho da terapia antiviral; e (3) dificultar o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o HCV (WEINER *et al.*, 1995).

Foi demonstrado que o uso do IFN (interferon) pode acelerar a evolução das quasiespécies do HCV (LEE *et al.*, 1997; PAWLOTSKY *et al.*, 1999), levando à emergência de resistência às drogas (WEINER *et al.*, 1995; FARCI & PURCELL, 2000; FARCI *et al.*, 2002; VON WAGNER *et al.*, 2003). Quanto maior a diversidade das quasiespécies do HCV pior o desfecho terapêutico (SHINDO *et al.*, 1996; POLYAK *et al.*, 1997). Portanto, é importante acompanhar a evolução das populações de quasiespécies do HCV (CHEN & WANG, 2005).

CHEN & WANG (2005) observaram que pacientes na fase crônica da infecção apresentaram uma maior complexidade de quasiespécies em relação àqueles na fase aguda. Além disso, a variabilidade genética foi maior na HVR1 em relação ao restante da região do envelope (E1 e E2) nos pacientes com viremia persistente quando comparados com aqueles que eliminaram o vírus espontaneamente. Dessa forma, os autores concluíram que a persistência do HCV está associada com a complexidade das quasiespécies e com a seleção positiva da HVR1 pelo sistema imune do hospedeiro (CHEN & WANG, 2005).

Existem poucos dados na literatura sobre fatores virais, tais como a complexidade das quasiespécies do HCV nas crianças infectadas através da TMI (NI *et al.*, 1997; SITIA *et al.*, 2001). Segundo WEINER *et al.* (1993) e KUDO *et al.* (1997), a variabilidade genética dos vírus presentes na mãe é maior do que a nos seus bebês (WEINER *et al.*, 1993; KUDO *et al.*, 1997). Os trabalhos também divergem sobre o fato da variante dominante ser ou não aquela que é transmitida para o bebê (KUDO *et al.*, 1997; POLLACK *et al.*, 2004).

ISHII *et al.* (2005) realizaram um trabalho sobre a evolução da HVR1 em crianças infectadas pela via materno-infantil, e concluíram que, assim como ocorre

com os adultos, a evolução da HVR1 e a complexidade das quasiespécies aumentaram nessas crianças no período de 10 anos após o parto (ISHII *et al.*, 2005). POLLACK *et al.* (2004) detectaram diversificação do HCV nas crianças a partir dos 2 meses de vida.

## **2.2 A hepatite C**

A hepatite C é a doença causada pelo HCV. Na fase aguda, é indistinguível das demais hepatites virais tanto clínica quanto laboratorialmente. Geralmente, os indivíduos infectados pelo HCV permanecem assintomáticos ou oligossintomáticos. O desconhecimento da infecção pode aumentar o risco de transmitir o vírus e de desenvolver complicações graves, tais como cirrose e carcinoma hepatocelular, uma vez que os portadores não são diagnosticados e não são tratados (PRADAT & TREPO, 2000; STAUBER, 2000; STRAUSS, 2001). Um estudo realizado nos Estados Unidos relatou 25.000 casos por ano de doenças crônicas do fígado e transplantes hepáticos secundários à infecção pelo HCV (JAIN *et al.*, 2007). Além disso, estima-se que a infecção pelo HCV causa 27% dos casos de cirrose hepática e 25% dos casos de carcinoma hepatocelular no mundo inteiro (ALTER, 2007).

Em 20% a 25% dos casos, a infecção aguda pelo HCV pode evoluir para eliminação viral espontânea, um estado reconhecido quando o HCV-RNA não pode ser detectado testes sucessivos de um paciente com anticorpos anti-HCV (FLAMM, 2003; COX *et al.*, 2005; MICALLEF *et al.*, 2006; OSBURN *et al.*, 2010; AMINI & POUSTCHI, 2012). A eliminação do HCV é menos frequente entre afrodescendentes, usuários de álcool e pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (THOMAS *et al.*, 2000; PIASECKI *et al.*, 2004). Foram relatadas taxas mais elevadas de eliminação da infecção entre pessoas infectadas durante a infância, entre 25% e 65% (CHANG *et al.*, 1994; VOGT *et al.*, 1999; POSTHOUWER *et al.*, 2006; YEUNG *et al.*, 2007), sugerindo que ser jovem no momento da infecção pode ser um fator protetor. (SEEFF, 2009)

## **2.3 Epidemiologia da hepatite C**

A infecção pelo vírus HCV varia conforme a região geográfica, mas estima-se que prevalência global seja de 2,35%. Isto representa que aproximadamente 160 milhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo HCV. (LAVANCHY, 2011)

No Brasil, estudos de base populacional determinaram uma prevalência de infecção pelo HCV de 1,5% da população (FOCACCIA *et al.*, 1998; ZARIFE *et al.*, 2006; BRASIL, 2007). Entre os doadores de sangue, a soroprevalência foi de 1,23%, sendo maior na região Norte (2,12%) e menor na região Sul (0,65%) (SBH, 1999). Apesar da prevalência do HCV ser considerada alta quando comparada com outras viroses de transmissão parenteral, estas taxas podem ser ainda maiores quando consideramos grupos sob risco, pacientes submetidos à transfusão sanguínea e hemoderivados anterior à implantação da triagem sorológica em bancos de sangue, tais como os portadores de anemia falciforme (PACHECO, 2011), hemofílicos (SILVA *et al.*, 2010) e hemodialisados (SILVA *et al.*, 2010); e usuários de drogas (SILVA *et al.*, 2010). Outros fatores de risco são bem conhecidos na transmissão do HCV: transplante de órgãos, acidentes com material contaminado entre profissionais de saúde e, menos frequentemente, sexo não-seguro e a TMI (THOMAS *et al.*, 2000; TENGAN *et al.*, 2001). Estudos publicados demonstram que a TMI é a principal via de transmissão do HCV em crianças (BATALLAN *et al.*, 2003; INDOLFI *et al.*, 2006).

### **2.3.1 Prevalência do HCV em gestantes**

A prevalência do HCV em gestantes no mundo varia entre 0,3% e 2,7% (REINUS *et al.*, 1992; UEHARA *et al.*, 1993; OHTO *et al.*, 1994; SABATINO *et al.*, 1996; LA TORRE *et al.*, 1998; CONTE *et al.*, 2000; OKAMOTO *et al.*, 2000), à exceção do Egito, cuja prevalência relatada foi de 4,0% (KUMAR *et al.*, 1997). No Brasil, este valor varia entre 0,15% e 1,74%, conforme a região geográfica (PEIXOTO *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2009; GARDENAL *et al.*, 2011)

Os fatores de risco para aquisição do HCV em gestantes não difere daqueles descritos anteriormente para a população em geral: uso de drogas injetáveis (BORTOLOTTI *et al.*, 1997; SYRIOPOULOU, V. *et al.*, 2005), transfusões sanguíneas, história de DST, anti-HBc positivo e a prática sexual com múltiplos parceiros (BOHMAN *et al.*, 1992; LIMA *et al.*, 2000; CECI *et al.*, 2001).

Um estudo realizado na Índia com 3.115 gestantes assintomáticas, 0,6% apresentaram sorologia positiva e 0,26% tiveram viremia confirmada pela detecção do HCV-RNA. A TMI foi observada em 25% (2/8) dos bebês nascidos das mães infectadas (PARTHIBAN *et al.*, 2009). Dados de Salvador foram bastante semelhantes, sendo que a soroprevalência neste estudo foi de 0,22% (7/3.254) e a

viremia foi confirmada em 0,18% (6/3.254). A taxa de TMI foi estimada em 33,3% (2/6) (PASSINI, 2012).

#### **2.4 Transmissão materno-infantil (TMI) do HCV**

A taxa de TMI do HCV varia entre 3,6% e 10,2% em mulheres com viremia, e pode ultrapassar 35% em mulheres coinfetadas com o HIV (GIBB *et al.*, 2000; ROBERTS & YEUNG, 2002; SYRIOPOULOU, VASSILIKI *et al.*, 2005). Além da coinfecção com HIV, carga viral elevada, tempo de bolsa rota superior a 6 horas, complicações no parto e, presumivelmente, parto vaginal foram associados com o aumento da taxa de TMI do HCV (OHTO *et al.*, 1994; MATSUBARA *et al.*, 1995; MORIYA *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*, 2000; CECI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2004; DI DOMENICO *et al.*, 2006).

O momento exato no qual o HCV é transmitido não está bem esclarecido na literatura. Diferentes trabalhos sugerem que a TMI pode ocorrer durante a gestação (transmissão intrauterina precoce ou tardia) (WEINER *et al.*, 1993; RESTI *et al.*, 1998), durante a passagem do bebê pelo canal do parto (transmissão intraparto) (GIBB *et al.*, 2000; STEININGER *et al.*, 2003) e após o parto durante a amamentação da criança pela mãe ou outra mulher ou pelo compartilhamento de utensílios domésticos (transmissão pós-parto) (KUMAR & SHAHUL, 1998). Embora a transmissão intraparto e pós-parto não possam ser excluídas, os dados da literatura sugerem que a sua ocorrência é menos frequente que a transmissão intrauterina (MOK *et al.*, 2005). Mesmo que o tipo de parto não tenha demonstrado nenhuma influência na transmissão, o parto cesariano eletivo tem sido defendido pelo fato de minimizar o contato entre o bebê e o sangue e secreções maternas (BATALLAN *et al.*, 2003; STEININGER *et al.*, 2003). O desenvolvimento de estratégias de prevenção da TMI do HCV depende da compreensão do modo e tempo da transmissão e quais fatores podem estar associados.

### **3 Hipóteses**

- A diversidade de quasiespécies do HCV está associada com a TMI;
- A comparação da diversidade de quasiespécies do HCV entre mãe e RN permite evidenciar o tempo e modo de transmissão viral;
- Mutações pontuais no genoma do HCV estão associadas com a TMI.

## **4 Objetivos**

### **4.1 *Objetivo geral***

Avaliar fatores virais implicados na TMI do HCV, especialmente a diversidade de quasiespécies e as mutações pontuais.

### **4.2 *Objetivos específicos***

- Padronizar uma metodologia para clonagem e análise de quasiespécies do HCV das regiões subgenômicas 5'UTR, E1, HVR1, E2 e NS5B;
- Determinar o papel dos genótipos, dos subtipos e das quasiespécies como fatores de risco para a TMI;
- Analisar a heterogeneidade do isolado do HCV materno e do RN.

## **5 Artigo**

A metodologia e os resultados foram escritos na forma de artigo completo para publicação em revista indexada. No entanto, o artigo não foi submetido até o momento da defesa da dissertação a fim de permitir a incorporação das sugestões da banca examinadora do mestrado.



## a) Title

The role of hepatitis C virus (HCV) quasispecies in intrauterine transmission

## b) Authors

Tamiris Tatiane Dias<sup>1</sup>; Sione Souza Santos Passini<sup>1,2</sup>; Maria Alice Sant'Anna Zarife<sup>3</sup>;  
Mitermayer Galvão dos Reis<sup>1,4</sup>; Luciano Kalabric Silva<sup>1</sup>

## c) Affiliation

<sup>1</sup> Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM/Fiocruz-BA), Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup> Professor José Maria de Magalhães Netto Reference Maternity Hospital (MRPJMMN), Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>3</sup> Central Public Health State Laboratory (Lacen-BA), Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>4</sup> Northeast Biotechnology Network (Renorbio) Executive Coordinator, Brazil.

## d) Corresponding author

Luciano Kalabric Silva

Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil.

Rua Waldemar Falcão, 121 – Candeal, Salvador, Bahia, Brazil 40.296-710. Tel/ Fax: 55 71 3176 2289.

Keywords: hepatitis C virus, HCV, quasispecies diversity, mother-to-child transmission, association analysis.

Tamiris Tatiane Dias; Sione Souza Santos Passini; Maria Alice Sant'Anna Zarife; Mitermayer Galvão dos Reis; Luciano Kalabric Silva

## ABSTRACT

Introduction: Mother-to-child-transmission (MTCT) is the most common cause of hepatitis C virus (HCV) infection in children. Objective: This study aimed to evaluate viral factors implicated in HCV MTCT. Methods: Four HCV-infected pregnant women and one HCV-infected mother-newborn pair were included in this study. Sequences were obtained from the regions 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B by direct PCR product sequencing and cloning. Quasispecies diversity was analyzed by different parameters (clonotype ratio, mutation frequency, Pn and normalized Shannon entropy), comparing (1) MTCT+ vs. MTCT- groups, and (2) mother-newborn pair. A framework was used to establish association between nucleotide frequency and MTCT. Results: Two cases of MTCT were identified, but a sample from only one newborn was available. Viral loads from all subjects were above the quantification limit. Both cases of MTCT belonged to genotype 1a and only this subtype was further analyzed. Direct sequencing from PCR products did not reliably represent the quasispecies complexity and was not used. There were no coincident clonotypes between MTCT+ and MTCT- groups, except for 5'UTR. At the amino acid level, mother and newborn shared only the master clonotype. All minor clonotypes were exclusive. Higher quasispecies diversity was observed within E2 and NS5B regions. HVR1 presented the lowest diversity within the coding region. Quasispecies diversity from the MTCT+ group was always greater than seen in the MTCT- group; however, no statistically significance was observed. Thirty-five mutations in the coding regions were significantly associated with MTCT. Data from the mother-newborn pair suggest that the intrauterine transmission occurred in an earlier time point of the pregnancy and that the virus probably crossed the placental tissue leading to a bottleneck. Conclusions: Quasispecies diversity was not associated with MTCT but the presence of significant mutations along the coding region suggests that the whole genome contributes to the ability of intrauterine transmission. Further studies are required to establish if these variants could be useful to predict MTCT.

Keywords: hepatitis C virus, HCV, quasispecies diversity, mother-to-child transmission, association analysis.

## INTRODUCTION

Infection with hepatitis C virus (HCV) is a major health concern worldwide, and after implementation of universal testing of blood products, mother-to-child-transmission (MTCT) has become the most common cause of HCV infection in children. MTCT rate ranges from 3.6% to 10.2% in women with HCV viremia, and may reach over 35% in HIV co-infected women (GIBB *et al.*, 2000; ROBERTS & YEUNG, 2002; SYRIOPOULOU, VASSILIKI *et al.*, 2005). A previous study from our group showed that MTCT rate in Salvador, Brazil, is 33% comparable to another one from India, 25% (PARTHIBAN *et al.*, 2009; PASSINI, 2012).

