



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

**IVANETE DO SOCORRO ABRAÇADO AMARAL**

**A INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES INTERFERONS LAMBDA 3  
LAMBDA 4 E ANCESTRALIDADE GENÉTICA NA INFECÇÃO CRÔNICA PELO  
VÍRUS DA HEPATITE C E NA RESPOSTA AO TRATAMENTO EM UMA  
POPULAÇÃO MISCIGENADA DE BELÉM-PARÁ-BRASIL**

Belém, PA  
2015

IVANETE DO SOCORRO ABRAÇADO AMARAL

**A INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES INTERFERONS LAMBDA 3  
LAMBDA 4 E ANCESTRALIDADE GENÉTICA NA INFECÇÃO CRÔNICA PELO  
VÍRUS DA HEPATITE C E NA RESPOSTA AO TRATAMENTO EM UMA  
POPULAÇÃO MISCIGENADA DE BELÉM-PARÁ-BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Área de concentração: Clínica das Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma.

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos

Belém, PA  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema da Biblioteca da UFPA

---

Amaral,Ivanete do Socorro Abraçado

A influência dos polimorfismos nos genes Interferons  
lambda 3 lambda 4 e ancestralidade genética na infecção crônica pelo  
vírus da hepatite C e na resposta ao tratamento em uma população  
miscigenada de Belém-Pará-Brasil Ivanete do Socorro Abraçado  
Amaral; orientador, Juarez Antonio Simões Quaresma Eduardo José  
Melo dos Santos – 2015.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de  
Medicina Tropical, programa de Doutorado em Doenças Tropicais,  
Belém, 2015.

Vírus da hepatite C- Belém. I. Título.

CDD

---

IVANETE DO SOCORRO ABRAÇADO AMARAL

**A INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES INTERFERONS LAMBDA 3  
LAMBDA 4 E ANCESTRALIDADE GENÉTICA NA INFECÇÃO CRÔNICA PELO  
VÍRUS DA HEPATITE C E NA RESPOSTA AO TRATAMENTO EM UMA  
POPULAÇÃO MISCIGENADA DE BELÉM-PARÁ-BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

Aprovada em: / /

Conceito:

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma - Orientador - UFPA

---

Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos – Co-orientador - UFPA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Esther Castello Branco de Mello Miranda - UFPA

---

Dra Janaína Mota de Vasconcelos – Instituto Evandro Chagas.

---

Prof<sup>ª</sup> Dra.Sâmia Demachki – UFPA

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Irna Carla Rosário Souza Carneiro- UFPA

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a Deus que é presença viva em minha vida.

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos que direta ou indiretamente participaram da construção deste projeto.

Então Maria disse: Minha alma glorifica o Senhor; e o meu espírito exulta em Deus meu salvador. Porque lançou os olhos para a humildade de sua serva, eis que de hoje em diante, todas as gerações me chamarão bem aventurada.

Lucas 1,46 -56

## RESUMO

A infecção crônica pelo vírus da Hepatite C é um problema global de saúde pública em que mais da metade dos indivíduos infectados evoluem para a sua forma crônica bem como carcinoma hepatocelular. Este estudo objetiva descrever os polimorfismos nos genes da IL-28B e do IFNL4 na população de Belém com infecção crônica pelo vírus da hepatite C já que podem influenciar na resposta terapêutica e na história natural desta infecção. Trezentos e sessenta e seis pacientes foram atendidos no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará confirmados por RT-PCR e 243 controles. Os SNPS estudados foram determinados por técnica da PCR Real time e a ancestralidade foi avaliada usando 48 marcadores INDEL validados para populações parentais Europeu, Africano e Indígena. Foi encontrado contribuições de ancestralidade Africana, Europeia e Ameríndia em pacientes e controles, respectivamente (0,06 vs 0,04), (0,588vs 0,662), (0,275) vs (0,214). As frequências dos rs-860 C/C, C/T, T/T, (C/T e T/T) em pacientes e em controles, respectivamente foram: (21% vs 38%), (59% vs 48%), (19% vs 14%), (79% vs 62%). As frequências genotípicas nos rs-917 em pacientes e em controles não mostraram significância. As distribuições das frequências genotípicas no rs-590 foram semelhantes às encontradas no rs-860. Como preditores de resposta terapêutica: gênero feminino, idade abaixo de 45 anos, estágio de fibrose hepática F1F2, rs8099917 genótipo T/T, RNA HCV <600.000UI/ml e níveis de Plaquetas  $\geq 150 \times 10^4/\text{mm}^3$ . A resposta terapêutica se associou com o rs-917 T/T, o seu alelo mutante em homozigose ou heterozigose com falha terapêutica e F3 F4. Em conclusão, do ponto de vista da genética, uma única troca de base nitrogenada em um determinado cromossoma leva grandes repercussões em diferentes populações estudadas interferindo com aspectos relacionados a resposta terapêutica e história natural da infecção HCV. Estas informações poderiam levar a um tratamento individualizado com melhor perspectiva de resposta, aumentada vigilância para certos pacientes com maior probabilidade de evoluir para estágios mais avançados fibrose e carcinoma hepatocelular.

**Palavras-chave:** Hepatite C, Ancestralidade, SNP, IFL3, IFL4.



## ABSTRACT

Chronic infection by Hepatitis C virus is a global public health problem in which more than half of infected people evolves to chronicity and can progress to cirrhosis with its complications as well as hepatocellular carcinoma. This study aimed to describe the polymorphisms in genes IL-28B and IFNL4 in a population of Belém with chronic infection by hepatitis C because they can influence the therapeutic response and the natural history of this infection. Three hundred and sixty-six patients were attended at Santa Casa de Misericórdia do Pará Hospital, confirmed by RT-PCR and 243 controls. The SNPs studied were determined by PCR Real Time technique and ancestry was assessed using 48 INDEL markers validated for European, African and Indian parental populations. Contributions of African, European and Amerindian ancestry were found in patients and controls, respectively (0.06 vs 0.04), (0.58 vs 0.662) (0.275) vs (0.214). The frequencies of rs-860 C/C, C/T, T/T (C/T and T/T) in patients and controls were respectively: (21% vs 38%), (59% vs 48%), (19% vs 14%), (79% vs 62%). The rs-917 genotype frequencies in patients and controls showed no significance and genotype frequencies in rs-590 were similar to those in rs-860. As predictors of therapeutic response: female gender, age below 45 years old, hepatic fibrosis stage (F1F2), rs-917 genotype T/T, HCV RNA <600.000UI/ml and platelets levels  $\geq 150 \times 10^4 / \text{mm}^3$ . Therapeutic response was associated with the rs-917 T/T and its mutant allele in heterozygous or homozygous was associated with therapeutic failure and F3 F4. In conclusion, from the point of view of genetics, one nitrogenous base exchange on a particular chromosome leads to large repercussions on different studied populations interfering with aspects related to the response to therapy, natural course of HCV infection. This information could lead to individualized treatment with better prospects of responses, increased vigilance for certain patients more likely to progress to more advanced stages of fibrosis and hepatocellular carcinoma.

**Keywords:** Hepatitis C, Ancestry, single-nucleotide polymorphisms, IFNL3, IFNL4.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Entrada do HCV na célula com os receptores candidatos e internalização do vírus na célula.....	22
Figura 2	Organização do genoma do vírus da hepatite C.....	23
Figura 3	Replicação viral e liberação dos vírus por exocitose.....	24
Figura 4	Representação da árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV encontrados em países industrializados, e as suas principais associações epidemiológicas com grupos de risco específicos.....	25
Figura 5	Representação esquemática dos genótipos na atualidade. Árvore evolucionária dos sete genótipos e os conhecidos subtipos.....	26
Figura 6	Epidemiologia da infecção HCV.....	27
Figura 7	Demonstrações ilustrativa do fígado normal e fígado com fibrose.....	28
Figura 8	Representação esquemática do processo de fibrose hepática com participação do macrófago (célula de Kuffer) regulando a progressão ou a regressão da fibrose.....	29
Figura 9	Interferon tipo I e tipo III, seus receptores específicos na membrana celular e sinalização celular através da JAK-STAT que induzem genes responsáveis pela resposta antiviral.....	32
Figura 10	Polimorfismos de nucleotídeo único em torno das regiões do IFNL3/4 que estão associados à resposta ao tratamento da infecção HCV com a combinação do esquema com IFN PEG e RBV.....	34
Figura 11	Localização do gene que codifica a família do Interferon $\lambda$ (IFN $\lambda$ ) e estudo de associação ampla de genoma demonstrando as localizações rs 12979860, 8099917 no cromossoma 19 (a); Estrutura exônica do IFN $\lambda$ 4 com a localização dos polimorfismos rs 12979860 (“IL-28B”) e IFN $\lambda$ 4 ss469415590 (IFN $\lambda$ 4- $\Delta$ G) (b).....	36
Figura 12	Associação de diferentes fatores genéticos protetores influenciando no resultado da infecção HCV de acordo com a população estudada.....	38
Figura 13	Organograma com as características da coorte estudada. IL-28B, IFNL4, Ancestralidade e resposta terapêutica.....	52
Figura 14	Polimorfismo dos genes da IL-28B rs 12979860 com genótipos agrupados C/C vs C/T e T/T em pacientes com infecção crônica HCV e controles $p=0,0042$ .....	56
Figura 15	Frequência dos genótipos agrupados em genótipos de susceptibilidade e genótipo protetor no polimorfismo dos genes do IFNL4 ss 469415590 nos pacientes com infecção crônica HCV e controles $p=0,0014$ .....	56
Figura 16	Frequência dos genótipos de susceptibilidade e protetor em homozigose nos polimorfismo dos genes do IFNL4 ss 469415590 nos pacientes com infecção crônica HCV e controles $p=0,017$ .....	57
Figura 17	Frequência dos genótipos heterozigotos de susceptibilidade nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979840 C/T, dos genes do IFNL4 ss 469415590 $\Delta$ G/TT e rs 8099917 G/T vs os genótipos protetores nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979840 C/C, dos genes do IFNL4 ss 469415590 TT/TT e rs 8099917TT, nos	

	pacientes com infecção crônica HCV e nos controles $p=0,022$ .....	57
Figura 18	Resposta virológica sustentada (RVS) e não resposta virológica sustentada (NRVS) em pacientes com infecção crônica HCV, tratados com o esquema combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina de acordo com o HCV-genótipo $p=0,02$ .....	60
Figura 19	RVS em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV, baseado no polimorfismo dos genes da IL- 28B rs 8099917. $X^2$ $p=0,007$ Figura 20- RVS em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV, baseado no polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917. $X^2$ $p=0,007$ .....	61
Figura 20	Estágio de Fibrose Hepática (METAVIR) em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV, baseado no polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917.....	63
Figura 21	RNA HCV UI/ml em pacientes com infecção crônica HCV-1, baseado no polimorfismo dos genes da IL-28B rs 12979860 $p= 0,0006$ .....	65
Figura 22	RNA HCV UI/ml em pacientes com infecção crônica HCV-1, baseado no polimorfismo dos genes do IFNL4ss 469415590 $p= 0,038$ .....	65
Figura 23	Quantidade de Contribuição da ancestralidade europeia nos pacientes com infecção HCV e controles $p=0,0019$ .....	66
Figura 24	Quantidade de contribuição da ancestralidade Ameríndia nos pacientes com infecção HCV e controles $p=0,0022$ .....	67
Figura 25	Frequência do genótipo rs 12979860 CC vs CT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia, $p=0,045$ .....	69
Figura 26	Frequência do genótipo rs 12979860 CC vs TT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia, $p=0,010$ .....	69
Figura 27	Frequência do genótipo rs 12979860 CC vs CT e TT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia, $p=0,082$ .....	70
Figura 28	Frequência do genótipo rs 12979860 CC vs CT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia, $p=0,018$ .....	70
Figura 29	Frequência do genótipo rs 12979860 CC vs CT e TT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia, $p=0,0202$ .....	71
Figura 30	Frequência do genótipo ss 469415590 TT/TT vs $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/TT$ em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia, $p=0,010$ .....	74
Figura 31	Frequência do genótipo ss 469415590 TT/TT vs $\Delta G/\Delta G$ e TT/TT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Europeu, $p=0,033$ .....	74
Figura 32	Frequência do genótipo ss 469415590 $\Delta G/TT$ vs TT/TT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Europeu, $p=0,0130$ .....	75
Figura 33	Frequência do genótipo ss 469415590 TT/TT vs $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/TT$ em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia, $p=0,014$ .....	75
Figura 34	Frequência do genótipo ss 469415590 TT/TT vs $\Delta G/TT$ em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia, $p=0,015$ .....	76
Figura 35	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos estágios de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p<0,0001$ .....	83

Figura 36	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos estágios de fibrose hepática F1F2, F3F4 em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p < 0,0001$ .....	84
Figura 37	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos gêneros dos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p = 0,0073$ .....	84
Figura 38	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nas idades $< 45$ anos e $\geq 45$ anos em pacientes HCV-1 tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p = 0,0044$ .....	85
Figura 39	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos níveis de RNA HCV $< 600.000$ UI/ml e $\geq 600.000$ UI/ml (carga viral) nos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p < 0,0001$ .....	85
Figura 40	Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos níveis de Plaquetas $< 150.000$ e $\geq 150.000$ nos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina $p < 0,000$ .....	86
Quadro 1	Representação da árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV encontrados em países industrializados, e as suas principais associações epidemiológicas com grupos de risco específicos.....	30
Quadro 2	Representação esquemática dos genótipos na atualidade. Árvore evolucionária dos sete genótipos e os conhecidos subtipos.....	35
Quadro 3	Associação de diferentes fatores genéticos protetores influenciando no resultado da infecção HCV de acordo com a população estudada.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores preditivos de resposta ao tratamento em pacientes com hepatite C.....	41
Tabela 2	Classificação histopatológica escore METAVIR.....	49
Tabela 3	Características dos 366 pacientes com infecção crônica HCV atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará.....	53
Tabela 4	Frequência das contribuições étnicas e frequência de polimorfismos da IL- 28B e IFNL4 de pacientes com infecção crônica HCV e controles....	55
Tabela 5	Estimação de parâmetros dos polimorfismos da Il-28B, do IFNL4, segundo a Lei de Hardy- Weinberg.....	58
Tabela 6	Variáveis clínicas e variáveis genéticas de pacientes com infecção crônica HCV.....	59
Tabela 7	Resposta Viroológica Sustentada em pacientes com infecção crônica HCV-1 baseado nos polimorfismos da IL-28B e IFNL4 .....	60
Tabela 8	Variáveis Clínicas e variáveis genéticas.....	62
Tabela 9	Estágios de fibrose hepática (classificação METAVIR) de acordo com os polimorfismos da IL-28B rs12979860, 8099917 e do IFNL4 em pacientes com infecção crônica HCV atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará no período de 2003 a 2013 .....	64
Tabela 10	Ancestralidade genética em pacientes e controles estudados.....	66
Tabela 11	Frequências dos Polimorfismos da IL-28B rs 12979860 de acordo com as contribuições étnicas em pacientes com infecção crônica HCV.....	68
Tabela 12	Frequências dos Polimorfismos da IL-28B rs 12979860 de acordo com os percentuais de contribuições de ancestralidade étnicas em pacientes com infecção crônica HCV .....	72
Tabela 13	Frequências dos Polimorfismos do IFNL4 ss469415590 de acordo com as contribuições étnicas em pacientes com infecção crônica HCV...	73
Tabela 14	Resposta ao tratamento PR e contribuições étnicas .....	76
Tabela 15A	Contribuições das ancestralidades genética de acordo com os genótipos da IL-28B rs 12979860 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes com HCV-1.....	77
Tabela 15B	Contribuição da ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo nos genes da IL-28B rs 8099917 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes HCV-1.....	78
Tabela 15C	Contribuição da ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo nos genes do IFNL4 ss 469415590 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes HCV-1.....	79
Tabela 16	Estagio de fibrose hepática F (METAVIR) e contribuições étnicas. ....	79
Tabela 17	RNA HCV UI/ml e contribuições étnicas .....	80
Tabela 18A	Resposta virológica sustentada (RVS), resposta virológica não sustentada (NRVS), baseada no Polimorfismo da Il-28B e do IFNL4 com genótipos agrupados em favoráveis e heterozigotos desfavoráveis ...	81
Tabela 18B	Resposta virológica rápida (RVR), resposta virológica lenta (RVL), baseada no Polimorfismo dos genes da Il-28B e dos genes do IFNL4 com genótipos agrupados em protetores e hetrozigotos de susceptibilidade.....	81
Tabela 19	Resposta terapêutica de acordo com dados demográficos, estágio de fibrose, atividade histológica, HCV-1 (Subtipo), carga viral, AST, ALT, G/G/T, níveis de plaquetas e avaliação da fibrose por métodos	

	não invasivos (FIB4 e APRI) em pacientes com infecção crônica HCV-1 .....	82
Tabela 20	Fatores preditores de RVS em pacientes com infecção HCV-1, que receberam tratamento com esquema de Interferon peguilado e Ribavirina .....	83
Tabela 21A	Fatores preditores de RVS em pacientes HCV-1, tratados com o esquema combinado PR avaliados por teste de Regressão Logística Simples, de acordo com as variáveis : idade, gênero, estágio de fibrose hepática, níveis plaquetários e Carga Viral .....	86
Tabela 21B	Fatores preditores de RVS em pacientes HCV-1, tratados com o esquema combinado PR avaliados por análise de regressão logística múltipla, de acordo com as variáveis Estágio de fibrose hepática, Níveis Plaquetários e Carga Viral.....	87
Tabela 22	Estimação probabilística de RVS em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com esquema combinado de Interferon Peguilado com Ribavirina, por teste de Regressão logística Múltipla de acordo com estágio de fibrose (F), níveis de Plaquetas e carga viral do HCV (RNA-HCV UI/ml).....	88
Tabela 23	Pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com a combinação PR, avaliados para falha terapêutica por Regressão logística simples de acordo com os polimorfismos estudados.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCV	Vírus da Hepatite C
CD	Células dendríticas
DAA's	Drogas Antivirais de Ação Direta.
IFNL	Downstream
IL	Interferon Lambda.
GWAS	Estudo amplo de genoma humano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPV	Partícula Lipoviral
Regime PR	regime combinado Interferon Peguilado e Ribavirina
RVFT	Resposta Viroológica ao Final do Tratamento
RVP	RVP- Resposta Viroológica Precoce
RPVp	RVPp- Resposta Viroológica Precoce Parcial
RVR	RVR-Resposta Viroológica Rápida
RVS	RVS- Resposta Viroológica Sustentada
SNP	Polimorfismo de Nucleotideo Único

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	18
2. PROBLEMA DA PESQUISA.....	20
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1 HEPATITE C.....	21
3.1.1. Estrutura do Vírus.....	21
3.1.2. HCV- Genótipo.....	25
3.1.3. Fibrose Hepática.....	27
3.1.4. Os Interferons.....	31
3.1.4.1 Polimorfismos do IFN $\lambda$ 3 ( IL28B) e IFN $\lambda$ 4 (IFNL4).....	33
3.1.5 Tratamento da Hepatite C.....	38
4 JUSTIFICATIVA .....	43
5 OBJETIVOS GERAIS .....	43
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
6 MÉTODO.....	44
6.1 TIPO DE ESTUDO.....	44
6.2 ÁREA DE ESTUDO. ....	44
6.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	44
6.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EXAMES DE LABORATÓRIO.....	46
6.4.1 Exames sorológicos e moleculares para o diagnóstico do HCV .....	47
6.4.2 Exame histopatológico .....	49
7 TRATAMENTO.....	49
8 ASPECTOS ÉTICOS.....	50
9 ANÁLISE DOS DADOS.....	50
10 RESULTADOS .....	50
10.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA.....	50
10.2 DADOS DEMOGRÁFICOS .....	51
10.3 FREQUÊNCIAS DAS CONTRIBUIÇÕES ÉTNICAS E FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS nos rs 12979860 C/C, CT, T/T, rs 8099917 G/G, G/T, T/T, ss 469415590 $\Delta$ G/ $\Delta$ G, $\Delta$ G/T/T, T/T/T/T NOS PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA HCV E CONTROLES. ....	54
10.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E VARIÁVEIS GENÉTICAS EM 366 PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO HCV.....	59
9.4.1- Avaliação dos Genótipos 1 e 2/3 do HCV vs RVS, Gênero, Idade, Estagio de Fibrose e Inflamação F e A (METAVIR), RNAHCV Quantitativo, Níveis de ALT e de G/G/T tabela 4 .....	59



10.5 ANCESTRALIDADE.....	66
10.5.1 Contribuições das Ancestralidades Genéticas Africanas, Européia e Ameríndia em Pacientes HCV e Controles .....	66
10.5.2 Frequências Genotípicas dos Polimorfismos da IL-28B rs 12979860 nas Contribuições Étnicas .....	67
10.5.3 Frequências Genotípicas dos Polimorfismos da IL-28B rs 8099917 nas Contribuições Étnicas .....	71
10.5.4 Frequências Genotípicas dos Polimorfismos nos genes do IFNL4 ss 469415590 nas Contribuições Étnicas .....	73
10.5.5 Contribuições de Ancestralidade Genética e Resposta Terapêutica com o Esquema Combinado PR em Pacientes com Infecção Crônica HCV-1 de Acordo com as Contribuições Étnicas. ....	76
10.6 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM A COMBINAÇÃO PR EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA HCV-1.....	80
10.6.1 Resposta Viroológica Rápida (RVR) e Resposta Viroológica Lenta (RVL) baseado nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, do IFNL4 ss 469415590.....	80
10.6.2 RVS, RVR e RVL Baseados nos Polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, do IFNL4 ss 469415590 com Genótipos Agrupados em genótipos protetores vs genótipos de susceptibilidade.....	80
10.6.3 Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada de acordo com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais.....	81
10.6.4 Variáveis predictoras de RVS em Pacientes com Infecção Crônica HCV-1 Tratados com o Esquema Combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina .....	82
11 DISCUSSÃO .....	90
12 CONCLUSÕES.....	101
13 REFERÊNCIAS.....	102
14 APÊNDICES.....	111
15 ANEXOS.....	112

## 1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV) foi descoberto em 1998 tendo sido estabelecido como a principal causa de hepatite diagnosticada como hepatite não-A não-B (CHOO E COL, 1998). A partir deste período avanços tem sido feitos sobre o conhecimento das características biológicas, história natural e tratamento deste vírus (ECHEVERRÍA, et al., 2015, EASLD, 2015, AASLD, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), cerca de 3% da população mundial está infectada pelo HCV com impacto importante na saúde pública mundial (HANAFIAH et al, 2013).