Genetic variability is a hallmark of RNA virus populations, including HCV (BLACKARD *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2012). The first description quasispecies for HCV was made by (MARTELL *et al.*, 1992). The distribution of mutations has been reported to be uneven but the basis of this variability is unexplained (BUKH *et al.*, 1995). A hot-spot for mutation is described within the genome encoding a portion of E2 termed the hypervariable region 1 (HVR1), which encodes antibody-binding epitopes (WEINER *et al.*, 1991; WEINER *et al.*, 1992). It is postulated that genetic variation, translated into protein variability, results in the production of HCV quasispecies. Interaction between host and virus selects those quasispecies better adapted to survival (CHEN & WANG, 2002). Variation of HVR1, presumably due to antibody selection, has been associated with the development of HCV persistence in humans (FARCI *et al.*, 2000)

This study aimed to evaluate viral factors implicated in HCV MTCT, particularly the quasispecies diversity and point mutations. Unlike most studies of viral quasispecies of HCV that have focused on the most variable part of the HCV genome, HVR1 (KATO *et al.*, 1994; KAO *et al.*, 1995; MANZIN *et al.*, 1998), we studied not only this region, but also E1, E2 outside HVR1, NS5B and 5'UTR. That allowed us to analyze the quasispecies diversity throughout the HCV genome, from the most variable region to the most conserved one.

## METHODS

*Subjects.* Six pregnant women with confirmed HCV viremia who gave birth at Professor José Maria de Magalhães Netto Reference Maternity Hospital, Salvador, Brazil, from May, 2009 to April, 2011, were included in the study along with their newborns.

*RT-PCR, cloning and nucleotide sequencing.* HCV-RNA was isolated using QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Viral RNA was reverse transcribed using random primers and amplified with gene-specific primers directed to the 5'UTR, E2 (outside HVR1) and NS5B described elsewhere (CHAN *et al.*, 1992; HUNG *et al.*, 2003; SANDRES-SAUNE *et al.*, 2003) and also modified primers targeting E1-HVR1 (outer: GGYCAYCGYATGGCNTGGGA and GGNGSGTAGTGCCAGCARTAKGG; inner: GCDTGGGAYATGATGATGAAYTGGTC and KGTBTKRAGRSWDTCATTGCARTT) (BERNINI *et al.*, 2011). Expected lengths varied according to the region: 205 nt, 169 nt, 81 nt, 232 nt and 340 for 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B, respectively. PCR products were cloned using Promega's pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System and PureYield<sup>™</sup> Plasmid Miniprep System, following the manufacturer's instructions. PCR products and approximately twenty clones were purified and sequenced using BigDye<sup>™</sup> Cycle Sequencing kit, v. 3.1 and ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems, USA) with the same primers. To minimize Taq errors, all clones were also sequenced using primers SP6 (TATTTAGGTGACACTATAG) and T7 (TAATACGACTCACTATAGGG), which anneal to the vector sequence flanking the insert.

*Clonotype determination and distribution.* A different clonotype (CT) number was assigned for each unique sequence within each subgenomic region. The most frequent CT from each participant represents the master sequence (or master CT). The number of CTs (#CT) and CT distribution were computed per subject and per subgenomic region in Excel 2010 (Microsoft Office Package, USA).

*Quasispecies parameters and analysis.* The quasispecies diversity was analyzed using different parameters: CT ratio (CHEN & WANG, 2002; LIU *et al.*, 2004); normalized Shannon entropy ( $S_n$ ) (PAWLOTSKY *et al.*, 1998; CABOT *et al.*, 2000); mutation frequency (Mf) (CABOT *et al.*, 2001); and  $P_n$  (CABOT *et al.*, 2000; REVIE *et al.*, 2006). CT ratio was calculated as #CT divided by the total number of clones

( $M$ ) (CHEN & WANG, 2002; LIU *et al.*, 2004).  $S_n$  has been defined in terms of the probabilities of the different CTs and the total number of clones, and was calculated as  $S_n = S/\ln N$ , where  $S$  is the non-normalized Shannon entropy and  $N$  is the total number of clones analyzed.  $S$  was calculated as  $S = -\sum_i(p_i \ln p_i)$ , where  $p_i$  is the frequency of each CT within a region (PAWLOTSKY *et al.*, 1998; CABOT *et al.*, 2000).  $P_n$  and  $M_f$  measure sequence variability.  $P_n$  was calculated as the number of polymorphic sites divided by the total number of sequenced nucleotides (or amino acids), while  $M_f$  was calculated as the total number of mutations relative to a reference variant (the master sequence was used whenever available) divided by the total number of nucleotides (or amino acids) (CABOT *et al.*, 2000; REVIE *et al.*, 2006). All parameters varies from 0 (no diversity) to 1 (maximum diversity).

*Test for positive or purifying selection.* The ratio of synonymous and non-synonymous mutations (dN/dS) among the coding sequences was estimated using the program PAML version 4 (YANG, 2007). The maximum likelihood model M0 was used to calculate the dN/dS of the entire alignment. To test for evidence of positive selective pressure, we compared the likelihood values (likelihood Ln) from models M1a (neutral) versus M2a (selection) and M7 (beta) against M8 (beta and omega) using the likelihood ratio test (LRT),  $2\Delta\text{Ln}$ , with critical values of 5.99 and 9.21 for significance levels of 5% and 1%, respectively (YANG *et al.*, 2005; YANG, 2007). The "Bayes Empirical Bayes" method was applied when the LRT suggested evidence of selective pressure to indicate which codon is under pressure of positive selection (YANG *et al.*, 2005). These methods were used for addressing individual samples (per sample per region) and for the comparison between samples.

*Association study of MTCT.* Quasispecies diversity and nucleotide frequencies were evaluated for association with MTCT. An association framework was used to compare nucleotide and amino acid frequencies among clones from MTCT+ vs. MTCT- groups. The nucleotide and amino acid positions were numbered based on full length genome of HCV-1a (GenBank accession number M62321).

*Statistical analysis.* Descriptive data was presented individually for each HCV subgenomic region. Statistical significance test were applied for the comparisons between groups: (1) MTCT+ vs. MTCT-; and (2) mother-newborn pair. Chi-square test was used to test proportions and Student's t-test was used for the difference between means. Due to multiple testing, Bonferroni correction and false discovery rate (FDR) procedures were applied to allow the use of more restrictive tests

(BENJAMINI & HOCHBERG, 1995). All statistical calculations were performed by using Excel 2010 (Microsoft Office Package, USA).

## RESULTS

*Laboratorial data.* Out of the six women with confirmed HCV viremia included in this study, 2 (33.3%) transmitted the virus to their newborns. Transmission was evaluated in the blood from the umbilical cord, and, therefore, was suggestive of intrauterine transmission. Table 1 summarizes the data from quantification and genotyping. Viral load was above the quantification limit in all samples and it was not associated to MTCT ( $p > 0.05$ ). Genotype and subtype were confirmed through phylogenetic analysis, all isolates belonged to genotype 1, subtypes 1a and 1b; both cases of MTCT belonged to genotype 1a (Supplementary Figure 1). Mother PT1 was HIV-coinfected. For the newborn from PT1 (nbPT1), the HCV genotype was consistent with his mother's and HIV was not transmitted. For the other newborn, the sample was only enough to confirm the diagnosis and no further tests could be performed. Sample from one mother who did not transmit the virus to her newborn underwent RNA degradation and couldn't be used for further analysis.

*PCR and consensus sequence representativeness.* Isolates from five mothers and one newborn were amplified and cloned for five different HCV subgenomic regions: 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B. For each subject and region, clones were aligned and a consensus sequence was obtained. A CT master was identified in 83.3% (25/30) of our alignments. It was coincident with 84% (21/25) of the consensus sequences and 68% (17/25) of the PCR product sequences. Moreover, the PCR product sequence was concordant only 63.3% (19/30) to the consensus sequence.

*Genotype-specific sequence variations.* Preliminary analysis of our data showed that there was a significant difference in quasispecies diversity among subtypes 1a and 1b in some parameters (Supplementary Table 1). Since MTCT occurred only within genotype 1a subjects, we decided to exclude all 1b-related data from our analysis.

*Quasispecies diversity.* Values for CT ratio,  $S_n$ ,  $M_f$  and  $P_n$  at the nucleotide and the amino acid levels are shown in Table 2 and Table 3, respectively. HVR1 presented the lowest diversity rates among the coding region, while E2 (outside HVR1) and NS5B presented the highest values. There also was a higher number of CTs within regions E2 and NS5B when compared to the other regions. All quasispecies diversity parameters from 5'UTR were lower than those from other regions. We only found a statistically significant difference in CT ratio and  $S_n$  from 5'UTR compared to the E2 and NS5B regions (Supplementary Table 2).

*Clonotype distribution.* Figure 1 compares the CT distribution of MTCT+ vs. MTCT- groups and Figure 2 compares the CT distribution of mother-newborn pair, both at the nucleotide and the amino acid levels per region. There were no coincident CTs among MTCT+ and MTCT- groups in all regions at both levels (except for conserved 5'UTR). When mother and newborn were compared, they had at least their CT master in common at the nucleotide level. At the amino acid level, only the CT master was shared and all the other minor CTs were exclusive.

*Test for positive or purifying selection.* Although HVR1 presented the lowest diversity among the coding regions, it was the only region in which selective pressure was identified by likelihood models (Table 4). The only samples presenting  $dN/dS > 1.0$  was the pair mother-newborn, but only data from the mother was significant (LRT > 5.99). Furthermore, Table 5 shows the 10 sites and their respective amino acids that significantly presented positive selection.

*Risk of MTCT.* Risk of MTCT was evaluated by comparing quasispecies diversity and by nucleotide association analysis. There were no statistically significant differences in either of the parameters between MTCT+ and MTCT- groups, both at the nucleotide and the amino acid level for all the subgenomic regions (Supplementary Table 3). However, for most parameters and regions, the quasispecies diversity from the mothers from the MTCT+ group was greater than that from MTCT- group.

Using a critical value for Bonferroni's method, 35 mutations were significantly associated to the HCV MTCT, all in the coding region (Figure 3). Out of these, 63% led to a different amino acid between the groups. Table 6 presents the list of mutations that were detected.

*The newborn HCV diversity.* Clones from the newborn presented higher diversity than the ones from the respective mother within the 5'UTR and E1 region at the nucleotide level, and within the E1 and E2 regions at the amino acid level (Table 2 and Table 3). However, no significant nucleotide frequency differences were found between mother and newborn (Supplementary Figure 2).



## DISCUSSION

There is not much data available in the literature about the quasispecies analysis of the HCV in the MTCT. Most studies are based on other populations than mother and newborn, and, yet, some are experimental. We aimed to explore MTCT, trying to elucidate its main aspects and create hypothesis regarding, for example, what implications different levels of quasispecies diversity could have.

Both cases of MTCT were related to the genotype 1a. Mothers who did not transmit the virus were infected by genotypes 1a and 1b. Besides being a globally distributed genotype, a group from Argentina showed that genotype 1 was predominant in children infected by MTCT (GISMONDI *et al.*, 2004).

Since the diagnosis of MTCT was performed in the umbilical cord blood, it confirms intrauterine transmission. HCV MTCT rate has been associated to HIV co-infection, high viral load, membrane rupture for over 6 hours, delivery complications and vaginal delivery (OHTO *et al.*, 1994; MATSUBARA *et al.*, 1995; MORIYA *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*, 2000; CECI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2004; DI DOMENICO *et al.*, 2006; MURAKAMI *et al.*, 2012). Moreover, HCV has been detected in the amniotic fluid (DELAMARE *et al.*, 1999). Little is known about viral factors such as the evolution of HCV quasispecies in vertically infected infants (NI *et al.*, 1997; SITIA *et al.*, 2001).

It may be a trap to perform quasispecies analysis using only the direct sequencing of PCR products. In our data, only 68% of the sequences directly obtained from the PCR product were coincident with the CT master and also, in some cases, it did not represent even a minor CT among the clones. Its simplicity surely is tempting, but it doesn't have the ability to show as much variability as if one's using cloning or next-generation sequencing methods.

Moreover, when a quasispecies analysis is conducted, one cannot exclude the possibility of sequencing errors due to the Taq DNA polymerase relatively low fidelity. It lacks a 3' to 5' exonuclease proofreading activity, and depending on the enzyme, it is estimated that one error can be introduced per 9,000 nucleotides. To minimize this type of error, our clone sequences were obtained by assembling four redundant sequences per region per sample.

Quasispecies parameters results from the HVR1 were lower than the ones from E2. In fact, HVR1 was the region presenting the lower results within the coding region. Our findings were discordant from WEINER *et al.* (1992), that presented it as a highly variable region. On the other hand, CHEN & WANG (2005) found that serum samples collected from chronically infected patients had higher quasispecies complexity than those collected from individuals in the acute phase of infection. They found that the genetic diversity within HVR1 was consistently higher than that in the complete envelope region outside HVR1 in individuals with persistent viremia, but did not change markedly over time in those with clearance of viremia. They concluded that HCV persistence is associated with quasispecies complexity and positive selection of HVR1 by the host immune system (CHEN & WANG, 2005). Clones from one MTCT+ mother presented lower quasispecies diversity with HVR1, raising the possibility that she could be in the acute phase of infection during delivery. The epidemic curve of acute hepatitis and her young age can support that hypothesis.

Clones from the newborn presented higher diversity than her mother's within the 5'UTR and E1 region at the nucleotide level and within the E1 and E2 regions at the amino acid level. This variability is due to the emergency of new CTs, inasmuch as the minor CTs were not shared between mother and newborn at the amino acid level. This divergence may be an indicative of the time and mode of transmission.

Transmission most likely occurred in the beginning of the pregnancy. Evolution forces such as bottleneck and founder effects were followed by *de novo* mutations. The emerging quasispecies from the newborn would have enough time to replicate and evolve differently than those from the mother, resulting in exclusive minor CTs and higher diversity the clone population from the newborn. A late transmission cannot be ignored, though. Nevertheless, it would demand a highly replicative status to grant the virus the same level of diversity. Due to small sample size, a molecular clock analysis was not possible.

Still taking into account the important bottleneck and founder effects, we suggest that transmission occurred through the placental tissue. If it had occurred through lesions in the placenta leading to a direct blood-to-blood contact, it would be expected those quasispecies populations from mother and newborn to be more alike: closely related or even identical, especially if multiple reinfections had occurred.

WEINER *et al.* (1993) studied the sequences of HVR1 from three mothers and one mother-infant pair. A single predominant HCV variant was found in the infant of a

mother shown to have nine predominant variants, and that the infant's variant was highly related, but not identical, to the nine variants identified in the mother at the time of birth (WEINER *et al.*, 1993). KUDO *et al.* (1997) sequenced the HVR1 and the E1 from two mother-infant pairs. Both viral sequences in the infants were less diverse than those of their mothers. The HVR1 sequences of the infants were related, but not identical, to those of the mothers (KUDO *et al.*, 1997). KUDO *et al.* (1997) also showed that the strains of HCV detected in the infants were not dominant ones in the mothers, but they were still transmissible (KUDO *et al.*, 1997). These apparent discrepant results could be a reflection of the small sample size from most of the studies in the area, but also could be due to stochastic events of transmission.

POLLACK *et al.* (2004) studied the HVR1 from three HCV-HIV co-infected children and the mothers of two of them. Phylogenetic analysis of the mother-child pairs suggested that transmission of multiple dominant and non-dominant variants identified in the mother. HCV diversification in the children was observed as early as 2 months of life (POLLACK *et al.*, 2004). We found that HCV diversification can also happen earlier, during pregnancy, since our samples are from the umbilical cord blood.

HVR1 from PT1 was the only sample with evidence of positive selection, possibly due to her HIV co-infection status. nbPT1 also presented dN/dS greater than 1.0, however, without LRT statistical support.

An association framework was used for “mapping” possible hot-spots in the HCV genome that could be associated with MTCT. Using a conservative critical value, thirty-five point mutations in the coding region were significantly associated with MTCT. The main limitation of this approach is that events of recombination in HCV are considered rare, so they are not common enough to break down linkage disequilibrium and create subgenomic blocks (GONZALEZ-CANDELAS *et al.*, 2011; MOREL *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012). Under linkage disequilibrium, putative loci responsible for MTCT as well as nearby loci are transmitted together and these latter sites could be falsely associated with our outcome, MTCT. Since there were significant point mutations distributed throughout the four analyzed coding regions, this may represent that the whole genome contributes to the ability for HCV transmission. If this is the case, the detection of these variants would be useful to predict MTCT.

Finally, no association was found between MTCT and viral load or the quasispecies complexity parameters analyzed. Only the CT distribution was able to show significant differences between MTCT+ and MTCT- groups. Moreover, analysis of direct sequencing of PCR products proved insufficient for quasispecies analysis. The detection of mutations associated to HCV MTCT reinforces the idea that it is determined by viral factors and it can be useful to predict MTCT. Further studies with larger samples are required to confirm these findings.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the institutions (Fiocruz-BA, Lacen-BA, MRPJMMN), the funding agencies (CAPES, CNPq-PRONEX), the team involved, the subjects, and every single person that made it possible for the study to happen.

## REFERENCES

- Los Alamos National Laboratory. National Institute of Health, Dept of Health and Human Services. <http://www.hiv.lanl.gov>
- Allain, J. P., Dong, Y., Vandamme, A. M., Moulton, V., and Salemi, M. (2000). Evolutionary rate and genetic drift of hepatitis C virus are not correlated with the host immune response: studies of infected donor-recipient clusters. *J Virol* **74**(6), 2541-9.
- Amini, M., and Poustchi, H. (2012). Hepatitis C virus spontaneous clearance: immunology and genetic variance. *Viral Immunol* **25**(4), 241-8.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**(1), 289-300.
- Bernini, F., Ebranati, E., De Maddalena, C., Shkjezi, R., Milazzo, L., Lo Presti, A., Ciccozzi, M., Galli, M., and Zehender, G. (2011). Within-host dynamics of the hepatitis C virus quasispecies population in HIV-1/HCV coinfecting patients. *PLoS One* **6**(1), e16551.
- Blackard, J. T., Ma, G., Welge, J. A., Martin, C. M., Sherman, K. E., Taylor, L. E., Mayer, K. H., and Jamieson, D. J. (2012). Analysis of a non-structural gene reveals evidence of possible hepatitis C virus (HCV) compartmentalization. *J Med Virol* **84**(2), 242-52.
- Brown, R. J., Hudson, N., Wilson, G., Rehman, S. U., Jabbari, S., Hu, K., Tarr, A. W., Borrow, P., Joyce, M., Lewis, J., Zhu, L. F., Law, M., Kneteman, N., Tyrrell, D. L., McKeating, J. A., and Ball, J. K. (2012). Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Fitness Defines Virus Population Composition following Transmission to a New Host. *J Virol* **86**(22), 11956-66.
- Bukh, J., Miller, R. H., and Purcell, R. H. (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* **15**(1), 41-63.
- Cabot, B., Martell, M., Esteban, J. I., Piron, M., Otero, T., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (2001). Longitudinal evaluation of the structure of replicating and circulating hepatitis C virus quasispecies in nonprogressive chronic hepatitis C patients. *J Virol* **75**(24), 12005-13.

- Cabot, B., Martell, M., Esteban, J. I., Sauleda, S., Otero, T., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (2000). Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol* **74**(2), 805-11.
- Ceci, O., Margiotta, M., Mareello, F., Francavilla, R., Loizzi, P., Francavilla, A., Mautone, A., Impedovo, L., Ierardi, E., Mastroianni, M., Bettocchi, S., and Selvaggi, L. (2001). Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33**(5), 570-5.
- Chan, S. W., McOmish, F., Holmes, E. C., Dow, B., Peutherer, J. F., Follett, E., Yap, P. L., and Simmonds, P. (1992). Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* **73 ( Pt 5)**, 1131-41.
- Chang, M. H., Ni, Y. H., Hwang, L. H., Lin, K. H., Lin, H. H., Chen, P. J., Lee, C. Y., and Chen, D. S. (1994). Long term clinical and virologic outcome of primary hepatitis C virus infection in children: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* **13**(9), 769-73.
- Chen, S., and Wang, Y. M. (2002). Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. *World J Gastroenterol* **8**(4), 686-93.
- Chen, S., and Wang, Y. M. (2005). Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* **11**(19), 2874-84.
- Cox, A. L., Mosbrugger, T., Lauer, G. M., Pardoll, D., Thomas, D. L., and Ray, S. C. (2005). Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* **42**(1), 104-12.
- Delamare, C., Carbonne, B., Heim, N., Berkane, N., Petit, J. C., Uzan, S., and Grange, J. D. (1999). Detection of hepatitis C virus RNA (HCV RNA) in amniotic fluid: a prospective study. *J Hepatol* **31**(3), 416-20.
- Di Domenico, C., Di Giacomo, C., Marinucci, G., and Di Paolo, A. (2006). Vertical transmission of HCV infection: prospective study in infants born to HIV-1 seronegative women. *Ig Sanita Pubbl* **62**(2), 129-42.
- Farci, P., Shimoda, A., Coiana, A., Diaz, G., Peddis, G., Melpolder, J. C., Strazzer, A., Chien, D. Y., Munoz, S. J., Balestrieri, A., Purcell, R. H., and Alter, H. J. (2000). The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* **288**(5464), 339-44.

- Gibb, D. M., Goodall, R. L., Dunn, D. T., Healy, M., Neave, P., Cafferkey, M., and Butler, K. (2000). Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. *Lancet* **356**(9233), 904-7.
- Gismondi, M. I., Turazza, E. I., Grinstein, S., Galoppo, M. C., and Preciado, M. V. (2004). Hepatitis C virus infection in infants and children from Argentina. *J Clin Microbiol* **42**(3), 1199-202.
- Gonzalez-Candelas, F., Lopez-Labrador, F. X., and Bracho, M. A. (2011). Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* **3**(10), 2006-24.
- Hung, C. H., Lee, C. M., Lu, S. N., Lee, J. F., Wang, J. H., Tung, H. D., Chen, T. M., Hu, T. H., Chen, W. J., and Changchien, C. S. (2003). Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. *J Viral Hepat* **10**(2), 87-94.
- Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y., Wang, T. H., and Chen, D. S. (1995). Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. *J Infect Dis* **172**(1), 261-4.
- Kato, N., Ootsuyama, Y., Sekiya, H., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (1994). Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. *J Virol* **68**(8), 4776-84.
- Korber, B. (2000). HIV Signature and Sequence Variation Analysis. In "Computational Analysis of HIV Molecular Sequences" (A. G. R. a. G. H. Learn, Ed.), pp. 55-72. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Kudo, T., Yanase, Y., Ohshiro, M., Yamamoto, M., Morita, M., Shibata, M., and Morishima, T. (1997). Analysis of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: quasispecies nature and buoyant densities of maternal virus populations. *J Med Virol* **51**(3), 225-30.
- Kuiken, C., Yusim, K., Boykin, L., and Richardson, R. (2005). The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* **21**(3), 379-84.
- Lima, M. P., Pedro, R. J., and Rocha, M. D. (2004). Mother-to-Infant transmission of hepatitis C virus (HCV) in Brazil. *J Trop Pediatr* **50**(4), 236-8.
- Liu, Z., Netski, D. M., Mao, Q., Laeyendecker, O., Ticehurst, J. R., Wang, X. H., Thomas, D. L., and Ray, S. C. (2004). Accurate representation of the hepatitis C virus quasispecies in 5.2-kilobase amplicons. *J Clin Microbiol* **42**(9), 4223-9.



- Manzin, A., Solforosi, L., Petrelli, E., Macarri, G., Tosone, G., Piazza, M., and Clementi, M. (1998). Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection. *J Virol* **72**(7), 6271-6.
- Martell, M., Esteban, J. I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., and Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* **66**(5), 3225-9.
- Matsubara, T., Sumazaki, R., and Takita, H. (1995). Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a prospective study. *Eur J Pediatr* **154**(12), 973-8.
- Micallef, J. M., Kaldor, J. M., and Dore, G. J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *J Viral Hepat* **13**(1), 34-41.
- Morel, V., Fournier, C., Francois, C., Brochet, E., Helle, F., Duverlie, G., and Castelain, S. (2011). Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. *J Viral Hepat* **18**(2), 77-83.
- Moriya, T., Sasaki, F., Mizui, M., Ohno, N., Mohri, H., Mishiro, S., and Yoshizawa, H. (1995). Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants: its frequency and risk factors revisited. *Biomed Pharmacother* **49**(2), 59-64.
- Murakami, J., Nagata, I., Iitsuka, T., Okamoto, M., Kaji, S., Hoshika, T., Matsuda, R., Kanzaki, S., Shiraki, K., Suyama, A., and Hino, S. (2012). Risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus: Maternal high viral load and fetal exposure in the birth canal. *Hepatol Res* **42**(7), 648-57.
- Ni, Y. H., Chang, M. H., Chen, P. J., Lin, H. H., and Hsu, H. Y. (1997). Evolution of hepatitis C virus quasispecies in mothers and infants infected through mother-to-infant transmission. *J Hepatol* **26**(5), 967-74.
- Ohto, H., Terazawa, S., Sasaki, N., Sasaki, N., Hino, K., Ishiwata, C., Kako, M., Ujiie, N., Endo, C., Matsui, A., and et al. (1994). Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. *N Engl J Med* **330**(11), 744-50.
- Okamoto, M., Nagata, I., Murakami, J., Kaji, S., Iitsuka, T., Hoshika, T., Matsuda, R., Tazawa, Y., Shiraki, K., and Hino, S. (2000). Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. *J Infect Dis* **182**(5), 1511-4.

- Osburn, W. O., Fisher, B. E., Dowd, K. A., Urban, G., Liu, L., Ray, S. C., Thomas, D. L., and Cox, A. L. (2010). Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. *Gastroenterology* **138**(1), 315-24.
- Pawlotsky, J. M., Germanidis, G., Neumann, A. U., Pellerin, M., Frainais, P. O., and Dhumeaux, D. (1998). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* **72**(4), 2795-805.
- Pollack, H., Hou, Z., Hughes, A. L., and Borkowsky, W. (2004). Perinatal transmission and viral evolution of hepatitis C virus quasispecies in infants coinfecting with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* **36**(4), 890-9.
- Posthouwer, D., Fischer, K., van Erpecum, K. J., and Mauser-Bunschoten, E. P. (2006). The natural history of childhood-acquired hepatitis C infection in patients with inherited bleeding disorders. *Transfusion* **46**(8), 1360-6.
- Revie, D., Alberti, M. O., Braich, R. S., Chelyapov, N., Bayles, D., Prichard, J. G., and Salahuddin, S. Z. (2006). Analysis of in vitro replicated human hepatitis C virus (HCV) for the determination of genotypes and quasispecies. *Virology* **3**, 81.
- Roberts, E. A., and Yeung, L. (2002). Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology* **36**(5 Suppl 1), S106-13.
- Salemi, M., and Vandamme, A. M. (2002). Hepatitis C virus evolutionary patterns studied through analysis of full-genome sequences. *J Mol Evol* **54**(1), 62-70.
- Sandres-Saune, K., Deny, P., Pasquier, C., Thibaut, V., Duverlie, G., and Izopet, J. (2003). Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. *J Virol Methods* **109**(2), 187-93.
- Shi, W., Freitas, I. T., Zhu, C., Zheng, W., Hall, W. W., and Higgins, D. G. (2012). Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. *PLoS One* **7**(7), e41997.
- Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., Mizokami, M., Murphy, D. G., Okamoto, H., Pawlotsky, J. M., Penin, F., Sablon, E., Shin, I. T., Stuyver, L. J., Thiel, H. J., Viazov, S., Weiner, A. J., and Widell, A. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **42**(4), 962-73.

- Sitia, G., Cella, D., De Mitri, M. S., Novati, R., Foppa, C. U., Perackis, K., Bianchi, C., Lazzarin, A., and Morsica, G. (2001). Evolution of the E2 region of hepatitis C virus in an infant infected by mother-to-infant transmission. *J Med Virol* **64**(4), 476-81.
- Syriopoulou, V., Nikolopoulou, G., Daikos, G. L., Theodoridou, M., Pavlopoulou, I., Nicolaidou, P., and Manolaki, N. (2005). Mother to child transmission of hepatitis C virus: Rate of infection and risk factors. *Scand J Infect Dis* **37**(5), 350-353.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**(10), 2731-9.
- Vogt, M., Lang, T., Frosner, G., Klingler, C., Sendl, A. F., Zeller, A., Wiebecke, B., Langer, B., Meisner, H., and Hess, J. (1999). Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* **341**(12), 866-70.
- Weiner, A. J., Brauer, M. J., Rosenblatt, J., Richman, K. H., Tung, J., Crawford, K., Bonino, F., Saracco, G., Choo, Q. L., Houghton, M., and et al. (1991). Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* **180**(2), 842-8.
- Weiner, A. J., Geysen, H. M., Christopherson, C., Hall, J. E., Mason, T. J., Saracco, G., Bonino, F., Crawford, K., Marion, C. D., and Crawford, K. A. (1992). Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**(8), 3468-3472.
- Weiner, A. J., Thaler, M. M., Crawford, K., Ching, K., Kansopon, J., Chien, D. Y., Hall, J. E., Hu, F., and Houghton, M. (1993). A unique, predominant hepatitis C virus variant found in an infant born to a mother with multiple variants. *J Virol* **67**(7), 4365-8.
- Yeung, L. T., To, T., King, S. M., and Roberts, E. A. (2007). Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* **14**(11), 797-805.

## TABLES

Table 1. Summary of laboratorial data.

<b>Subject</b>	<b>Mother or newborn</b>	<b>MTCT</b>	<b>Viral Load</b>	<b>Genotype</b>
PT1*	Mother	+	> 8.5x10 <sup>5</sup> IU <sup>1</sup>	1a
nbPT1	Newborn	NA	> 8.5x10 <sup>5</sup> IU <sup>1</sup>	1a
PT2	Mother	+	ND	1a
nbPT2	Newborn	NA	ND	ND
NT1	Mother	-	> 8.5x10 <sup>5</sup> IU <sup>1</sup>	1b
NT2	Mother	-	> 8.5x10 <sup>5</sup> IU <sup>1</sup>	1b
NT3	Mother	-	2.2x10 <sup>6</sup> IU <sup>2</sup>	1a
NT4	Mother	-	ND	ND

IU - international unit; ND - not determined (but with confirmed diagnosis); NA - not applicable.