A infecção estava associada à transfusão de sangue até 1992 outros fatores de risco são: transplante de órgãos sólidos de doadores infectados, transmissão vertical, sexo com pessoa infectada, práticas sexuais envolvendo múltiplos parceiros, lesão de mucosa e uso de cocaína intranasal (ALTER, 1999; BARRET/T, GRANT, 2002; NIH, 2002).

Aproximadamente 25% dos pacientes com infecção aguda pelo HCV podem apresentar clareamento espontâneo e estas taxas podem aumentar se o paciente apresenta genótipo selvagem da IL28B, sintomas agudos e gênero feminino. Em torno de 75% dos pacientes evoluem para a forma crônica com risco de progressão para cirrose e carcinoma hepatocelular. A progressão da doença acelera após 20 anos de infecção (HAJARIZADEH, et al., 2013).

A prevalência e incidência no mundo são variáveis, embora muitos países da Ásia possuam uma prevalência de baixa a intermediária, cerca de metade da população global de pacientes com infecção crônica HCV encontram-se na Ásia (HAJARIZADEH, et al., 2013).

A Europa tem uma prevalência de 1%, a África 5,3% sendo a África central a mais endêmica. O Egito tem a mais alta prevalência com 11 a 14% ou aproximadamente 10 milhões de habitantes infectados (JENSEN, 2010). Na América Latina, a prevalência real não é conhecida, sendo sugerido que possa estar entre 1% e 2,6%, dependendo do país avaliado, e mesmo dentro de um mesmo país existem diferenças regionais (DÁVALOS, 2009). A soroprevalência no Brasil é de 1,2% e na Amazônia brasileira varia de 1,1 a 2,4 %, no Pará e de 2% e no Acre 2% e 5,9%, (FONSECA, et al.,2004).

O tratamento da infecção crônica pelo HCV vem sendo modificado e novos esquemas vêm surgindo, como as drogas antivirais de ação direta (DAAs) e as chamadas drogas alvo hospedeiro *host-targeting antivirals* (HATs) (ANTONELLI, et al., 2015). O tratamento com a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina, ainda tem seu espaço no arsenal terapêutico já que as novas opções terapêuticas tem alto custo e beneficiam os pacientes com estágios de fibrose hepática mais avançada (AASLD/IDSA, 2015, EASL, 2015, Brasil, 2015 )

É importante predizer no período pré-tratamento os melhores candidatos ao regime da combinação PR e melhor selecioná-los para as novas opções terapêuticas. Dados clínicos, dados de laboratório, informações histológicas referentes ao tecido hepático, podem ajudar a identificar candidatos a bons respondedores a este esquema terapêutico (ASSELAH, 2010).

Diferentes fatores foram associados com a falha terapêutica a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina como: fatores virais e fatores relacionados ao paciente. Um fator preditivo relacionado ao paciente importante para a RVS é a resposta virológica precoce (RVP) (definida como a queda de 2 log na carga viral do HCV na semana 12 de tratamento) e um mais forte preditor de RVS é a resposta virológica rápida RVR (indetectabilidade do RNA HCV na semana 4 de tratamento) (BRASIL, 2003). Atualmente com os tratamentos baseados em DAAs as definições de RVS modificaram sendo atualmente avaliadas com 12 semanas após o termino do tratamento (EASL, 2015).

Estudos recentes do tipo GWAS identificaram variações no gene da IL-28B como preditores de resposta ao tratamento com PR assim como com o clareamento viral (GE, et al., 2009; TANAKA, et al., 2009 e SUPPIAH, et al., 2009). Estas variações genotípicas ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) levam alguns hospedeiros a eliminarem o HCV. O SNP conhecido como rs 12979860, localizado 3mil bases *upstream* do gene IL-28B, mostrou associação com maior chance de clareamento espontâneo e resposta ao tratamento (THOMAS, et al., 2009).

Ainda no contexto genético, mais recentemente foi demonstrado o SNP ss 469415590 localizado antes do gene do IFNL3 (IL28B) que gera uma variante que consiste em um novo gene associado ao clareamento espontânea (PROKUNINA et al., 2013) cujo alelo  $\Delta G$  é desfavorável ao clareamento viral e a RVS em pacientes tratados com o regime Interferon Peguilado e Ribavirina (ANTONELLI, et al 2015).

As novas drogas antivirais DAAs estão mudando a interpretação de alguns destes fatores preditivos, mas a combinação de dados clínicos, virológicos e genômicos podem melhor predizer a RVS (AASLD/IDSA, 2015; EASL, 2015; Brasil, 2015, COELHO, 2010).

## 2 PROBLEMA DA PESQUISA

A infecção pelo HCV é um problema de saúde pública e os polimorfismos nos genes do IFNL3 (IL28B)/ IFNL4 e marcadores genéticos de ancestralidade não têm sido descritos na literatura.

A população de estudo é miscigenada com contribuição étnica trihíbrida e poucos estudos são encontrados sobre marcadores genéticos étnicos e HCV.

Ao longo dos anos a problemática recaía sobre os fatores preditivos de resposta terapêutica e pensando em valorizar este aspecto, se buscou conhecer mais sobre fatores genéticos do hospedeiro em relação à infecção HCV em população miscigenada, já que a maioria dos estudos realizados é feita em população mais homogênea onde o indivíduo da pesquisa se autodefine em relação a sua etnia.

É importante o conhecimento sobre os polimorfismos nos genes do Interferon lambda 3 (IFNL3 ou IL28-B) e nos genes do Interferon lambda 4 (IFNL4) em populações miscigenadas e suas associações com aspectos da infecção HCV porque a RVS é pouco satisfatória e o conhecimento mais amplo sobre o aspecto genético do hospedeiro pode inferir sobre o melhor candidato ao tratamento, sobre a história natural desta infecção e sobre as complicações que poderão advir com a doença hepática crônica em fase avançada.

Um número crescente de pacientes procura assistência no que diz respeito ao tratamento antiviral. Muitos que procuram atendimento médico já se encontram em fase de doença hepática crônica avançada com complicações da cirrose e com câncer de fígado. A identificação de fatores preditivos de resposta terapêutica pode ser usada para definir estratégias de tratamento individualizado e identificar os potenciais pacientes para entrar no regime de tratamento com as drogas antivirais de ação direta (DAAs) mesmo que não apresentem estágios avançados de fibrose hepática (F3F4) como exigida atualmente pelo Ministério da Saúde em protocolo de tratamento anti-HCV.

Avanços no conhecimento sobre a genética do hospedeiro em populações não homogêneas são imprescindíveis para melhorar o manejo desta infecção viral.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 HEPATITE C

##### 3.1.1 Estrutura do Vírus

O HCV pertence à família Flaviviridae, por apresentar similaridades com os vírus da dengue e da febre amarela (SIMMONDS, 1999). Por apresentar estrutura genômica semelhante à dos Flavivirus e Pestivirus, tendo sido proposto o gênero Hepacivirus para incluí-lo nesta classificação (ROBERTSON, 1998). Em 1989, o genoma de HCV foi clonado e seqüenciado após infecção em chimpanzé por sangue humano de um paciente com hepatite não-A não-B e, a partir daí, foi possível o desenvolvimento de teste sorológico para a detecção de anticorpo anti-HCV (CHOO, et al., 1989). A estimativa de pessoas com anti-HCV no mundo aumentou de 122 milhões em 1990 para 184 milhões em 2005 (HANAFIAH, 2013).

Para estudar o ciclo de vida do HCV é necessária a criação de modelos experimentais para obter sucesso em estabelecer um modelo *in vitro* para permitir a alta produção e secreção de vírions HCV tornando possível estudar melhor a estrutura deste agente infeccioso (HELLER, et al., 2005).

O HCV circula na corrente sanguínea do indivíduo infectado associado com lipoproteínas do hospedeiro em uma complexa estrutura denominada partícula lipoviral (LPV) (ANDRÉ, 2002). Esta LPV atinge seu alvo orgânico, o fígado através do endotélio fenestrado, interage com fatores de adesão e o vírus entra na célula usando prováveis receptores candidatos: CD81, receptor de LDL (LDL R) e um receptor do tipo *scavenger* classe B (SR-BI) (PIRELI, 1998). O mais provável candidato como receptor do vírus na célula do hospedeiro é a tetraspanin CD81 (PILERI, et al. 1998) que sozinha não é suficiente para a internalização do vírus na célula necessitando de co-fatores como um receptor tipo I do tipo *Scavenger* (SCARCELLI, et al, 2002, ).

Nos últimos oito anos foram identificados novos modelos de entrada do HCV na célula, porém têm-se comprovado a interação somente com o CD81 e o receptor *Scavenger* da classe B tipo I SR-BI (PALWLOTSKY, 2014, DUBUISSON, COSSET, 2014) figura 1.

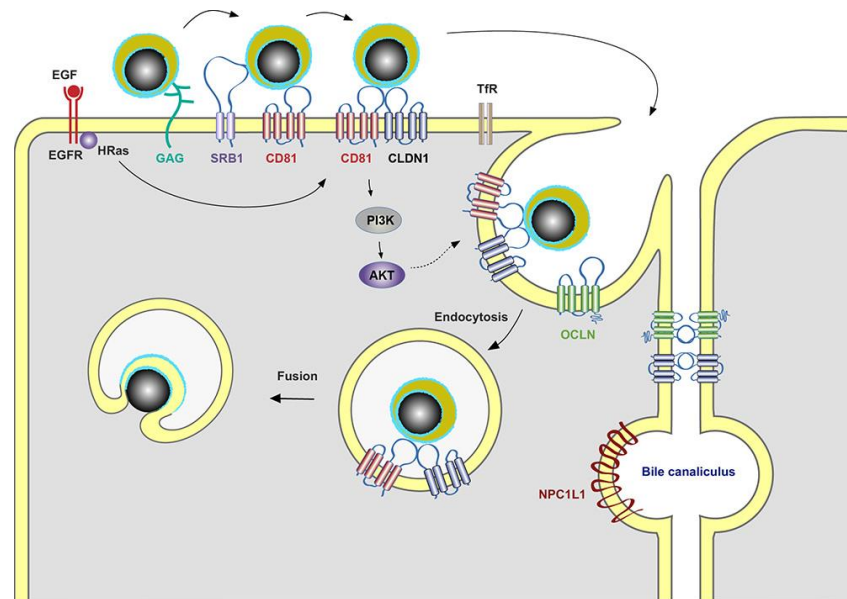


Figura 1 - Entrada do HCV na célula com os receptores candidatos e internalização do vírus na célula.

Fonte: Dubuisson, Cosset, 2014.

O HCV é um vírus envelopado, com 50nm de diâmetro, cujo genoma é um RNA de cadeia simples 9,6 Kb e de polaridade positiva, com cerca de 10.000 nucleotídeos (SIMMONDS, 1999). O genoma RNA do HCV serve como um RNAm (RNA mensageiro) para a tradução de proteínas. Na seqüência genômica tem-se uma longa fase de leitura aberta (ORF), que traduz uma poliproteína de 3100 aminoácidos e durante a replicação viral, esta poliproteína é clivada por enzimas virais bem como por enzimas do hospedeiro em três proteínas estruturais (Core, E1 e E2) e proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (XU, et al, 2001). A proteína P7 localizada entre a região estrutural e a não estrutural do HCV, mostra ser integrante da proteína de membrana. Em 2004 foi confirmada que a proteína 7 (P7) do HCV forma um canal de íon na bicamada lipídica da membrana (PREMKUMAR, 2004). Esta descoberta que exibiu um atividade do canal do íon cátion seletivo *in vitro* permitiu sua inclusão dentro da família viroporin. A P7 assegura o Ph

intracelular dando condições para a produção do vírus. Semelhantes a outros membros da família viroporin, a P7 do HCV modifica a permeabilidade da membrana e liberação do vírus *in vitro* e *in vivo*, indicando que a P7 está envolvida na fase tardia do ciclo de replicação do vírus (KHALIQ, et al., 2011).