\* HIV coinfecting mother

<sup>1</sup> Cobas (Roche); <sup>2</sup> Real time PCR (Roche)

Table 2. Quasispecies diversity at the nucleotide level from different HCV subgenomic regions.

Region	Subject	CT ratio (# CT/# clones)	Sn	Mf	Pn
5'UTR	PT1	0.16 (3/19)	0.14	0.001	0.001
	nbPT1	0.33 (5/15)	0.40	0.002	0.001
	PT2	0.20 (3/15)	0.23	0.001	0.001
	NT3	0.17 (3/18)	0.15	0.001	0.001
	Mean	0.22	0.23	0.001	0.001
	Range	0.16-0.33	0.14-0.40	0.001-0.002	0.001-0.001
E1	PT1	0.47 (8/17)	0.56	0.003	0.003
	nbPT1	0.73 (11/15)	0.83	0.007	0.006
	PT2	0.20 (3/15)	0.18	0.001	0.001
	NT3	0.17 (2/12)	0.12	0.000	0.000
	Mean	0.39	0.42	0.003	0.003
	Range	0.17-0.73	0.12-0.83	0-0.007	0-0.006
HVR1	PT1	0.47 (8/17)	0.52	0.028	0.021
	nbPT1	0.33 (5/15)	0.40	0.020	0.018
	PT2	0.20 (3/15)	0.18	0.002	0.002
	NT3	0.33 (4/12)	0.45	0.005	0.003
	Mean	0.33	0.39	0.014	0.011
	Range	0-0.47	0.18-0.52	0.002-0.028	0.002-0.021
E2 (outside HVR1)	PT1	0.55 (11/20)	0.75	0.007	0.050
	nbPT1	0.53 (10/19)	0.66	0.005	0.002
	PT2	0.94 (16/17)	0.97	0.099	0.016
	NT3	0.80 (12/15)	0.88	0.007	0.003
	Mean	0.71	0.82	0.029	0.018
	Range	0.53-0.94	0.66-0.97	0.005-0.099	0.002-0.050
NS5B	PT1	0.90 (18/20)	0.95	0.005	0.050
	nbPT1	0.76 (13/17)	0.88	0.009	0.003
	PT2	0.31 (5/16)	0.33	0.001	0.001
	NT3	0.63 (12/19)	0.77	0.005	0.003
	Mean	0.65	0.73	0.005	0.014
	Range	0.31-0.90	0.33-0.95	0.001-0.009	0.001-0.05

CT – clonotype; Sn – normalized Shannon entropy; Mf – mutation frequency.

Table 3. Quasispecies diversity at the amino acid level from different HCV subgenomic regions.

Region	Subject	CT ratio (# CT/# clones)	Sn	Mf	Pn
E1	PT1	0.35 (6/17)	0.42	0.006	0.005
	nbPT1	0.47 (7/15)	0.56	0.014	0.011
	PT2	0.13 (2/15)	0.09	0.001	0.001
	NT3	0.08 (1/12)	0.00	0.000	0.000
	Mean	0.26	0.27	0.005	0.004
	Range	0.08-0.47	0-0.56	0-0.014	0-0.011
HVR1	PT1	0.41 (7/17)	0.45	0.056	0.038
	nbPT1	0.21 (3/14)	0.19	0.045	0.040
	PT2	0.20 (3/15)	0.18	0.005	0.005
	NT3	0.25 (3/12)	0.29	0.010	0.007
	Mean	0.27	0.28	0.029	0.023
	Range	0.20-0.41	0.18-0.45	0.005-0.056	0.005-0.040
E2 (outside HVR1)	PT1	0.20 (4/20)	0.20	0.002	0.050
	nbPT1	0.26 (5/19)	0.27	0.003	0.003
	PT2	0.53 (9/17)	0.71	0.056	0.042
	NT3	0.07 (1/15)	0.00	0.000	0.000
	Mean	0.27	0.30	0.015	0.024
	Range	0.07-0.53	0-0.71	0-0.056	0-0.050
NS5B	PT1	0.60 (12/20)	0.70	0.007	0.050
	nbPT1	0.24 (4/17)	0.32	0.004	0.003
	PT2	0.25 (4/16)	0.25	0.002	0.002
	NT3	0.42 (8/19)	0.53	0.005	0.004
	Mean	0.38	0.45	0.005	0.015
	Range	0.24-0.60	0.25-0.70	0.002-0.007	0.002-0.050

CT – clonotype; Sn – normalized Shannon entropy; Mf – mutation frequency.

Table 4. Test for selective pressure, per sample per region.

Region	Subject	dN/dS	InL Model 1	InL Model 2	InL Model 7	InL Model 8	LRT I	LRT II
E1	PT1	0.59287	-272.0509	-272.0509	-272.0517	-272.0517	ns	ns
	nbPT1	0.70768	-306.2876	-306.2876	-306.2902	-306.2902	ns	ns
	PT2	0.55223	-230.5035	-230.0423	-230.5044	-230.0423	ns	ns
	NT3	0.0001	-216.2219	-216.2219	-216.2219	-216.2218	ns	ns
HVR1	PT1	9.53832	-160.2675	-155.8470	-160.2675	-155.8470	*	NA
	nbPT1	3.57980	-176.2169	-173.9257	-176.2169	-173.9257	ns	ns
	PT2	0.68823	-105.1617	-105.1620	-105.1620	-105.1620	ns	ns
	NT3	0.31803	-107.9760	-107.6807	-107.9768	-107.6812	ns	ns
E2	PT1	0.06813	-356.4879	-356.4879	-356.4878	-356.4878	ns	ns
	nbPT1	0.15128	-363.4061	-363.4072	-363.4113	-363.4113	ns	ns
	PT2	0.04576	-567.3189	-567.2763	-567.5430	-567.3542	ns	ns
	NT3	0.0001	-356.8780	-356.8778	-356.8771	-356.8773	ns	ns
NS5B	PT1	0.28747	-649.1207	-649.1207	-649.0905	-649.0905	ns	ns
	nbPT1	0.10293	-580.6786	-580.6785	-580.6812	-580.6815	ns	ns
	PT2	0.78961	-489.5590	-489.4124	-489.5594	-489.4124	ns	ns
	NT3	0.27913	-592.8590	-592.8590	-592.8643	-592.8643	ns	ns

LRT I, Model 1(neutral) vs. Model 2(Positive selection); LRT II, Model 7(beta) vs. Model 8(beta&w); ns, not significant; \* Cut-off value for both LRTs is 5.99 at 5% significance level.

Table 5. Sites from HVR1 under positive selection.

<b>Position</b>	<b>Amino acid</b>	<b>dN/dS</b>	<b>LRTII</b>
390	G	10.058	**
391	V	10.057	**
392	T	10.057	**
394	R	10.058	**
395	N	10.108	**
396	V	10.108	**
397	R	10.058	**
400	V	10.058	**
402	L	10.058	**
408	R	10.058	**

LRTII, Model 7(beta) vs. Model 8(beta&w). \*\* Cut-off value for LRTII is 9.21 at 1% significance level.



Table 6. List of mutations associated to HCV MTCT per region.

Region	Nucleotide position <sup>†</sup>	Mutation <sup>‡</sup>	Synonymous n (%)	Non-Synonymous n (%)
tE1	1068	L356L	2 (66.7%)	1 (33.3%)
	1077	M359I		
	1086	F362F		
HVR1	1171	T391A/V	0 (0%)	10 (100%)
	1172	T391A/V		
	1179	A/G393G		
	1181	H394Y/R/H		
	1186	T/A396V/T		
	1187	T/A396V/T		
	1199	S400A/V/S		
	1210	S404T/A/S		
	1219	P407A/S/*		
	1224	S408R/S		
E2	1854	Y618Y	5 (38.5%)	8 (61.5%)
	1857	P619P		
	1864	I622F/V/I		
	1869	N623N		
	1884	K628K		
	1959	D653D/*		
	1992	P664P		
	1998	L666L/A		
	2004	S668S/V		
	2020	I674V/G		
	2044	L682L/P		
	2049	P683P/T		
	2058	S686S/V		
NS5B	7948	T2650T	6 (66.7%)	3 (33.3%)
	8011	R2671R		
	8026	S2676S		
	8070	K2690R		
	8086	G2696G		
	8089	Y/D2697Y		
	8095	R2699R		
	8122	T2108T		
	8161	Q2721R/Q		
TOTAL			13 (37.1%)	22 (62.9%)

<sup>†</sup> Nucleotide position relative to reference sequence HCV-1a (GenBank accession number M62321). <sup>‡</sup> Left and right letters represent MTCT- and MTCT+ amino acids, respectively. Critical value for Bonferroni's method varied according to the region length.

## FIGURES

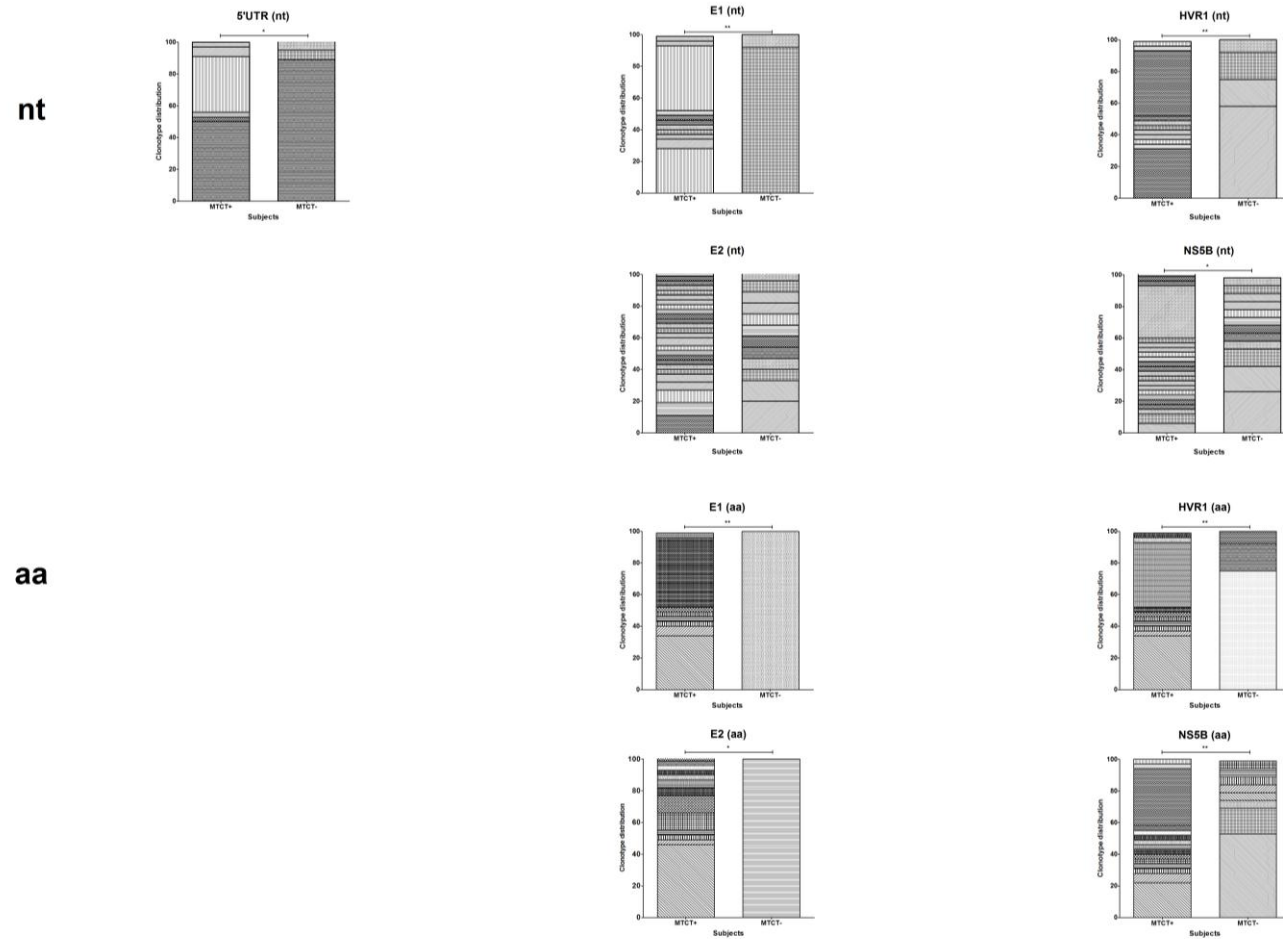


Figure 1. Clonotype distribution of clones from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B comparing MTCT+ and MTCT- mothers (genotype 1a, only), both at the nucleotide (nt) and the amino acid (aa) levels. MTCT, mother-to-child transmission.