A ORF (*open read frame*) está localizada entre duas regiões não codificadoras (UTR) altamente conservadas. As extremidades 5'(5'UTR) que tem aproximadamente 340 bases e nesta região se encontra a IRES, *internal ribosomal entry site* que é o sítio interno de ligação do ribossoma e participa do início da síntese protéica, e 3'(3'UTR) do genoma viral, a qual desempenha importante papel na replicação do HCV Figura 2, (WIESCH, et al., 2003; PENIN, et al., 2004; POOLE, 2006, ECHEVERRÍA et al., 2015).

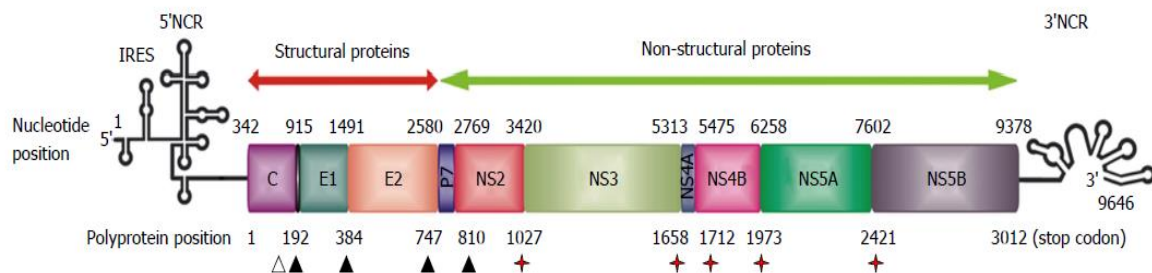


Figura 2 - Organização do genoma do vírus da hepatite C

Fonte: Echeverría, 2015

O Gene estrutural que codifica as proteínas do core e do envelope viral estão localizadas na região 5'UTR da ORF acompanhando abaixo por regiões que codificam proteínas não estruturais. As proteínas do core formam o nucleocapsídeo e as proteínas E1 e E2 compõem o envelope lipídico (LINDENBAC, et al, 2005). A proteína E2 contém um sítio de ligação para o CD81, que é uma proteína de membrana encontrada em linfócitos, hepatócitos e participa da internalização do vírus C nestas células (TELLINGHUISEN, et al., 2007).

A adsorção do vírus na célula alvo é o primeiro passo para a entrada do vírus que possivelmente ocorre após a interação da glicoproteína E2 do envelope e um glicosaminoglican da superfície da célula hospedeira (BARTH, 2003). Após a fusão do envelope viral e a membrana plasmática, o nucleocapsídeo é liberado dentro do citoplasma da célula. Após a decapsidação, ocorre a tradução do genoma viral no citoplasma levando a produção de uma proteína (PAWLOTSKY, 2004). Como já descrito, o genoma viral possui as

regiões terminais não traduzíveis, a 5'UTR consistindo de quatro domínios distintos (I-IV). Os domínios II –IV formam um sítio interno de entrada no ribossoma (IRES) envolvido no início da transcrição (FUKUSHI, 1994).

Iniciada a tradução do material genético do HCV no citoplasma através da IRES e processada a síntese da poliproteína (estruturais e não estruturais), ocorre maturação destas e as proteínas não estruturais e o RNA formam complexos de replicação com transcrição de fitas negativas de RNA intermediárias a partir das quais moléculas progênicas de fitas positivas são geradas. O RNA genômico e proteínas do capsídeo se unem formando o núcleocapsídeo que é transportado em vesículas citoplasmáticas passando pelo complexo de Golgi, após montagem do vírus é liberado da célula por exocitose (TELLINGHUISEN, et al., 2007, DUBUISSON, et al., 2014) figura 3.

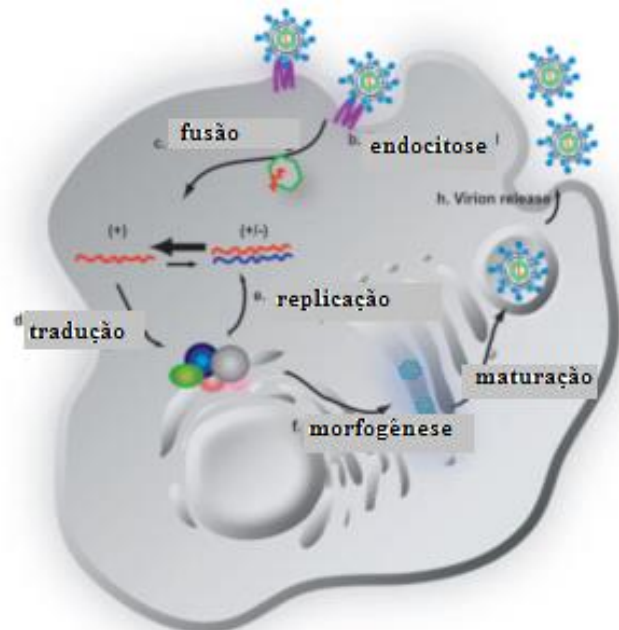


Figura 3 - Diagrama esquemático do ciclo de vida do HCV (TELLINGHUISEN, 2007).

Modelos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos e necessários para o entendimento sobre o ciclo de vida do HCV, a interação vírus-hospedeiro e conhecimento sobre a imunogenicidade. Todos esses aspectos são importantes pela possibilidade de emergência de resistência aos tratamentos atuais. O conhecimento mais amplo sobre o ciclo de vida do HCV



é fundamental para programar novas estratégias de prevenção, criação de vacinas contra o vírus da hepatite C e para novas estratégias de tratamento (CATANESE, 2015)

### 3.1.2 HCV- Genótipos

Os genótipos com os seus subtipos tem prevalência e distribuição geográfica variáveis em consequência da extensa diversidade genética tendo sido reportado inicialmente cinco genótipos figura 4 (SIMMONDS, et al., 2005).

Atualmente são descritos sete genótipos com seus subtipos figura 4 (ECHEVERRÍA, et al., 2015)

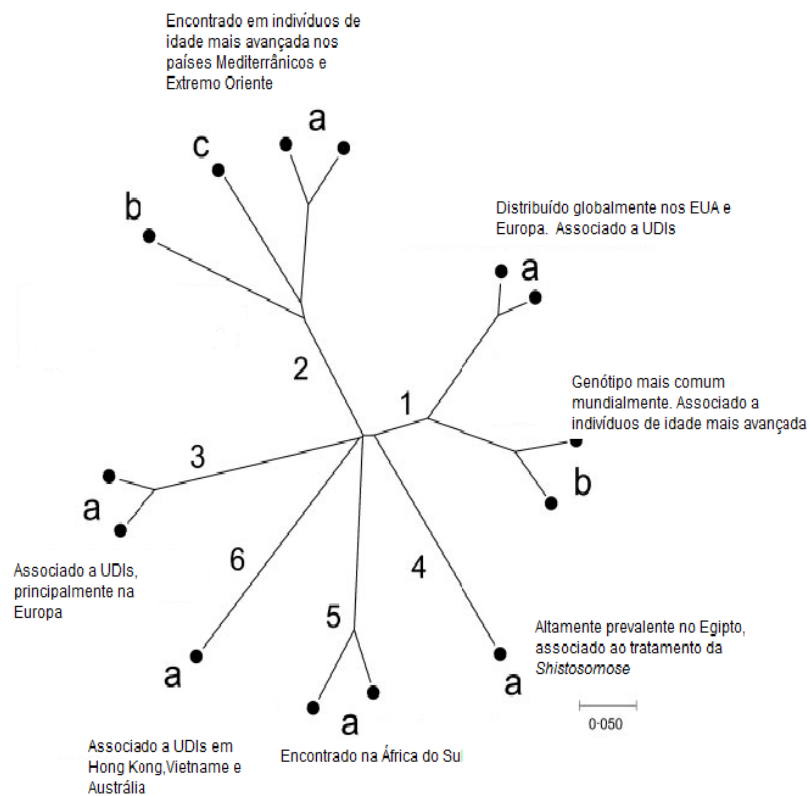


Figura 4- Representação da árvore evolutiva dos principais genótipos do HCV encontrados em países industrializados, e as suas principais associações epidemiológicas com grupos de risco específicos

Fonte: adaptado de Simmonds, 2005.

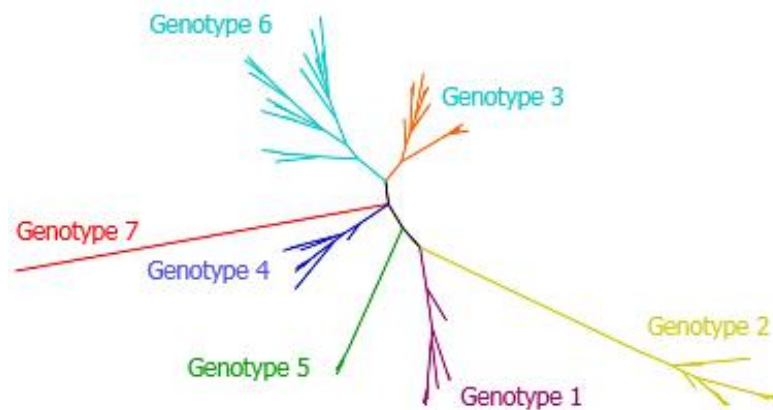


Figura 5- Representação esquemática dos genótipos na atualidade. Árvore filogenética dos sete genótipos e os conhecidos subtipos

Fonte: Echeverría, 2015

Os genótipos 1 e o 3 são os mais prevalentes no mundo e os genótipos 4 e 5 são principalmente distribuídos em países mais pobres (MESSINA, et al., 2015). O conhecimento da epidemiologia genotípica é importante visto que em regiões onde a prevalência do HCV-1 é maior, o benefício seria maior com o tratamento baseado em regimes de tratamento com drogas antivirais de ação direta (DAAs) sem o interferon. Em áreas onde o HCV-3 é mais prevalente, contando com aproximadamente 30% da infecção global, parece não responder muito bem aos regimes com DAAs. Esta alta diversidade genética caracterizada por uma prevalência genotípica global variável, desafia a criação de uma vacina contra a infecção HCV e um tratamento que tenha abrangência em todos os genótipos (MESSINA, et al., 2015)

A prevalência dos genótipos no mundo é variável, no Brasil são encontrados os genótipos 1, 2 e 3 (HAJARIZADEH, et al., 2013) figura 6.

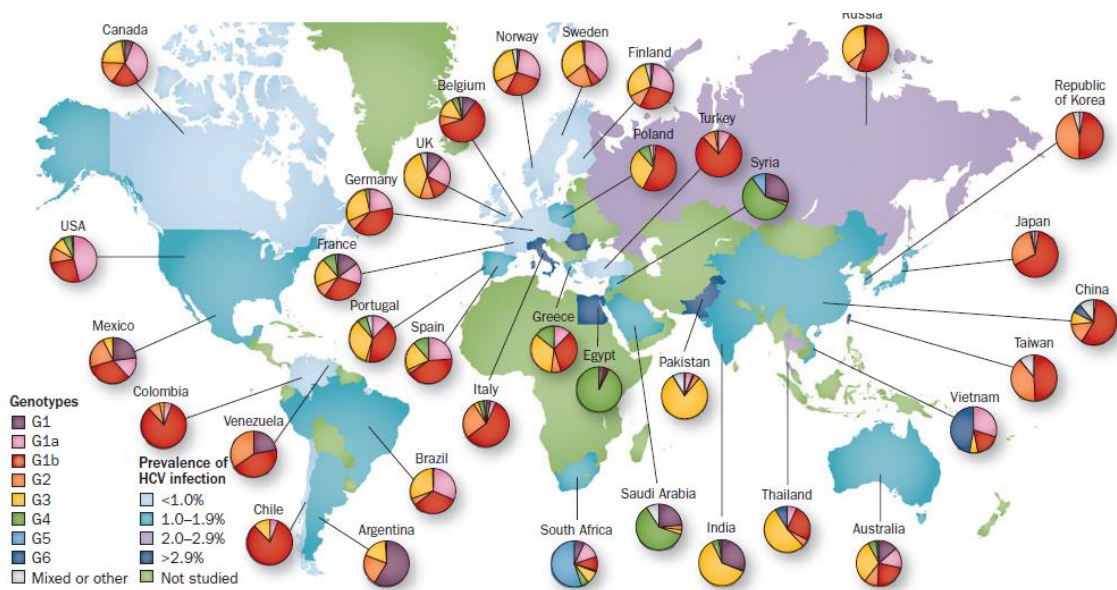


Figura 6 - Epidemiologia da infecção HCV

Fonte: Hajarizadeh, 2013.

Os diferentes genótipos influenciam o curso da infecção HCV. Em estudo com indivíduos espanhóis, a resolução espontânea da infecção HCV e a resposta virológica sustentada foi melhor no grupo de indivíduos com HCV-não 1 quando comparada com os indivíduos com HCV-1 (MONTES-CANO, et al, 2010).

A análise de 1.217 estudos publicados sobre a prevalência e HCV-genótipos no período entre 1989 e 2013, encontraram maior prevalência global do HCV-1 compreendendo 46,2% de todos os casos e 1/3 dos casos encontrando-se no Leste Asiático e o HCV-3 conta com uma prevalência global de 30,1% dos casos (MESSINA, et al., 2015).

### 3.1.3 Fibrose Hepática

A fibrose hepática ocorre por acúmulo dos componentes da matriz extracelular, tecido conjuntivo especialmente o colágeno em resposta a um dano hepático (inflamação) agudo ou crônico. Ocasionalmente, a fibrose pode ser rapidamente progressiva desenvolver de semanas a meses, como por exemplo, resultado de injúria por drogas, hepatite C após transplante de fígado (BONNARD, et al., 2007).

A fibrose hepática é a causa que leva a morbidade e mortalidade. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a imunidade hepática está alterada na fibrose e que a inflamação é o marco do início da fibrose hepática, resultando em ativação de células estreladas e deposição de matriz extracelular. Neste processo inflamatório, várias citocinas e quimiocinas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES estão envolvidos como mediadores da fibrose hepática e as células dendríticas (CD) estão expandidas em cinco vezes na fibrose hepática, e adquire uma marcada habilidade para estimular células NK, células T, células estreladas (CONNOLLY, 2009).

A lesão hepática envolve mecanismos imunológicos, formas reativas de oxigênio, toxicidade direta de agentes ou anóxia que levam ao dano celular com necrose ou apoptose. O estress oxidativo envolve espécies reativas de oxigênio resultante de desequilíbrio entre formas pró-oxidantes e a sua neutralização por antioxidantes resultando em dano celular (ROMA, POZZI, 2008). A agressão hepática, liberação de citocinas inflamatórias, vão ativar as células estreladas que se modificam tornando-se um miofibroblasto com capacidade de produzir componentes da matriz extracelular e capacidade contrátil figura 7.

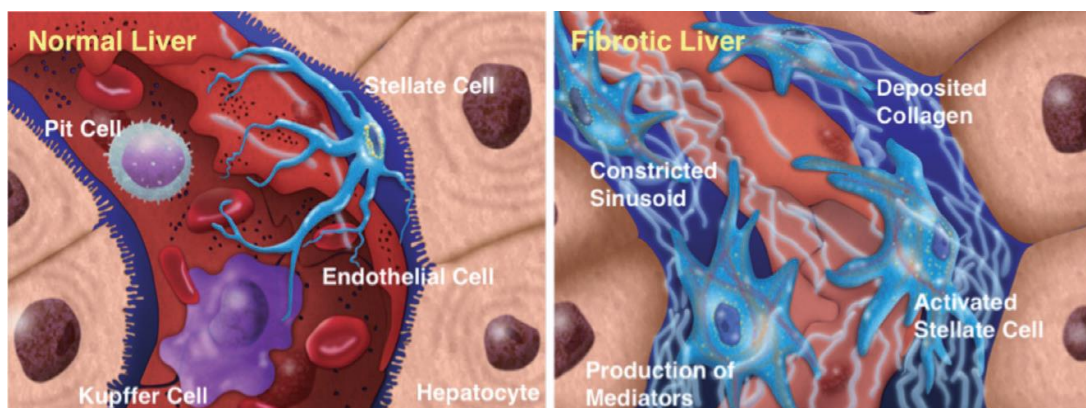


Figura 7 - Demonstrações ilustrativa do fígado normal e fígado com fibrose

Fonte: Kawada, 2011.

As células efetoras que estão principalmente envolvidas no processo de fibrogênese incluem: TGF $\beta$ 1 (*transforming growth factor*), o TNF (*tumor necrosis factor*), as interleucinas, a fibronectina, fator de crescimento plaquetário sendo o TGF $\beta$ 1 (*transforming growth factor  $\beta$ 1*) considerada a maior citocina fibrogênica no fígado. A célula estrelada é a principal célula efetora sobre a qual as citocinas irão atuar (FRIEDMAN, 2008), estas expressam receptores para o HCV, proteínas não estruturais e proteína do core e induz a proliferação destas células e liberação de sinais inflamatórios.

Os macrófagos podem ser considerados como os combustíveis para a fibrose hepática ou podem frear este processo, mais recentemente a atenção está voltada para o microambiente pró-fibrótico do fígado com importância para as células imunes e em especial subgrupos de macrófagos (células de Kupfer) que regulam a progressão ou a regressão da fibrose hepática (PELLICORO, 2014, TRAUTWEIN, 2015) figura 8.

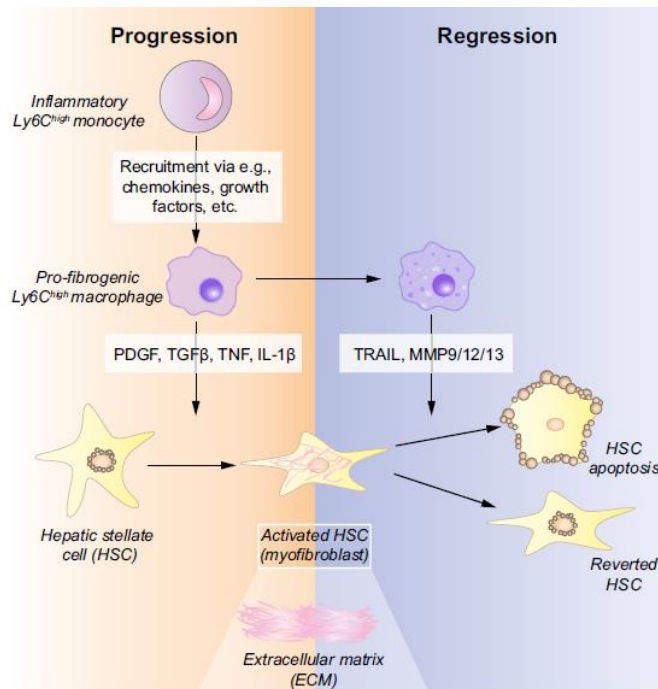


Figura 8 - Representação esquemática do processo de fibrose hepática com participação do macrófago (célula de Kuffer) regulando a progressão ou a regressão da fibrose.

Fonte: Trautwein, 2015.

Algumas doenças específicas estão relacionadas com o processo de fibrogênese, destacando a esteatohepatite não alcoólica (EHNA) e o HCV. A obesidade está relacionada a uma prevalência crescente de EHNA e subsequente cirrose. Na obesidade, especialmente, a leptina, um hormônio adipogênico circulante, promove a fibrogênese através da estimulação de células estreladas e acentua a expressão da TIMP-1 que são inibidores de metaloproteases, a qual está associada com aumento da sinalização da leptina. Concomitantemente, adiponectina, um hormônio contraregulatório que antagoniza a atividade fibrogênica da leptina, está reduzido na fibrose hepática (IKEJIMA, 2007). Existe um desequilíbrio entre síntese do tecido conjuntivo e degradação do tecido fibroso, já que esta degradação está relacionada a ativação de enzimas metaloproteases (FRIEDMAN, 2008).

A biópsia ainda é o padrão ouro com melhor acurácia quando a amostra está acima de 1,5cm e a largura maior que 1mm, com um total superior a 10 espaços porta (CASSINOTO, et al 2013). Atualmente para a indicação dos novos tratamentos para a infecção crônica pelo HCV com drogas antivirais de ação direta, o estágio de fibrose hepática é condição para a liberação das medicações pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). Em 1996 na França, foi criado um sistema de escore para simplificar o diagnóstico histopatológico na infecção pelo HCV em que através das duas letras (A e F) e números, tornou possível quantificar a atividade histológica (A) que leva em consideração a piecimeal necrose e necrose lobular e quantificar a fibrose hepática (F) considerando a presença e a quantidade de septos fibrosos (BEDOSSA; POYNARD, 1996).

Atualmente são disponibilizados vários métodos não invasivos (mecânicos e/ou Bioquímicos) para avaliar o estágio de fibrose hepática. Os métodos não invasivos mecânicos incluem a Elastografia hepática transitória avaliada por Fibroscan, a Elastografia ARFI (*Acoustic Radiation Force Impulse Elastography*) por força de impulso de radiação acústica e a Elastografia por ressonância Magnética. Entre os métodos bioquímicos existem vários, e os mais validados são: APRI (Índice AST/plaquetas), Fibrotest e o Fibrometer (CASSINOT/TO, 2013, POYNARD, 2004).

Existem atualmente vários métodos não invasivos para a avaliação de fibrose hepática como observado no quadro 1 (PATEL, BEDOSSA, CASTERA, 2015 ).