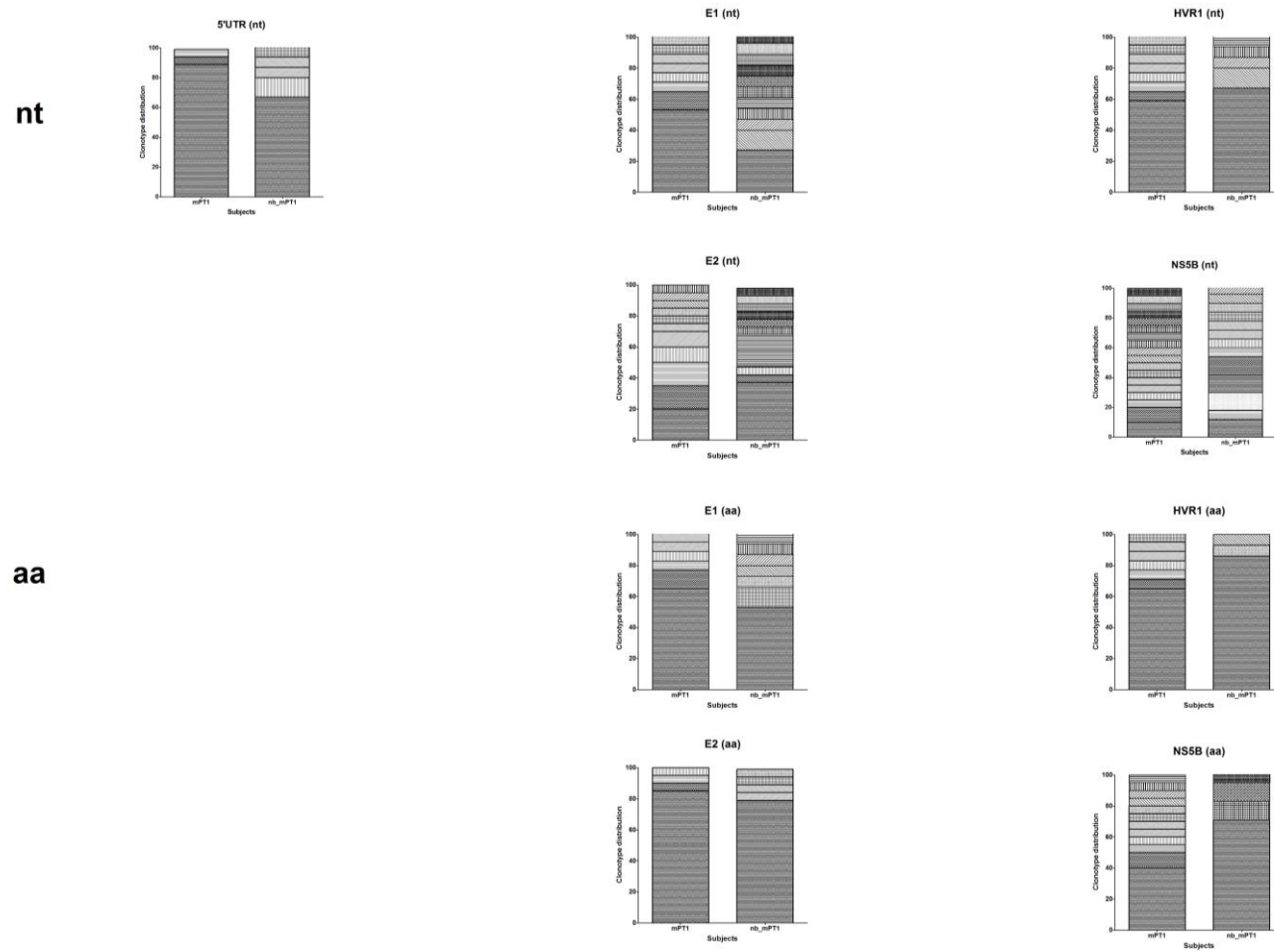


Figure 2. Clonotype distribution of clones from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B comparing mother-newborn pair, both at the nucleotide (nt) and the amino acid (aa) levels. MTCT, mother-to-child transmission.

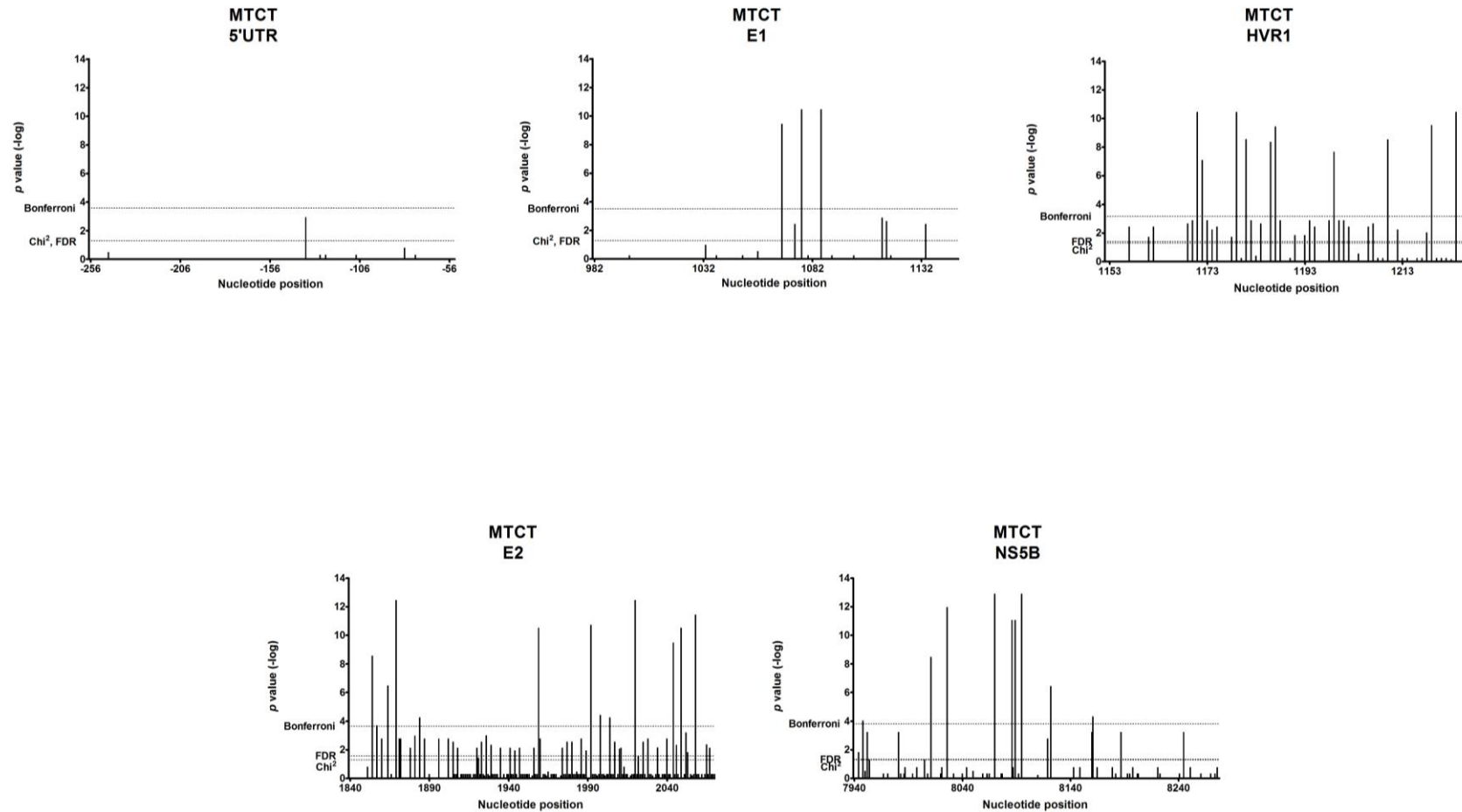


Figure 3. Nucleotide association test between viruses from MTCT+ and MTCT- mothers (genotype 1a, only) at the nucleotide level. Different regions were analyzed: 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B.  $p$  value (-log) for Chi-square (Chi<sup>2</sup>) was 1.3 and varied according to the region for FDR and Bonferroni's method.

## 6 Discussão

Não existem muitos dados disponíveis na literatura sobre a análise de quasiespécies do HCV na TMI. A maioria dos estudos é baseada em populações outras que não a mãe e o recém-nascido (RN), e alguns são experimentais. O nosso objetivo foi o de explorar a TMI, tentando elucidar os seus aspectos principais e criar hipóteses sobre, por exemplo, quais implicações poderiam ser observadas em diferentes níveis da diversidade de quasiespécies.

Ambos os casos de TMI foram do genótipo 1a. Mães que não transmitiram o vírus estavam infectadas com os genótipos 1a e 1b. Além de ser um genótipo globalmente distribuído, um grupo da Argentina mostrou que o genótipo 1 foi predominante em crianças infectadas pela TMI (GISMONDI *et al.*, 2004).

O fato do diagnóstico da TMI ter sido realizado utilizando o sangue do cordão umbilical é confirmatório da transmissão intrauterina. A taxa de TMI tem sido associada com a coinfeção com o HIV, alta carga viral, ruptura de bolsa por mais de 6 horas, complicações no parto e parto vaginal foram associados (OHTO *et al.*, 1994; MATSUBARA *et al.*, 1995; MORIYA *et al.*, 1995; OKAMOTO *et al.*, 2000; CECI *et al.*, 2001; LIMA *et al.*, 2004; DI DOMENICO *et al.*, 2006; MURAKAMI *et al.*, 2012). Além disso, o HCV já foi detectado no fluido amniótico (DELAMARE *et al.*, 1999). Pouco se conhece sobre a evolução das quasiespécies do HCV em crianças infectadas verticalmente (NI *et al.*, 1997; SITIA *et al.*, 2001).

Pode ser uma “armadilha” realizar a análise de quasiespécies usando apenas o sequenciamento direto dos produtos de PCR. Nos nossos dados, apenas 68% das sequências obtidas diretamente do produto de PCR foram coincidentes com o CT predominante e, em alguns casos, elas nem ao menos representavam um CT minoritário entre os clones. A sua simplicidade é tentadora, mas não é capaz de demonstrar tanta variabilidade quanto se estivesse usando métodos de clonagem ou de sequenciamento de próxima geração.

Os resultados dos parâmetros de quasiespécies da HVR1 foram menores do que aqueles do E2. De fato, a HVR1 foi a região que apresentou os menores valores dentro da região codificante. Os nossos achados são discordantes dos relatados por WEINER *et al.* (1992), segundo os quais, a HVR1 é uma região altamente variável.

Por outro lado, CHEN & WANG (2005) evidenciaram que amostras de soro coletadas de pacientes crônicos apresentaram maior complexidade de

quasiespécies do que aquelas coletadas de indivíduos na fase aguda da infecção. Eles relataram que a diversidade genética na HVR1 foi mais alta do que no restante da região do envelope (E1 e E2) em indivíduos com viremia persistente, mas que, ao longo do tempo, não houve uma variação marcante naqueles com eliminação da viremia (CHEN & WANG, 2005). Concluíram que a persistência do HCV está associada com a complexidade das quasiespécies e uma seleção positiva da HVR1 pelo sistema imunológico do hospedeiro (CHEN & WANG, 2005)

Os clones de uma das mães TMI+ apresentaram uma menor diversidade quasiespécie na região HVR1, o que poderia sugerir que ela se encontrava na fase aguda da infecção no momento do parto. A curva epidemiológica da hepatite aguda e o fato da mãe ser jovem podem dar suporte a essa hipótese.

Os clones do RN apresentaram maior diversidade do que aqueles da sua mãe nas regiões 5'UTR e E1 em nível de nucleotídeo, e nas regiões E1 e E2 em nível de aminoácido. Essa variabilidade é devido à emergência de novos clonotipos (CTs), uma vez que os CTs minoritários encontrados na amostra do RN não estavam entre nenhum dos clones minoritários da mãe, e isso pode ser indicativo do momento e do modo da transmissão.

A transmissão provavelmente ocorreu no início da gestação. Forças evolucionárias, tais como os efeitos gargalo de garrafa e fundador, foram seguidas por mutações *de novo*. As quasiespécies emergentes do RN teriam tempo suficiente para se replicar e evoluir diferentemente das da mãe, resultando em CTs minoritários exclusivos e maior diversidade na população de clones do RN. No entanto, uma transmissão tardia não pode ser ignorada, porém, seria necessária uma replicação viral bastante ativa no RN para que o HCV pudesse alcançar o mesmo nível de diversidade. Devido ao pequeno tamanho amostral, uma análise do relógio molecular não pôde ser realizada.

Ainda levando em consideração os importantes efeitos do gargalo de garrafa e fundador, sugerimos que a transmissão tenha ocorrido através do tecido placentário. Caso tivesse ocorrido através de lesões na placenta que levariam a um contato direto sangue-sangue, seria esperado que as populações quasiespécies da mãe e do RN seriam mais parecidas: intimamente relacionadas ou mesmo idênticas, especialmente se tivesse ocorrido múltiplas reinfecções.

WEINER *et al.* (1993) estudaram e as sequências da HVR1 de três mães e um par mãe-criança. Um único variante predominante do HCV foi encontrado na

criança e a sua mãe que apresentou nove variantes predominantes, e o variante da criança foi altamente relacionado, mas não idêntico, com os nove variantes da mãe no momento do parto (WEINER *et al.*, 1993). KUDO *et al.* (1997) sequenciaram a HVR1 e o E1 de dois pares mãe-bebê. Ambas as sequências virais do RN apresentaram menor diversidade do que aquelas da mãe. As sequências da HVR1 dos RNs foram relacionadas, mas não idênticas, àquelas das mães (KUDO *et al.*, 1997). KUDO *et al.* (1997) também demonstrou que os isolados do HCV detectados nos RNs não foram os dominantes nas mães, mas ainda eram transmissíveis para os RNs (KUDO *et al.*, 1997). Estes resultados aparentemente discrepantes poderiam, certamente, ser um reflexo do pequeno tamanho amostral da maioria dos estudos nesta área, mas também poderiam ser devido a eventos estocásticos de transmissão.

POLLACK *et al.* (2004) estudaram a HVR1 de três crianças coinfetadas pelo HIV e as mães de duas delas. A análise filogenética dos pares mãe-RN sugeriu a transmissão de múltiplos variantes dominantes e não-dominantes identificadas na mãe. A diversificação do HCV nos RNs foi observada a partir dos 2 meses de idade (POLLACK *et al.*, 2004). Nós encontramos que a diversificação do HCV também pode ocorrer mais cedo, durante a gestação, visto que as nossas amostras são provenientes do cordão umbilical.

PT1, que é a mãe coinfetada pelo HIV, foi a única amostra com evidência de seleção positiva. A coinfecção pelo HIV poderia estar associada com a presença da pressão seletiva. O seu recém-nascido também apresentou  $dN/dS > 1,0$ , porém sem o suporte do teste de razão de verossimilhança (*likelihood ratio test*, LRT).

Um *framework* de associação foi usado para mapear possíveis *hot-spots* no genoma do HCV que poderiam estar associados com a TMI. Usando um valor crítico conservador, trinta e cinco mutações pontuais na região codificante foram associados significativamente com a TMI. A principal limitação desta abordagem é o fato de que eventos de recombinação no HCV são considerados raros, e, portanto, não são suficientes para “quebrar” o desequilíbrio de ligação e criar blocos subgenômicos (GONZALEZ-CANDELAS *et al.*, 2011; MOREL *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012). Sob o desequilíbrio de ligação, possíveis loci responsáveis pela TMI bem como loci próximos são transmitidos juntos, e estes últimos podem ser falsamente associados com a TMI.

Uma vez que havia mutações pontuais significativas distribuídas ao longo das quatro regiões codificantes analisadas, isto pode indicar que o genoma inteiro contribui para a capacidade de transmissão do HCV. Se este for o caso, a detecção destas variantes pode ser útil para prever a TMI.

Finalmente, não foi encontrada associação entre a TMI e a carga viral ou os parâmetros de complexidade de quasiespécies analisados. Apenas a distribuição de CT foi capaz de mostrar diferenças significativas entre os grupos TMI+ e TMI-. Além disso, a análise do sequenciamento direto de produtos de PCR mostrou-se insuficiente para análise quasiespécies. A detecção de mutações associadas com TMI do HCV reforça a ideia de que esta é determinada por fatores virais e pode ser útil para prevê-la. Novos estudos com amostras maiores são necessários para confirmar esses achados.



## **7 Limitações do estudo**

Devido ao pequeno número de participantes na pesquisa e à baixa prevalência do HCV em gestantes, 0,22% em resultados de triagem sorológica e 0,18% em resultados de confirmação molecular, o tamanho amostral das mães foi bastante reduzido. O número de RNs foi ainda menor, tendo em vista que a taxa de TMI foi de 33% para a nossa amostra. No decorrer do trabalho, tentamos ampliar o tamanho da nossa casuística através do convite a gestantes que realizaram exames pré-natais no LACEN-BA. Também foram feitas visitas em outras oito maternidades públicas que mais realizam partos na cidade de Salvador para apresentar o projeto e sensibilizar os médicos para o encaminhamento dos casos de gestantes com sorologia para o HCV para participar do estudo. Infelizmente, estas ações não foram suficientes para contornar este problema, que limita o estudo a uma análise de casos.

## **8 Apoio Financeiro**

Este estudo contou com recursos da FIOCUZ – BA, do PRONEX (EDITAL FAPESB/CNPq Nº 020/2009, Termo de Outorga: PNX0017/2009) e da CAPES, sendo que este último diz respeito à bolsa de mestrado.

Houve a contrapartida das instituições parceiras no que tange a infraestrutura disponibilizada e realização dos exames por parte da MRPJMMN e do LACEN-BA.

## 9 Referências bibliográficas

- ABE, K., *et al.* Genomic characterization and mutation rate of hepatitis C virus isolated from a patient who contracted hepatitis during an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Japan. **J Gen Virol**, v.73 ( Pt 10), Oct, p.2725-9. 1992.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v.13, n.17, May 7, p.2436-41. 2007.
- AMINI, M. & H. POUSTCHI. Hepatitis C virus spontaneous clearance: immunology and genetic variance. **Viral Immunol**, v.25, n.4, Aug, p.241-8. 2012.
- BATALLAN, A., *et al.* [Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: recent news about the benefit of caesarean sections]. **Gynecol Obstet Fertil**, v.31, n.11, Nov, p.964-8. 2003.
- BENJAMINI, Y. & Y. HOCHBERG. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v.57, n.1, p.289-300. 1995.
- BERNINI, F., *et al.* Within-host dynamics of the hepatitis C virus quasispecies population in HIV-1/HCV coinfecting patients. **PLoS One**, v.6, n.1, p.e16551. 2011.
- BEVILACQUA, E., *et al.* Genetic factors in mother-to-child transmission of HCV infection. **Virology**, v.390, n.1, Jul 20, p.64-70. 2009.
- BLACKARD, J. T., *et al.* Analysis of a non-structural gene reveals evidence of possible hepatitis C virus (HCV) compartmentalization. **J Med Virol**, v.84, n.2, Feb, p.242-52. 2012.
- BOHMAN, V. R., *et al.* Seroprevalence and risk factors for hepatitis C virus antibody in pregnant women. **Obstet Gynecol**, v.80, n.4, Oct, p.609-13. 1992.
- BORTOLOTTI, F., *et al.* Hepatitis C virus infection and related liver disease in children of mothers with antibodies to the virus. **J Pediatr**, v.130, n.6, Jun, p.990-3. 1997.
- BRASIL. Saúde. Ministério da Saúde. Distrito Federal. 2007 2007.
- BROWN, R. J., *et al.* Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Fitness Defines Virus Population Composition following Transmission to a New Host. **J Virol**, v.86, n.22, Nov, p.11956-66. 2012.
- BUKH, J., *et al.* Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin Liver Dis**, v.15, n.1, Feb, p.41-63. 1995.

- CABOT, B., *et al.* Longitudinal evaluation of the structure of replicating and circulating hepatitis C virus quasispecies in nonprogressive chronic hepatitis C patients. **J Virol**, v.75, n.24, Dec, p.12005-13. 2001.
- CABOT, B., *et al.* Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. **J Virol**, v.74, n.2, Jan, p.805-11. 2000.
- CECI, O., *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus in a cohort of 2,447 HIV-seronegative pregnant women: a 24-month prospective study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.33, n.5, Nov, p.570-5. 2001.
- CHAN, S. W., *et al.* Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. **J Gen Virol**, v.73 ( Pt 5), May, p.1131-41. 1992.
- CHANG, M. H., *et al.* Long term clinical and virologic outcome of primary hepatitis C virus infection in children: a prospective study. **Pediatr Infect Dis J**, v.13, n.9, Sep, p.769-73. 1994.
- CHEN, S. & Y. M. WANG. Genetic evolution of structural region of hepatitis C virus in primary infection. **World J Gastroenterol**, v.8, n.4, Aug, p.686-93. 2002.
- \_\_\_\_\_. Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. **World J Gastroenterol**, v.11, n.19, May 21, p.2874-84. 2005.
- CHOO, Q. L., *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, n.4902, Apr 21, p.359-62. 1989.
- CONTE, D., *et al.* Prevalence and clinical course of chronic hepatitis C virus (HCV) infection and rate of HCV vertical transmission in a cohort of 15,250 pregnant women. **Hepatology**, v.31, n.3, Mar, p.751-5. 2000.
- COSTA, Z. B., *et al.* Prevalence and risk factors for Hepatitis C and HIV-1 infections among pregnant women in Central Brazil. **BMC Infect Dis**, v.9, p.116. 2009.
- COX, A. L., *et al.* Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. **Hepatology**, v.42, n.1, Jul, p.104-12. 2005.
- DELAMARE, C., *et al.* Detection of hepatitis C virus RNA (HCV RNA) in amniotic fluid: a prospective study. **J Hepatol**, v.31, n.3, Sep, p.416-20. 1999.
- DI DOMENICO, C., *et al.* Vertical transmission of HCV infection: prospective study in infants born to HIV-1 seronegative women. **Ig Sanita Pubbl**, v.62, n.2, Mar-Apr, p.129-42. 2006.
- DURANTE MANGONI, E., *et al.* Hepatitis C virus E2 and NS5A region variability during sequential treatment with two interferon-alpha preparations. **J Med Virol**, v.70, n.1, May, p.62-73. 2003.

- DUVERLIE, G., *et al.* Sequence analysis of the NS5A protein of European hepatitis C virus 1b isolates and relation to interferon sensitivity. **J Gen Virol**, v.79 ( Pt 6), Jun, p.1373-81. 1998.
- FARCI, P. & R. H. PURCELL. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Semin Liver Dis**, v.20, n.1, p.103-26. 2000.
- FARCI, P., *et al.* The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. **Science**, v.288, n.5464, Apr 14, p.339-44. 2000.
- FARCI, P., *et al.* Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.5, Mar 5, p.3081-6. 2002.
- FLAMM, S. L. Chronic hepatitis C virus infection. **Jama**, v.289, n.18, May 14, p.2413-7. 2003.
- FOCACCIA, R., *et al.* Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. **Braz J Infect Dis**, v.2, n.6, Dec, p.269-284. 1998.
- GALE, M. J., JR., *et al.* Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. **Clin Diagn Virol**, v.10, n.2-3, Jul 15, p.157-62. 1998.
- GALE, M. J., JR., *et al.* Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. **Virology**, v.230, n.2, Apr 14, p.217-27. 1997.
- GARDENAL, R. V. C., *et al.* Hepatite C e gestação: análise de fatores associados à transmissão vertical. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.44, n.1, p.43-47. 2011.
- GIBB, D. M., *et al.* Mother-to-child transmission of hepatitis C virus: evidence for preventable peripartum transmission. **Lancet**, v.356, n.9233, Sep 9, p.904-7. 2000.
- GISMONDI, M. I., *et al.* Hepatitis C virus infection in infants and children from Argentina. **J Clin Microbiol**, v.42, n.3, Mar, p.1199-202. 2004.
- GONZALEZ-CANDELAS, F., *et al.* Recombination in hepatitis C virus. **Viruses**, v.3, n.10, Oct, p.2006-24. 2011.
- GRAY, R. R., *et al.* The mode and tempo of hepatitis C virus evolution within and among hosts. **BMC Evol Biol**, v.11, p.131. 2011.
- HAYASHI, N. & T. TAKEHARA. Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future. **J Gastroenterol**, v.41, n.1, Jan, p.17-27. 2006.

- HONG, X., *et al.* Human leukocyte antigen class II DQB1\*0301, DRB1\*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **World J Gastroenterol**, v.11, n.46, Dec 14, p.7302-7. 2005.
- HUNG, C. H., *et al.* Mutations in the NS5A and E2-PePHD region of hepatitis C virus type 1b and correlation with the response to combination therapy with interferon and ribavirin. **J Viral Hepat**, v.10, n.2, Mar, p.87-94. 2003.
- INDOLFI, G., *et al.* Alanine transaminase levels in the year before pregnancy predict the risk of hepatitis C virus vertical transmission. **J Med Virol**, v.78, n.7, Jul, p.911-4. 2006.
- ISHII, T., *et al.* Evolution in the hypervariable region of the hepatitis C virus in two infants infected by mother-to-infant transmission. **Pediatr Int**, v.47, n.3, Jun, p.278-85. 2005.
- JAIN, S., *et al.* Hepatitis C in pregnancy. **Am J Perinatol**, v.24, n.4, Apr, p.251-6. 2007.
- KAO, J. H., *et al.* Quasispecies of hepatitis C virus and genetic drift of the hypervariable region in chronic type C hepatitis. **J Infect Dis**, v.172, n.1, Jul, p.261-4. 1995.
- KATO, N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. **Microb Comp Genomics**, v.5, n.3, p.129-51. 2000.
- KATO, N., *et al.* Genetic variation and dynamics of hepatitis C virus replicons in long-term cell culture. **J Gen Virol**, v.86, n.Pt 3, Mar, p.645-56. 2005.
- KATO, N., *et al.* Genetic drift in hypervariable region 1 of the viral genome in persistent hepatitis C virus infection. **J Virol**, v.68, n.8, Aug, p.4776-84. 1994.
- KATO, N., *et al.* Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses. **Virus Res**, v.22, n.2, Feb, p.107-23. 1992.
- KUDO, T., *et al.* Analysis of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: quasispecies nature and buoyant densities of maternal virus populations. **J Med Virol**, v.51, n.3, Mar, p.225-30. 1997.
- KUMAR, R. M., *et al.* Seroprevalence and mother-to-infant transmission of hepatitis C in asymptomatic Egyptian women. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**, v.75, n.2, Dec, p.177-82. 1997.
- KUMAR, R. M. & S. SHAHUL. Role of breast-feeding in transmission of hepatitis C virus to infants of HCV-infected mothers. **J Hepatol**, v.29, n.2, Aug, p.191-7. 1998.
- LA TORRE, A., *et al.* Vertical transmission of HCV. **Acta Obstet Gynecol Scand**, v.77, n.9, Oct, p.889-92. 1998.

- LAVANCHY, D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.2, p.107-115. 2011.
- LEE, J. H., *et al.* Non-isotopic detection of hepatitis C virus quasispecies by single strand conformation polymorphism. **J Med Virol**, v.53, n.3, Nov, p.245-51. 1997.
- LIMA, M. P., *et al.* Prevalence and risk factors for hepatitis C virus (HCV) infection among pregnant Brazilian women. **Int J Gynaecol Obstet**, v.70, n.3, Sep, p.319-26. 2000.
- \_\_\_\_\_. Mother-to-Infant transmission of hepatitis C virus (HCV) in Brazil. **J Trop Pediatr**, v.50, n.4, Aug, p.236-8. 2004.
- LIU, Z., *et al.* Accurate representation of the hepatitis C virus quasispecies in 5.2-kilobase amplicons. **J Clin Microbiol**, v.42, n.9, Sep, p.4223-9. 2004.
- LLOYD, A. R., *et al.* Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. **Immunol Cell Biol**, v.85, n.1, Jan, p.24-32. 2007.
- MANGIA, A., *et al.* IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **Cytokine**, v.25, n.3, Feb 7, p.103-9. 2004.
- MANZIN, A., *et al.* Evolution of hypervariable region 1 of hepatitis C virus in primary infection. **J Virol**, v.72, n.7, Jul, p.6271-6. 1998.
- MARTELL, M., *et al.* Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. **J Virol**, v.66, n.5, May, p.3225-9. 1992.
- MATSUBARA, T., *et al.* Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a prospective study. **Eur J Pediatr**, v.154, n.12, Dec, p.973-8. 1995.
- MICALLEF, J. M., *et al.* Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. **J Viral Hepat**, v.13, n.1, Jan, p.34-41. 2006.
- MOK, J., *et al.* When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? **Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed**, v.90, n.2, Mar, p.F156-60. 2005.
- MOREL, V., *et al.* Genetic recombination of the hepatitis C virus: clinical implications. **J Viral Hepat**, v.18, n.2, Feb, p.77-83. 2011.
- MORIYA, T., *et al.* Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants: its frequency and risk factors revisited. **Biomed Pharmacother**, v.49, n.2, p.59-64. 1995.
- MURAKAMI, J., *et al.* Risk factors for mother-to-child transmission of hepatitis C virus: Maternal high viral load and fetal exposure in the birth canal. **Hepatol Res**, v.42, n.7, Jul, p.648-57. 2012.

- MURPHY, D., *et al.* A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. **Hepatology**, v.46, n.supplement 1, article 623a. 2007.
- NI, Y. H., *et al.* Evolution of hepatitis C virus quasispecies in mothers and infants infected through mother-to-infant transmission. **J Hepatol**, v.26, n.5, May, p.967-74. 1997.
- OHTO, H., *et al.* Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group. **N Engl J Med**, v.330, n.11, Mar 17, p.744-50. 1994.
- OKAMOTO, M., *et al.* Prospective reevaluation of risk factors in mother-to-child transmission of hepatitis C virus: high virus load, vaginal delivery, and negative anti-NS4 antibody. **J Infect Dis**, v.182, n.5, Nov, p.1511-4. 2000.
- OSBURN, W. O., *et al.* Spontaneous control of primary hepatitis C virus infection and immunity against persistent reinfection. **Gastroenterology**, v.138, n.1, Jan, p.315-24. 2010.
- PACHECO, S. R. Prevalência de infecção pelo o vírus da hepatite C (VHC) em pacientes com anemia falciforme (AF) e associação entre a hepatite viral e as manifestações clínicas da doença de base. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ-BA, 2011.
- PANG, P. S., *et al.* The evolution of the major hepatitis C genotypes correlates with clinical response to interferon therapy. **PLoS One**, v.4, n.8, p.e6579. 2009.
- PARTHIBAN, R., *et al.* Transmission of hepatitis C virus infection from asymptomatic mother to child in southern India. **Int J Infect Dis**, v.13, n.6, Nov, p.e394-400. 2009.
- PASSINI, S. S. S. Prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) em gestantes e transmissão materno-infantil. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - FIOCRUZ-BA, 2012. 84 p.
- PAWLITSKY, J. M. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. **J Viral Hepat**, v.5 Suppl 1, Sep, p.3-8. 1998.
- PAWLITSKY, J. M., *et al.* Evolution of the hepatitis C virus second envelope protein hypervariable region in chronically infected patients receiving alpha interferon therapy. **J Virol**, v.73, n.8, Aug, p.6490-9. 1999.
- PAWLITSKY, J. M., *et al.* Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. **J Virol**, v.72, n.4, Apr, p.2795-805. 1998.
- PEIXOTO, M. F., *et al.* Vírus da hepatite C em gestantes: prevalência e avaliação do risco do aleitamento materno. **Revista AMRIGS**, v.47, n.1, p.50-53. 2003.