Biomarcadores	ano	etiologia	Pacientes (n)	F≥2 (%)	F4 (%)	Cutoffs	AUROC	Se (%)	Sp (%)	C/C (%)
FibroTest <sup>81</sup>	2001	HCV	339	80		>0.48	0.87	75	85	46
FornsIndex <sup>77</sup>	2002	HCV	476	26		<4.2>6.9	0.81	30-94	51-95	45
Apr <sup>64</sup>	2003	HCV	270	50		<0.5>1.5 <1.0≥2.0	0.80 0.89	41-91 57-89	47-95 75-93	44 72
FibrospeCTII <sup>82</sup>	2004	HCV	696	52		>0.36	0.83	77	73	75
MP3 <sup>65</sup>	2004	HCV	194	45		<0.3>0.4	0.82	35-65	85-96	NA
ELF <sup>83</sup>	2004	Mixto	1021	40		0.102 NA	078 089	87 NA	51 NA	NA NA
EPI <sup>66</sup>	2005	HCV	302	48		<0.2>0.8	0.77	42-85	48-98	40-49
HepaScore <sup>84</sup>	2005	HCV	211	57		≥0.5 >0.84	0.82 0.89	63 71	89 89	92 NA
Fibrometer <sup>85</sup>	2005	Mixto	598	56		NA	0.89	80	84	82
Lok Index <sup>67</sup>	2005	HCV	1141		38	<0.2≥0.5	0.81	40-98	53-99	52
GUCI <sup>68</sup>	2005	HCV	179		12	>0.1	0.85	80	70	NA
Hui Score <sup>68</sup>	2005	VHB	235	25		≤0.15>0.5	0.79	37-88	50-88	49
Zeng Score <sup>70</sup>	2005	VHB	372	58		<3.0>8.7	0.77	40-98	28-90	35
Virahep-C <sup>71</sup>	2006	HCV	398	37		≤0.22>0.55	0.83	41-90	54-90	52
FibroIndex <sup>72</sup>	2007	HCV	360	50		≤1.25≥2.25	0.83	30-40	97-97	35
FIB-4 <sup>78</sup>	2007	HCV	847		17	<1.45>3.25	0.85	38-74	81-98	68
NFS75	2007	NAFLD	733		30	<.455>0.676	0.82	43-77	97-97	68
BARD Score <sup>76</sup>	2008	NAFLD	669		38	≥2	0.81	-	-	NA
HALT-C odel <sup>74</sup>	2008	HCV	512		38	<0.2 ≥0.5	0.81	47-88	45-92	48

Quadro 1 - Biomarcadores de fibrose hepática para pacientes com doença hepática crônica

Auroc, área abaixo da curva Roc, HBV, hepatite B crônica, HCV, hepatite C crônica, NA. Não avaliado, NAFLD, doença hepática gordurosa não alcoólica, Se, sensibilidade, Sp, especificidade.

Fonte: Patel, Bedossa, Castera, 2015

### 3.1.4 Os Interferons

Em qualquer infecção viral participam tanto a imunidade inata, como a imunidade adaptativa, porém a composição da resposta imunológica é diferente, se considerarmos a periferia do organismo e o compartimento intra-hepático (GONZALEZ e TALAL, 2003).

A imunidade hepática é apresenta componentes da imunidade inata que incluem: células reticuloendoteliais, células dendríticas, células *Natural Killer* (NK), citocinas inflamatórias, componentes do complemento, proteínas e quimiocinas de fase aguda, sendo o fígado adulto um importante sítio de produção de fatores de imunidade inata (O'FARRELLY, et al., 2005), Já a imunidade adaptativa no fígado é composta pela imunidade humoral e celular (NEUMANN-HAEFELIN, 2005).

Após a infecção do fígado pelo HCV, ocorre a replicação do vírus nos hepatócitos, sendo as partículas virais continuamente liberadas para a circulação, e as células NK e as NKT (células T NK) ativadas, levam a secreção de IFN- $\gamma$  que inibe a replicação do vírus C (CRAWFORD, 2005).

A resposta inata ao HCV é responsável pela ativação de citocinas, como o Interferon (IFN) que vão ativar proteínas antivirais inibindo a replicação viral e a resposta adaptativa neutraliza o vírus destruindo as células infectadas (THIMME, 2006). O RNA do HCV é reconhecido pelo receptor LTR (*Toll-like receptor*) e responde com a produção de IFN-I  $\alpha$  e  $\beta$  (SAMUEL, 2001). A infecção viral aguda desencadeia uma resposta imune não específica, principalmente envolvendo a secreção de IFN tipo I e ativação de células *Natural Killer* (NK). O IFN tipo I não é suficiente para inibir a replicação viral. Tem sido demonstrada uma incapacidade para ativação das células *natural Killer* (NK) em resposta a estimulação pelo IFN- $\alpha$  sendo sugerida que esta deterioração interfere na resposta a infecção aguda pelo HCV (JINUSHIN, 2004).

Os interferons são produzidos por várias células do organismo em resposta a estímulos virais, com atividade antiviral. A família de IFN é dividida em três tipos: Tipo I, tipo II e tipo III. O interferon tipo I contém 13 membros do IFN  $\alpha$  e um único membro de cada (IFN- $\beta$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$  e IFN- $\epsilon$  e são codificados pelo gene que está localizado próximo ao cromossoma 9 que induz a produção de diversas proteínas, como PKR (proteína quinase),

proteína Mx (TAYLOR, 2000) e a 2',5'oligoadenilato sintetase (OAS) que ativa uma ribonuclease que irá degradar o RNAm viral impedindo a síntese de novas partículas virais (PETERS, 1989) ao aumento da expressão das moléculas do MHC de classe I, no estímulo ao desenvolvimento de células Th1 e, também no aumento da atividade citotóxica das células. O interferon do tipo II é representado pelo IFN- $\gamma$ , codificado no cromossoma 12, já os IFNs do tipo III são representados pelos IFN- $\lambda$ 1,  $\lambda$ 2 e  $\lambda$ 3 ou IL-29, IL-28A e IL-28B. O Gene da IL-28B está localizado no cromossoma 19q13. O IFN tipo III (IFN- $\lambda$ ) o mais recentemente descrito, são potentes citocinas endógenas com ação antiviral, portanto a genética do hospedeiro na infecção viral fornece novos meios para inferir sobre susceptibilidade a infecção viral e resposta ao tratamento anti viral. (DONNELLY, KOTENKO, 2010, RIVA, et al, 2014, BALAGOPAL, 2010).

O IFN se liga ao receptor de membrana da célula infectada (IFNR) que ativa a sinalização celular via Janus Kinase (JAK), que leva a fosforilação de proteínas do citoplasma denominada STATs 1 e 2 (*Sinal Transducer of ACTivated Transcription*). A STATs formam um dímero que vão ao núcleo da célula formando um complexo com a proteína p48, denominado fator de estimulação de genes ISGF3 (*IFN Stimulated Gene Factor 3*). Este complexo vai se ligar ao ISRE que é um promotor de RNA havendo estímulo de genes responsáveis pela produção de proteínas de resposta contra o vírus (TAYLOR, 2000, O'BRIEN, 2009).

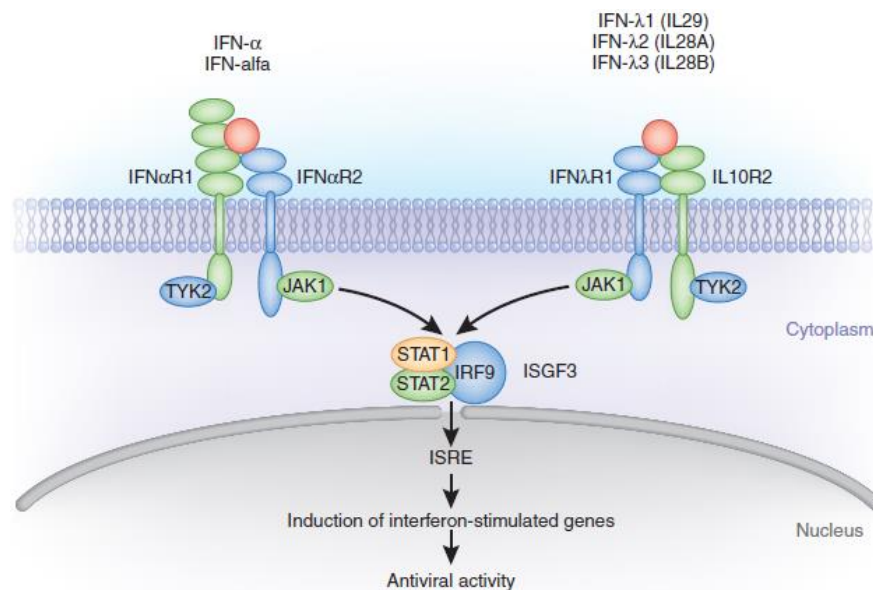


Figura 9 - Interferon tipo I e tipo III, seus receptores específicos na membrana celular e sinalização celular através da JAK-STAT que induzem Genes responsáveis pela resposta antiviral.

Fonte: O'Brien, 2009.



Em 2013 foi realizado o sequenciamento de RNA em hepatócitos humanos e *Upstream* do IFNL3 (IL28-B) no cromossoma 19q13.13, foi descoberto um gene que codifica um IFN tipo III denominado IFNL4, uma região transitoriamente que abriga uma variante dinucleotídeo T/T/ΔG, que está em forte desequilíbrio de ligação com o rs 12979860. A variante ss 469415590-ΔG cria um novo gene específico primário designado IFNL4 que codifica uma proteína de moderada similaridade com o IFNL3. A expressão do IFNL4 induz a fosforilação das STAT1, STAT 2 e a expressão de genes estimulados por IFN (ISGES). O IFNL4 se relaciona com o clareamento HCV em indivíduos de ancestralidade africana (PROKUNINA, 2013, RIVA 2014).

Sobre o papel do Interferon lambda eles podem influenciar a resposta imune na diferenciação de macrófagos a partir de macrófagos fenotipicamente M0 para M1 ou M2. Na polarização M1 que ocorre na presença de alelos major dos IFNs λ, os macrófagos produzem grande quantidade de IL-12 e IL-23, espécies reativas de oxigênio, e citocinas inflamatórias como IL-1, Fator de necrose tumoral (TNF-α) e IL-6, portanto resposta Th1. Na polarização M2 que ocorre com os alelos *minor* dos IFNs λ, não ocorre apresentação de antígenos para as células T e ocorre mínima produção de citocinas pró-inflamatórias, portanto a resposta Th2. Células T citotóxicas e células Th1 vírus específico são importantes no controle da replicação viral, enquanto as células B estão relacionadas com os sinais recebidos de células Th2 (EGLI, et al, 2014).

#### **3.1.4.1 Polimorfismos do IFNλ 3 ( IL28B) e IFN λ4 (IFNL4).**

A partir de 2009 três estudos de exploração do genoma humano (GWAS) informaram sobre o polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) próximo à região *IL-28B* (IFN-λ3) e sua associação com a resposta terapêutica à infecção pelo vírus da hepatite C (GE, 2009, SUPPIAH, 2009, TANAKA.2009). O Gene IL28B codifica a interleucina 28B, conhecida como interferon Lambda tipo III (IFN-λ3) constitui um mensageiro químico das reações imunológicas com atividade antiviral. O polimorfismo rs12979860 está 3 kb *upstream* do gene que codifica o IFN λ3, o rs 8099917 está na região intergênica entre IL28A e IL28B pertencendo a família do Interferon tipo III, está localizado 8,9Kb da IL28B e 16Kb da IL28A, quando esses polimorfismos estão na região reguladora ou dentro de um gene eles podem afetar a expressão ou ação desses genes afetando seu produto transcrito e traduzido como o IFN neste caso (BUCHANAN, HYDES; KHAKO, 2015) figura 10.