- PIASECKI, B. A., *et al.* Influence of alcohol use, race, and viral coinfections on spontaneous HCV clearance in a US veteran population. **Hepatology**, v.40, n.4, Oct, p.892-9. 2004.
- POLLACK, H., *et al.* Perinatal transmission and viral evolution of hepatitis C virus quasispecies in infants coinfecting with HIV. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.36, n.4, Aug 1, p.890-9. 2004.
- POLYAK, S. J., *et al.* Assessment of hepatitis C virus quasispecies heterogeneity by gel shift analysis: correlation with response to interferon therapy. **J Infect Dis**, v.175, n.5, May, p.1101-7. 1997.
- POSTHOUWER, D., *et al.* The natural history of childhood-acquired hepatitis C infection in patients with inherited bleeding disorders. **Transfusion**, v.46, n.8, Aug, p.1360-6. 2006.
- PRADAT, P. & C. TREPO. HCV: epidemiology, modes of transmission and prevention of spread. **Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v.14, n.2, Apr, p.201-10. 2000.
- REINUS, J. F., *et al.* Failure to detect vertical transmission of hepatitis C virus. **Ann Intern Med**, v.117, n.11, Dec 1, p.881-6. 1992.
- RESTI, M., *et al.* Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection. **BMJ**, v.317, n.7156, Aug 15, p.437-41. 1998.
- REVIE, D., *et al.* Analysis of in vitro replicated human hepatitis C virus (HCV) for the determination of genotypes and quasispecies. **Virology**, v.3, p.81. 2006.
- ROBERTS, E. A. & L. YEUNG. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.36, n.5 Suppl 1, Nov, p.S106-13. 2002.
- SABATINO, G., *et al.* Vertical transmission of hepatitis C virus: an epidemiological study on 2,980 pregnant women in Italy. **Eur J Epidemiol**, v.12, n.5, Oct, p.443-7. 1996.
- SANDRES-SAUNE, K., *et al.* Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of the NS5b region. **J Virol Methods**, v.109, n.2, May, p.187-93. 2003.
- SBH. Relatório do Grupo de Estudo da Sociedade Brasileira de Hepatologia. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. **GED**, v.18, p.53-58. 1999.
- SEEFF, L. B. The history of the "natural history" of hepatitis C (1968-2009). **Liver Int**, v.29 Suppl 1, Jan, p.89-99. 2009.
- SHI, W., *et al.* Recombination in hepatitis C virus: identification of four novel naturally occurring inter-subtype recombinants. **PLoS One**, v.7, n.7, p.e41997. 2012.

- SHIFFMAN, M. L., *et al.* Peginterferon alfa-2a and ribavirin for 16 or 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. **N Engl J Med**, v.357, n.2, Jul 12, p.124-34. 2007.
- SHINDO, M., *et al.* The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hypervariable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. **Hepatology**, v.24, n.5, Nov, p.1018-23. 1996.
- SILVA, M. B., *et al.* Prevalence and genotypes of hepatitis C virus among injecting drug users from Salvador-BA, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.3, May, p.299-303. 2010.
- SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **J Gen Virol**, v.85, n.Pt 11, Nov, p.3173-88. 2004.
- SIMMONDS, P., *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v.42, n.4, Oct, p.962-73. 2005.
- SIMMONDS, P., *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**, v.74 ( Pt 11), Nov, p.2391-9. 1993.
- SITIA, G., *et al.* Evolution of the E2 region of hepatitis C virus in an infant infected by mother-to-infant transmission. **J Med Virol**, v.64, n.4, Aug, p.476-81. 2001.
- SMITH, D. B. & P. SIMMONDS. Characteristics of nucleotide substitution in the hepatitis C virus genome: constraints on sequence change in coding regions at both ends of the genome. **J Mol Evol**, v.45, n.3, Sep, p.238-46. 1997.
- STAUBER, R. [Epidemiology and transmission of hepatitis C]. **Wien Med Wochenschr**, v.150, n.23-24, p.460-2. 2000.
- STEINHAUER, D. A. & J. J. HOLLAND. Rapid evolution of RNA viruses. **Annu Rev Microbiol**, v.41, p.409-33. 1987.
- STEININGER, C., *et al.* Increased risk of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus by intrapartum infantile exposure to maternal blood. **J Infect Dis**, v.187, n.3, Feb 1, p.345-51. 2003.
- STRAUSS, E. [Hepatitis C]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34, n.1, Jan-Feb, p.69-82. 2001.
- SYRIOPOULOU, V., *et al.* Mother to child transmission of hepatitis C virus: rate of infection and risk factors. **Scand J Infect Dis**, v.37, n.5, p.350-3. 2005.
- SYRIOPOULOU, V., *et al.* Mother to child transmission of hepatitis C virus: Rate of infection and risk factors. **Scand J Infect Dis**, v.37, n.5, p.350-353. 2005.
- TENGAN, F. M., *et al.* Sexual transmission of hepatitis C virus. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.43, n.3, May-Jun, p.133-7. 2001.

- THOMAS, D. L., *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. **Jama**, v.284, n.4, Jul 26, p.450-6. 2000.
- TORRES-PUENTE, M., *et al.* Using evolutionary tools to refine the new hypervariable region 3 within the envelope 2 protein of hepatitis C virus. **Infect Genet Evol**, v.8, n.1, Jan, p.74-82. 2008.
- UEHARA, S., *et al.* The incidence of vertical transmission of hepatitis C virus. **Tohoku J Exp Med**, v.171, n.3, Nov, p.195-202. 1993.
- VOGT, M., *et al.* Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. **N Engl J Med**, v.341, n.12, Sep 16, p.866-70. 1999.
- VON WAGNER, M., *et al.* Dynamics of hepatitis C virus quasispecies turnover during interferon-alpha treatment. **J Viral Hepat**, v.10, n.6, Nov, p.413-22. 2003.
- WEINER, A., *et al.* Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.7, Mar 28, p.2755-9. 1995.
- WEINER, A. J., *et al.* Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins. **Virology**, v.180, n.2, Feb, p.842-8. 1991.
- WEINER, A. J., *et al.* Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, n.8, April 15, 1992, p.3468-3472. 1992.
- WEINER, A. J., *et al.* A unique, predominant hepatitis C virus variant found in an infant born to a mother with multiple variants. **J Virol**, v.67, n.7, Jul, p.4365-8. 1993.
- YANG, Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Mol Biol Evol**, v.24, n.8, Aug, p.1586-91. 2007.
- YANG, Z., *et al.* Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. **Mol Biol Evol**, v.22, n.4, Apr, p.1107-18. 2005.
- YEUNG, L. T., *et al.* Spontaneous clearance of childhood hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat**, v.14, n.11, Nov, p.797-805. 2007.
- ZARIFE, M. A., *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.100, n.7, Jul, p.663-8. 2006.

ZEUZEM, S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? **Ann Intern Med**, v.140, n.5, Mar 2, p.370-81. 2004.

## **APÊNDICE I - Termo de consentimento livre e esclarecido da gestante/parturiente e da criança**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA

Secretaria de Saúde do Estado da Bahia

Superintendência de Atenção Integral à Saúde  
Maternidade Prof. José Maria de Magalhães Netto  
Gestão: Santa Casa de Misericórdia da Bahia



**Maternidade**  
Prof. José Maria de Magalhães Netto  
*Uma Referência para a vida*

## **Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aplicado à gestante e à criança**

Você está sendo convidada a participar do estudo intitulado “**Fatores Virais e do Hospedeiro Implicados na Eliminação da Infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) na Transmissão Materno-Infantil**”, que tem como objetivo avaliar fatores do vírus e ao ser humano e que podem estar relacionados com a transmissão do vírus da hepatite C da mãe para o bebê e também para a cura espontânea desta infecção.

Para participar, você deve assinar este termo de consentimento e permitir a coleta de uma amostra de seu sangue para a pesquisa do vírus e de marcadores genéticos do ser humano. Se você é a mãe da criança, deve ainda autorizar a revisão de seu prontuário na maternidade; a coleta do sangue do cordão umbilical; e prover uma amostra de leite materno para pesquisarmos a via de transmissão do vírus da hepatite C. Apenas as mães e/ou bebês com resultados positivos serão contatadas para a notificação do resultado e convite para comparecer na maternidade para o acompanhamento, que inclui a coleta de novas amostras, entrega do laudo emitido pelo LACEN, e da carta de encaminhamento para a assistência médica especializada. Caso o resultado dos testes sejam positivos, você deve permitir a coleta de uma amostra de sangue do bebê meses após o nascimento para avaliar a ocorrência da transmissão do vírus para ele(a). As coletas de sangue da mãe e do bebê devem ocorrer 1, 3, 6 e 12 meses após o parto para avaliar a evolução viral e ainda o risco de transmissão pós-parto.

Não existem riscos aparentes diretamente relacionados ao estudo. Entretanto, a coleta de sangue pode ocasionar pequena hemorragia local ou complicações inespecíficas. A fim de proteger os participantes do estudo, as coletas serão realizadas na própria maternidade por profissionais bem treinados. Por outro lado, participar deste estudo pode trazer alguns benefícios diretos e indiretos: (1) saber se você e seu bebê têm ou não infecção pelo vírus da hepatite C permite que você busque por acompanhamento médico especializado e


tratamento, evitando que a infecção evolua para complicações hepáticas mais graves; (2) reduz o risco de transmissão por desconhecimento da infecção para seu parceiro sexual, seu bebê e demais membros da família e; (3) reduz o risco de transmissão a terceiros.

É importante destacar que seu nome e identificação serão mantidos em sigilo. Além disso, você é livre para recusar em participar do estudo ou dele retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer transtorno ou interrupção de seu atendimento médico pela maternidade.

Eu, \_\_\_\_\_,  
li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu atendimento médico. Sei que meu nome não será divulgado e que não terei despesas. Eu recebi uma cópia do termo de esclarecimento. Eu concordo em participar do estudo e autorizo a utilização do material biológico coletado em futuras pesquisas, sem necessidade de contato prévio.

Salvador, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário  
(ou responsável)

  
Luciano Kalabric Silva  
Assinatura do pesquisador responsável  
CPqGM/FIOCRUZ  
SIAPE 25301

\_\_\_\_\_  
Testemunha

\_\_\_\_\_  
Testemunha

**Contatos:**

**Pesquisador Responsável:** Dr. Luciano Kalabric Silva  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas  
Tel.: 71-3176-2265 / E-mail: [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

**Santa Casa de Misericórdia da Bahia - Hospital Santa Izabel**  
Praça Almeida Couto, 500, Nazaré  
Tel.: 71-2203-8362 / Email: [cephsi@scmba.com.br](mailto:cephsi@scmba.com.br)

**Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):**  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA  
R. Waldemar Falcão, 121, Candeal de Brotas  
Tel.: 71-3176-2285 / E-mail: [cep@bahia.fiocruz.br](mailto:cep@bahia.fiocruz.br)

## **APÊNDICE II - Carta de encaminhamento do paciente para buscar assistência médica**





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA  
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Superintendência de Atenção Integral à Saúde  
Maternidade Prof. José Maria de Magalhães Netto  
Gestão: Santa Casa de Misericórdia da Bahia



**Maternidade**  
Prof. José Maria de Magalhães Netto  
Uma Referência para a vida

## Projeto de Pesquisa “PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C EM GESTANTES E TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL”

### CARTA DE ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos a Sra. \_\_\_\_\_, parturiente atendida na Maternidade Referência Prof. José Maria de Magalhães Neto e voluntária no projeto de pesquisa “Prevalência de Infecção pelo HCV em gestantes e transmissão materno-infantil”, com suspeita sorológica de infecção pelo HCV para acompanhamento.

LOCAIS DE ATENDIMENTO:

**Serviço de Hepatologia – Terça-feira**

**Ambulatório Prof. Magalhães Neto (AMN) – UFBA**

R. Padre Feijó, 240, 3. andar, Canela, Salvador-BA – Ao lado do Hospital das Clínicas

Contatar: Dr. André Lyra / Dra. Lourianne Cavalcante

Horário: Terça-feira a partir das 14h00.

**Serviço de Hepatologia – Quarta-feira**

**Ambulatório Prof. Magalhães Neto (AMN) – UFBA**

R. Padre Feijó, 240, 3. andar, Canela, Salvador-BA – Ao lado do Hospital das Clínicas

Contatar: Dr. Raymundo Paraná/ Dra. Helma Cotrim

Horário: Quarta-feira a partir das 14h00.

**Ambulatório de Hepatites Virais/Centro de HTLV - FBDC**

R. Dom João VI, 275, Brotas, Salvador-BA

Contatar: Dra. Delvone Almeida

Horário: Sexta-feira a partir da 14h00.

**Hospital Geral Ana Nery**

Rua Saldanha Marinho, s/n, Caixa D'água, Salvador, Bahia

Contatar: Dra. Lourianne Cavalcante

Setor de ambulatório de Clínica Médica

Horário: Segunda a partir das 13h00

Atenciosamente,

**OBS.: APRESENTAR ESTE DOCUMENTO PARA SUA IDENTIFICAÇÃO E PRONTO ATENDIMENTO.**

Pesquisador Responsável:

Dr. Luciano Kalabric Silva

Tel.: 71-3176-2265

E-mail: [kalabric@bahia.fiocruz.br](mailto:kalabric@bahia.fiocruz.br)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):

FIOCRUZ-BA

Tel.: 71-3176-2285 /

E-mail: [cep@bahia.fiocruz.br](mailto:cep@bahia.fiocruz.br)

Protocolo n. 265 - Parece n. 166/2008

Aprov. 24/04/2008.

Hospital Santa Izabel - SCMBA

Tel.: 71-2203-8362

Email: [cephsi@scmba.com.br](mailto:cephsi@scmba.com.br)

Protocolo n. 225519

Aprov. 28/10/2008.

## APÊNDICE III – Dados suplementares (Supplementary data)

Supplementary Table 1. Comparison of quasispecies parameters between MTCT-mothers, from genotypes 1a and 1b, at the nucleotide and the amino acid levels.

Region	Parameters	Nucleotide level			Amino acid level		
		1a	1b	<i>p</i> value	1a	1b	<i>p</i> value
5'UTR	CT ratio	0.17	0.38	ns	NA	NA	NA
	Sn	0.15	0.49	ns	NA	NA	NA
	Mf	0.001	0.008	ns	NA	NA	NA
	Pn	0.001	0.002	*	NA	NA	NA
E1	CT ratio	0.17	0.36	ns	0.08	0.23	ns
	Sn	0.12	0.44	ns	0.00	0.26	ns
	Mf	0.000	0.007	ns	0.000	0.005	ns
	Pn	0.000	0.002	ns	0.000	0.004	ND
HVR1	CT ratio	0.33	0.24	ns	0.25	0.35	ns
	Sn	0.45	0.64	*	0.29	0.51	**
	Mf	0.005	0.076	ns	0.010	0.095	ns
	Pn	0.003	0.010	ns	0.007	0.020	*
E2	CT ratio	0.80	0.85	ns	0.07	0.50	ND
	Sn	0.88	0.91	ns	0.00	0.62	ns
	Mf	0.007	0.584	**	0.000	0.016	ns
	Pn	0.003	0.050	**	0.000	0.050	ND
NS5B	CT ratio	0.63	0.57	ns	0.42	0.29	ns
	Sn	0.77	0.65	ns	0.53	0.37	ns
	Mf	0.005	0.004	ns	0.005	0.005	ns
	Pn	0.003	0.026	ns	0.004	0.026	ns

MTCT, mother-to-child transmission; 5'UTR, untranslated region 5'; E1 and E2, envelope 1 and 2, respectively; HVR1, hypervariable region 1; NS5B, non-structural region 5B; CT, clonotype; Sn, normalized Shannon entropy; Mf, mutation frequency; NA, not applicable; ND, not determined. *p* value: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

Supplementary Table 2. Comparison of quasispecies parameters between subgenomic regions at the nucleotide level.

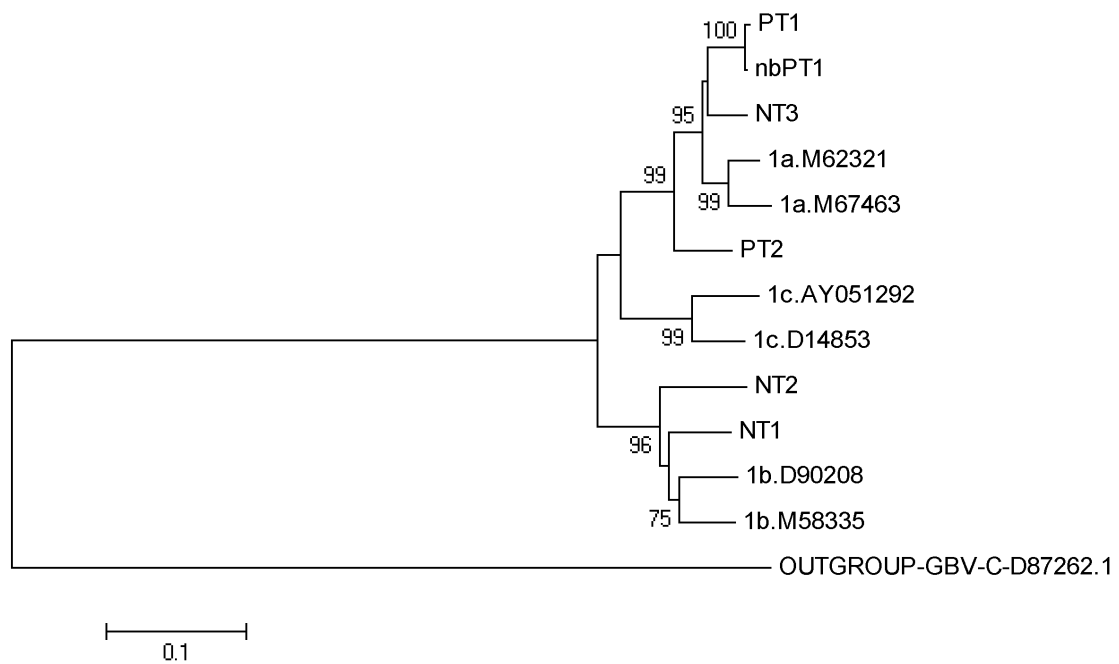
Parameters	5'UTR	E1		HVR1		E2		NS5B	
		1a	<i>p</i> value	1a	<i>p</i> value	1a	<i>p</i> value	1a	<i>p</i> value
CT ratio	0.2683	0.3817	ns	0.3000	ns	0.7533	**	0.6233	**
Sn	0.3149	0.4286	ns	0.4726	ns	0.8490	**	0.7071	*
Mf	0.0033	0.0042	ns	0.0345	ns	0.2142	ns	0.0047	ns
Pn	0.0013	0.0025	ns	0.0105	*	0.0285	*	0.0182	ns

MTCT, mother-to-child transmission; 5'UTR, untranslated region 5'; E1 and E2, envelope 1 and 2, respectively; HVR1, hypervariable region 1; NS5B, non-structural region 5B; CT, clonotype; Sn, normalized Shannon entropy; Mf, mutation frequency; *p* value: ns,  $p > 0,05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

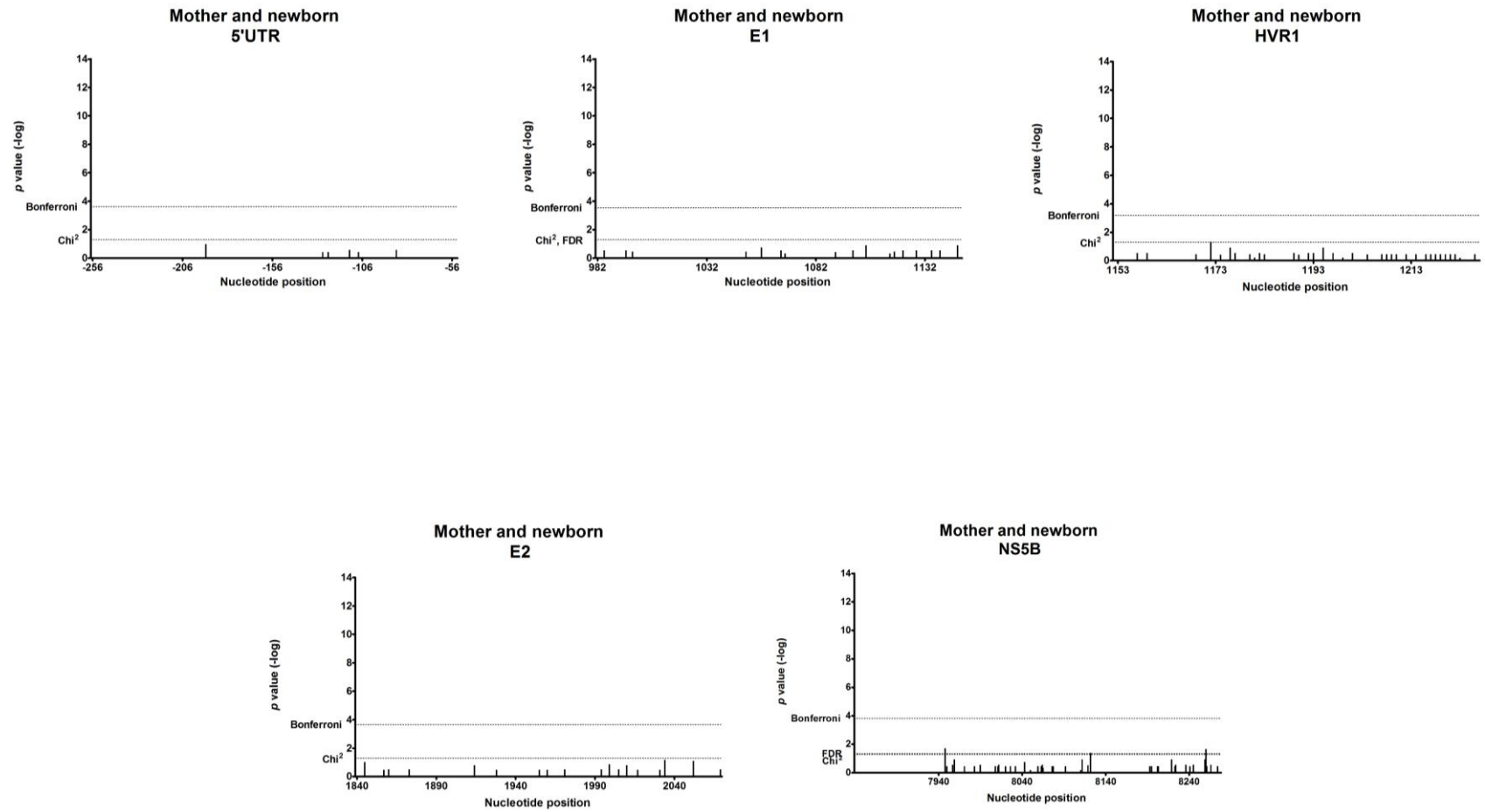
Supplementary Table 3. Comparison of quasispecies parameters between MTCT+ and MTCT- mothers, all from genotype 1a, at the nucleotide and the amino acid levels.

Region	Parameters	Nucleotide level			Amino acid level		
		MTCT+	MTCT-	<i>p</i> value	MTCT+	MTCT-	<i>p</i> value
5'UTR	CT ratio	0.1800	0.1700	ns	NA	NA	NA
	Sn	0.1854	0.1473	ns	NA	NA	NA
	Mf	0.0009	0.0005	ns	NA	NA	NA
	Pn	0.0007	0.0005	ns	NA	NA	NA
E1	CT ratio	0.3350	0.1700	ns	0.2431	0.0833	ns
	Sn	0.3699	0.1154	ns	0.2570	0.0000	ns
	Mf	0.0021	0.0005	ns	0.0035	0.0000	ns
	Pn	0.0020	0.0005	ns	0.0030	0.0000	ns
HVR1	CT ratio	0.3350	0.3300	ns	0.3059	0.2500	ns
	Sn	0.3505	0.4502	ns	0.3157	0.2903	ns
	Mf	0.0150	0.0051	ns	0.0305	0.0100	ns
	Pn	0.0118	0.0031	ns	0.0215	0.0070	ns
E2	CT ratio	0.7450	0.8000	ns	0.3647	0.0667	ns
	Sn	0.8612	0.8847	ns	0.4541	0.0000	ns
	Mf	0.0528	0.0066	ns	0.0290	0.0000	ns
	Pn	0.0331	0.0029	ns	0.0460	0.0000	ns
NS5B	CT ratio	0.6050	0.6300	ns	0.4250	0.4211	ns
	Sn	0.6408	0.7725	ns	0.4738	0.5295	ns
	Mf	0.0029	0.0048	ns	0.0045	0.0050	ns
	Pn	0.0256	0.0034	ns	0.0260	0.0040	ns

MTCT, mother-to-child transmission; 5'UTR, untranslated region 5'; E1 and E2, envelope 1 and 2, respectively; HVR1, hypervariable region 1; NS5B, non-structural region 5B; CT, clonotype; Sn, normalized Shannon entropy; Mf, mutation frequency; NA, not applicable; *p* value: ns, *p* > 0,05.



Supplementary Figure 1. Genotyping of concatenated PCR products, including sequences from 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B from the isolates using phylogenetic analysis through Neighbor-joining method, bootstrap (BS) value = 10.000. Only BS values above 70 are shown.



Supplementary Figure 2. Nucleotide association test between viruses from mother-newborn pair, at the nucleotide level. Different regions were analyzed: 5'UTR, E1, HVR1, E2 and NS5B.

## **ANEXO I – Carta de aceite da maternidade**

Salvador, 22 de novembro de 2007

DM/ OF. Nº 067/2007

Ilmo. Sr.  
Dr. Luciano Kalabric Silva  
Tecnologista em Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz  
Ministério da Saúde  
NESTA

Ref.: Projeto de Pesquisa.

---

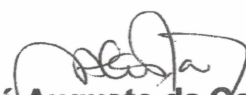
Prezado Doutor,

Em resposta ao pedido de colaboração ao projeto de pesquisa “Prevalência de Infecção pelo Vírus de Hepatite B e C em Gestantes e Transmissões Materno - Infantil”, afirmamos nosso interesse em apoiar sua solicitação.

Lembramos ainda, de acordo com entendimentos, os custos adicionais deverão ser da responsabilidade da coordenadoria do projeto, assim como a captação dos dados.

Perfeitamente integrado ao espírito de colaboração, entendendo a importância desta pesquisa para as ações estratégicas da Política de Saúde em benefício da população de Salvador, agradeço a confiança na instituição.

Atenciosamente,

  
José Augusto da Costa  
Diretor Médico



## **ANEXO II – Carta de aceite do LACEN-BA**



**GOVERNO DO ESTADO DA BAHIA**

Secretaria da Saúde do Estado da Bahia

Superintendência de Vigilância e Proteção da Saúde

LACEN – Lab. Central de Saúde Pública Profº Gonçalo Moniz

## CARTA DE AUTORIZAÇÃO

O Laboratório Central da Bahia – LACEN, unidade integrante do Sistema Único de Saúde (SUS) e de referência para o Estado, vem por meio desta expressar o interesse na execução do Projeto intitulado “**Prevalência de Infecção pelo vírus da Hepatite C em gestantes e transmissão materno-infantil**”, coordenado por Dr. Luciano Kalabric Silva e desenvolvido em parceria com o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e a Maternidade Referência Professor José Maria de Magalhães.

  
**Rosane Magalhães Will**  
Diretora

## **ANEXO III – Termo de compromisso da FIOCRUZ-BA**

## **Proposta nº 766 - Aprovada**

Mitermayer Galvão dos Reis [miter@bahia.fiocruz.br]

**Enviado:** segunda-feira, 9 de maio de 2011 16:17

**Para:** Luciano Kalabric Silva

**Cc:** Mitermayer Galvão dos Reis

---

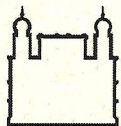
Prezado(a) Luciano Kalabric Silva,

**Título: FATORES VIRAIS E DO HOSPEDEIRO IMPLICADOS NO CLAREAMENTO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC) NA TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL**

Sua proposta foi considerada **Aprovada** por Diretoria.

**Atenciosamente,  
Diretoria**

## **ANEXO IV - Carta de aprovação do CEP-FIOCRUZ-BA**



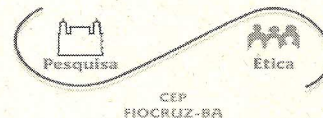
Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

## PARECER FINAL Nº 242/2011

**Protocolo: 357**

**Projeto de Pesquisa: “Fatores Virais e do Hospedeiro Implicados na eliminação da Infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) na Transmissão Materno - Infantil”.**

**Pesquisador(a) Responsável:** Dr Luciano Kalabric Silva

**Instituição ou Departamento:** Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ

### Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao pesquisador responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado**, em 26/09/2011 o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios parciais e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

**Vigência: 26/09/2011 a 26/09/2013**

**Relatório parcial: 26/09/2012**

**Relatório final: 26/10/2013**

*The present study, entitled “Fatores Virais e do Hospedeiro Implicados na eliminação da Infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) na Transmissão Materno - Infantil” has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz– FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in September 26<sup>th</sup> 2011 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until September 26<sup>th</sup> 2013.*

Salvador, 26 de Setembro de 2011.

**Adriana Lanfredi Rangel**

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CPqGM/FIOCRUZ

IORG-0002090 / IRB-00002612

Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40.296-710, Brasil.

Tel: (55)-(71) 3176-2285 e-mail: cep@bahia.fiocruz.br