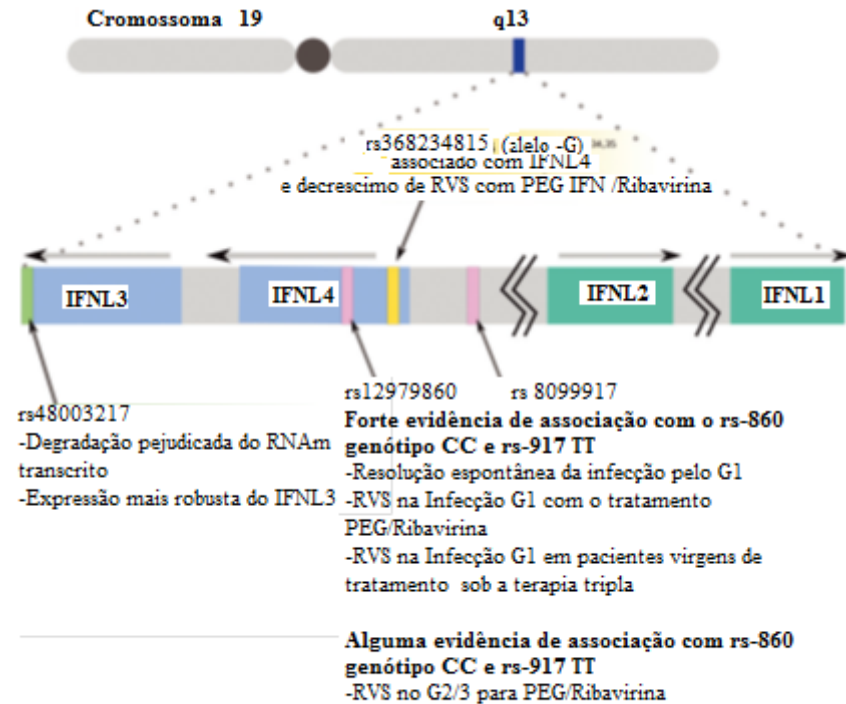


Figura 10 - Polimorfismos de nucleotídeo único em torno das regiões do IFNL3/4 que estão associados a resposta ao tratamento da infecção HCV com a combinação do esquema com IFN PEG e RBV.

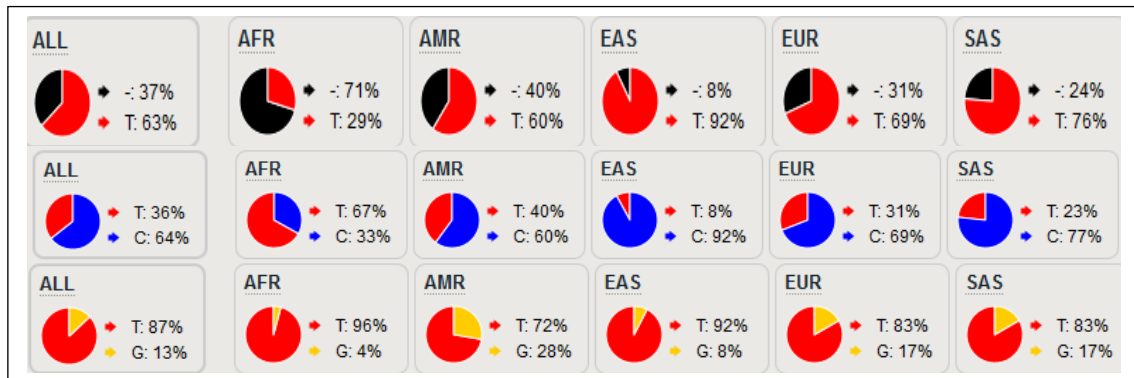
Fonte: Buchanan R, Hydes T, Khako SI, 2015

Estes primeiros estudos sobre polimorfismo nos genes da IL-28B em pacientes com infecção crônica HCV, revelaram a importante participação de fator genético referente ao hospedeiro interferindo na resposta terapêutica ao esquema da combinação PR e por se tratar de população mais homogênea quase todos os estudos foram feitos sob visão fenotípica em relação à ancestralidade (GE, 2009; SUPPIAH, 2009; TANAKA, 2009).

Um importante achado sobre este polimorfismo rs 12979860 no cromossoma 19, foi a identificação do alelo C (favorável) significativamente mais frequente em Americanos-Europeus e população Asiática que em Afro-Americanos (GE, 2009). Outro estudo GWAS realizado em população japonesa, descreveu a predição do gene da IL-28B rs 8099917 com o alelo minor G em não resposta terapêutica a combinação PR (TANAKA, 2009). O terceiro estudo em uma coorte de Europeus, a RVS foi alcançada em quase 60% de 442 pacientes com o rs 8099917 genótipo T/T, 36,4% de 357 pacientes com o genótipo G/T e 30,6% de 49 pacientes com o genótipo G/G (SUPPIAH, 2009).

As frequências genotípicas rs 12979860 C/C, CT, T/T, rs 8099917 G/G, G/T e T/T são variáveis em estudos publicados (CAVALCANTE, 2012, CHANG, et al 2015; CHEN, et al., 2014, AKKARATHAMRONGSIN, 2014).

No projeto 1000 genomas é possível observar a distribuição global dos alelos nas ancestralidades fenotípicas, figura 8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



Quadro 2 - Distribuição dos alelos na população mundial, ss 469415590  $\Delta$ G, T/T; rs12979860 T, C e rs8099917 T, G.

Fonte: Dados obtidos de National Center for Biotechnology Information

O polimorfismo no gene da IL-28B também foi relacionando com a história natural da hepatite C, com cinética viral além de resposta terapêutica (THOMPSON, 2010, MONTES-CANO, 2010, CHUANG; YU, 2013).

O genótipo rs12979860 demonstrou ser preditor de resposta ao tratamento com combinação PR em pacientes com hepatite C crônica (MC/CART/THY, et al., 2010).

Em 2013 foi publicada a identificação de um novo gene que induz a codificação de uma proteína humana o Interferon lambda 4 *upstream* do IFNL3 (IL28B) no cromossoma 19q13.3 que abriga uma variante dinucleotídeo ss469415590 (T/T/ $\Delta$ G) em desequilíbrio de ligação com o rs 12979860 (PROKUNINA, et al., 2013). A partir desta identificação outras publicações foram feitas.

No contexto clínico, o IFNL4 com o genótipo  $\Delta$ G/T/T fornece a melhor predição genética de clareamento viral e na atualidade em que as drogas antivirais de ação direta ocupam o principal espaço no arsenal terapêutico contra a infecção HCV, o IFNL4-T/T/T/T tem alta probabilidade para responder em 8 semanas ao esquema Ledispavir/sofosbuvir em pacientes HCV-1 (O' BRIAN, 2015).

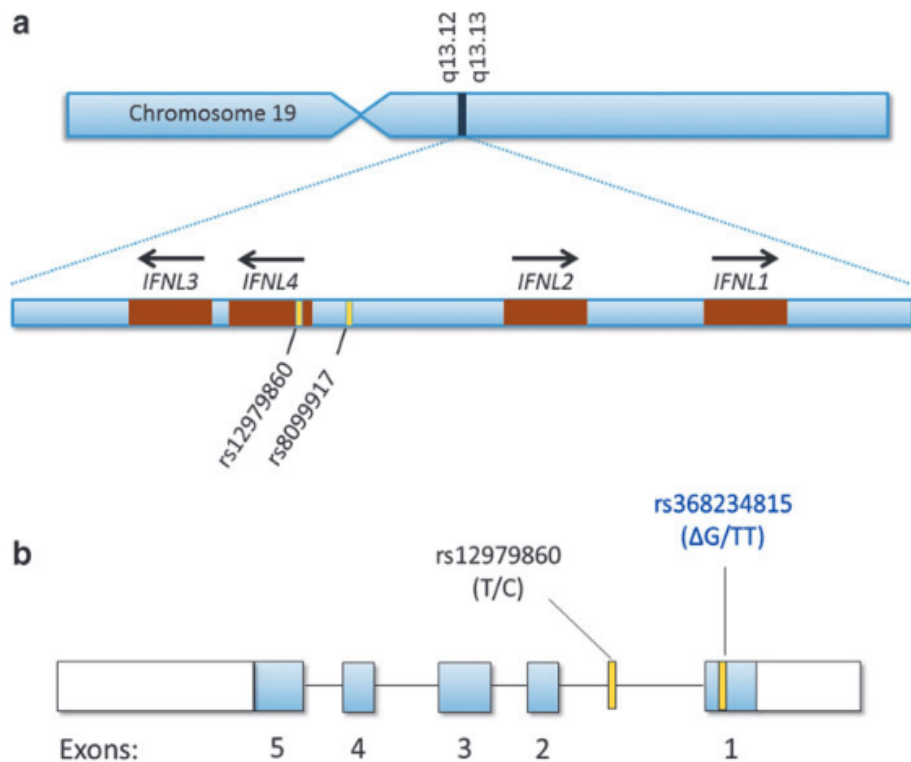


Figura 11- Localização do gene que codifica a família do Interferon  $\lambda$  (IFN $\lambda$ ) e estudo de associação ampla de genoma demonstrando as localizações rs 12979860, 8099917 no cromossoma 19 (a); Estrutura exônica do IFN $\lambda$ 4 com a localização dos polimorfismos rs 12979860 (“IL-28B”) e IFN $\lambda$ 4 ss469415590 (IFN $\lambda$ 4- $\Delta$ G) (b).

Fonte; O’ Brien, 2015.

Sobre os aspectos genéticos do hospedeiro, existem muitas interrogações com relação ao comportamento do HCV nas diferentes populações. Importante ressaltar como já citado anteriormente que os três grandes estudos de associação ampla de genoma humano (GE, 2009, SUPPIAH, 2009, Rauch, 2009), promoveram um salto no conhecimento sobre a infecção HCV.

A partir daí a comunidade científica se voltou para os aspectos genéticos do hospedeiro para inferir sobre vários aspectos da infecção HCV como o clareamento viral, resposta ao tratamento e evolução para a cronicidade.

Comparando a frequência de 500.000 polimorfismos de nucleotídeo único em 347 caucasianos Suíços com clareamento espontâneo e infecção crônica HCV, foi observado forte associação de clareamento espontâneo com o rs 8099917 G/T e associação do rs 8099917 alelo G com a infecção crônica e com a falha terapêutica (RAUCH, et al., 2009)

No GWAS, compararam a frequência de 600.000 polimorfismos de nucleotídeo único em DNA de 1.137 pacientes com infecção crônica HCV de acordo com a resposta ao

tratamento da infecção crônica HCV com a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina (GE, et al, 2009). Foi encontrada associação do rs 12979860 alelo C com a resposta ao tratamento em 2 vezes mais quando comparado ao rs 12979860 T/T. Nesta publicação, foi observada alta ligação entre os SNPs rs 12979860 e rs 8099917 em caucasianos e baixa em afro americanos, portanto influência de diferentes etnias.

É variável a distribuição dos alelos nos polimorfismo nos genes da IL-28B rs 12979860, do rs 8099917, e no polimorfismo nos genes do IFNL4 ss 469415590 em diferentes populações. O rs 12979860 alelo C (protetor) é menos frequente em africano, no entanto o rs 8099917 alelo G (alelo de risco) é menos frequente em Africano e o rs8099917 alelo T (protetor) chega a 96% nesta população. Com relação ao IFNL4 ss 469415590, os Asiáticos (China e Japão) tem uma frequência grande do alelo protetor T/T/T/T (93,3%) e quase não tem o alelo considerado desfavorável ( $\Delta G$ ) 0,07%, já os Africanos apresentam uma frequência maior do alelo  $\Delta G$  78,3%, (NCBI,2015). Ainda não foi totalmente explicado como os aspectos genéticos do hospedeiro determinam o fenótipo da doença (BUCHANAN, HYDES, KHAKO, 2015).

A resposta à infecção viral tem a participação da imunidade inata e adaptativa e os polimorfismos já estudados, podem influenciar nas respostas do hospedeiro a infecção viral. É complexo o entendimento sobre todos os fatores que podem influenciar no fenótipo da infecção HCV quando o HCV-genótipo, vários polimorfismos relacionados ao KIR, sistema HLA, IL-28B, IFNL4 ocorrem em diversas populações incluindo populações mais homogêneas ou miscigenadas, portanto as respostas imunogenéticas para o HCV são específicas para o hospedeiro e para o vírus (VASCONCELOS, et al., 2013; BUCHANAN, HYDES, KHAKO, 2015; WOJCIK, et al., 2014; PROKUNINA, et al., 2013; LAU-CORONA, KERSHENOBICH, GUTIERREZ-REYES, 2011; THI, 2010; SUPPIAH, et al., 2009; GE, et al., 2009; RAUCH, et al., 2009; TANAKA 2009) figura 13.

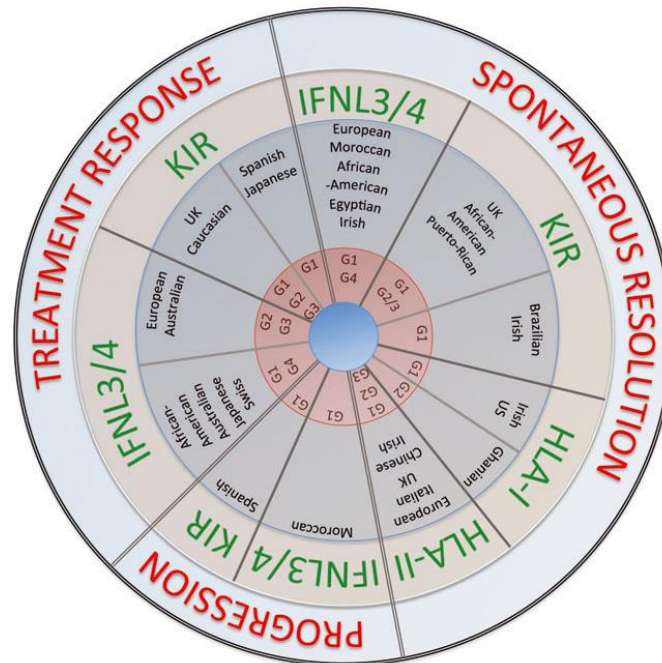


Figura 11 - Associação de diferentes fatores genéticos protetores influenciando no resultado da infecção HCV de acordo com a população estudada

Fonte: BUCHANAN, HYDES, KHAKO, 2015

### 3.1.5 Tratamento da Hepatite C

Foi demonstrado que o Interferon  $\alpha$  tem sua produção reduzida por linfócitos de sangue periférico de pacientes com hepatite crônica viral quando comparados com os controles sendo assim foi introduzido o interferon no tratamento da hepatite viral (DAVIS; HOOFNAGLE, 1986).

O tratamento efetivo da hepatite C, inicialmente foi com o interferon  $\alpha$  (IFN  $\alpha$ ), com formas alternativas como o IFN Linfoblástico, IFN consensus, sendo o mais usado IFN $\alpha$  na dose de 3 milhões de unidades (MU) três vezes por semana, por seis meses, com fraca resposta ao tratamento (POL; BRÉCHOT, 2000). Posteriormente, foi observado que a ribavirina (RBV) que é um análogo da guanósina (MC HUTCHISON, 1998), reduzia os níveis de ALT transitoriamente, mas não reduzia os níveis de RNA-HCV quando usado isoladamente no tratamento. A partir de então, foi usada a RBV associada ao IFN  $\alpha$  com melhora da resposta ao tratamento (WEILAND, 1999). Em 2001 foi introduzido no arsenal terapêutico o Interferon Peguilado, resultado de um processo de peguilação, o qual é um método estabelecido para modificar as propriedades imunológicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas das proteínas, mantendo sua atividade intrínseca, quando associados a

molécula de polietilenoglicol. Muitas vantagens foram conseguidas com este processo, incluindo o aumento da meia vida sérica da droga, permitindo uma dose semanal da mesma, com níveis séricos terapêuticos mantidos.

Considerado uma combinação efetiva para o tratamento da hepatite C, o IFN-peguilado e Ribavirina (PR), com duração do tratamento de acordo com o genótipo, sendo 24 semanas suficientes para o genótipo 2 e 3 (HCV-2 e 3), e 48 semanas para o genótipo 1 (HCV-1) (BOYER, 2003). O Instituto nacional de saúde (NIH) definiu critérios de resposta à terapia antiviral, tais como: resposta bioquímica e virológica, traduzida respectivamente, por normalização dos níveis de aminotransferase e de resposta virológica, de acordo com o tempo decorrido para responder ao tratamento (CRAXI; CAMMA; GIUNTA, 1999).

Em 1990, modelos matemáticos de infecção viral foram usados para entender o ciclo de replicação do HCV e a cinética do vírus acompanhando o tratamento inicial. Ficou demonstrado que a redução da carga viral bifásica com uma queda rápida (24-48h), exponencial e dose dependente na primeira fase que decorre da habilidade do IFN em inibir a replicação viral. Um declínio lento na primeira fase sugere que o IFN não é muito efetivo em inibir replicação viral (LAYDEN-ALMER, LAYDEN, 2003). A segunda fase, mais lenta, mostrou ser variável entre os pacientes e a habilidade do IFN em inibir a replicação viral no estabelecimento da perda de células hepáticas infectadas pelo HCV. Um declínio lento da carga viral do HCV na segunda fase implica em um sistema imune ineficiente para eliminar este vírus. É a segunda fase que pode predizer negativamente a RVS. Existe forte evidencia de que esse parâmetro supera qualquer outro fator preditivo de resposta avaliado no pré-tratamento (LAYDEN-ALMER, LAYDEN, 2003).

Para a terapia PR foram avaliadas as respostas virológicas de acordo com a cinética viral como resposta virológica rápida (RVR) quando ocorria a não detecção do RNA-HCV abaixo do nível de indetectabilidade ( $\leq 15\text{UI/ml}$ ) na semana 4 de tratamento; resposta virológica precoce parcial (RVPP) definida como queda de pelo menos 2 log ou 10 vezes o valor do RNA-HCV pré-tratamento, o sua indetectação na semana 12 de tratamento (RVR total). Ao final do tratamento a resposta virológica (RVF) foi definida como indetectabilidade do RNA-HCV no final do tratamento e resposta virológica sustentada (RVS) como a não detecção do RNA-HCV 24 semanas após o término do tratamento. O respondedor lento (RVL) considerado quando o paciente apresentava RVPP e o RNA-HCV detectável na semana 24 de tratamento (ANDRIULLI, et al., 2008). A recidiva virológica foi definida como o reaparecimento do RNA-HCV durante o seguimento após o término do tratamento em pacientes com RVF (WIEGAND, 2011).

Os efeitos adversos relacionados ao tratamento combinado PR são inúmeros, como por exemplo: anemia, prurido, náuseas, insônia, faringite, dispnéia, anorexia, depressão e irritabilidade, entre outros que podem levar a suspensão do tratamento (BRASIL 2003).

A RVS foi observada em 30-40% dos pacientes tratados com INF-  $\alpha$ , porém com a associação de ribavirina (RBV) apresentou maior benefício. Com a combinação PR aumentou a porcentagem de RVS para mais de 50% (VIEIRA, et al., 2007). A correlação entre a cinética viral inicial e a RVS foi demonstrada com IFN isolado e com o regime PR (NEUMANN-HAEFILIN, et al., 2005).

Muitos anos se passaram desde a descoberta do vírus, e na última década, a eficácia do tratamento para a hepatite C crônica tem melhorado, mas o tratamento com o IFN insatisfatório na erradicação do HCV em pacientes cronicamente infectados. Em pacientes com HCV-1, alta carga viral virgens de tratamento, a RVS tem sido aproximadamente 10% com IFN convencional e aproximadamente 50% com a combinação PR. A combinação PR ainda é uma terapia usada para os pacientes com estágios de fibrose menores (EASL 2015; HADZIANNIS; et al, 2004).

O tratamento para infecção crônica pelo vírus da hepatite C com a combinação de Interferon Peguilado com Ribavirina é pouco satisfatória associada ao elevado custo, sérios efeitos adversos e riscos de não aderência ao tratamento (MCHUTCISON, et al., 2009).

Alguns fatores relacionados ao hospedeiro podem estar relacionados com a resposta terapêutica como: Etnia, índice de massa corpórea, idade, insulinoresistência, gênero, uso de álcool, e outros fatores podem estar relacionados ao vírus como: HCV-genótipo, níveis de RNA-HCV e polimorfismos genéticos como IL 28B e polimorfismo KIR; Fatores relacionados com a doença: estagio de fibrose e coinfeção com o HIV. Outros fatores como: G/G/T (gamaglutamiltranspeptidase), tempo de infecção, e comorbidades são fatores que estão também relacionados com a RVS (GHANY, et al., 2009; STRADER, 2004, COELHO; VILLELA-NOGUEIRA, AVES, 2010), tabela1.

Estudo de cinética viral demonstrou quanto mais rápida a resposta virológica, maior a chance de RVS (FRIED, 2011). A RVR pode ser influenciada por diversos fatores como: comorbidades, Diabetes, Esteatohepatite, coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), síndrome metabólico, obesidade, dislipidemia, alcoolismo, insulinoresistência entre outros. Outro fator que influencia a resposta ao tratamento do esquema PR é o uso do álcool e/ou de drogas ilícitas que o paciente oculta a informação e este fato interfere na RVS. Resistência insulínica é um fator preditivo para RVS ao tratamento com IFN-PEG mais RBV. Pacientes com baixo valor de HOMA-IR que é um modelo criado para a avaliação da



resistência a insulina (*Homeostasis model assessment of insulin resistance*) quando comparados com pacientes não respondedores mostraram valor preditivo positivo para RVS.

Tabela 1 - Fatores preditivos de resposta ao tratamento em pacientes com hepatite C

Fatores preditivos	Melhor resposta	Pior resposta
<b>Fatores do paciente</b>		
Idade	≤ 40 anos	> 40 anos
gênero	fem	masc
Etnia	caucasiano	afroamericano
insulinorresistência	HOMA <sub>2</sub> ≤ 2.5	HOMA <sub>2</sub> ≥ 2.5
esteatose	não	sim
Polimorfismo genético	C/C genotipo	G/G genotipo
Fibrose hepática	F < 2	cirrose
Nível de G/G/T	normal	alto
<b>Fatores virais</b>		
Genótipo	2 e 3	1 e 4
RNA-HCV	< 600.000 UI/ml	≥ 600.000 UI/ml
RVR	sim	não
RVP	sim	não
<b>Comorbidades</b>		
Ingesta de álcool	baixa	alto
coinfecção HIV/HCV	não	sim
Diabetes	não	sim

Fonte: Coelho, Villela-Nogueira, 2010.

A partir do conhecimento sobre o ciclo de vida do vírus da hepatite C, foram desenvolvidas novas drogas baseadas em alvos potenciais a serem usadas no tratamento da infecção HCV (ASSELAH, MARCELLIN, 2011). Foram introduzidas as drogas antivirais de ação direta (DAAs) *Direct-Acting Antivirals* associadas ao interferon peguilado e ribavirina no tratamento, ampliando o percentual de RVS, porém este percentual de resposta varia de acordo com os diversos estágios da doença hepática e não isentos de efeitos colaterais graves incluindo óbitos (POORDAD, 2011).

Considerando o genoma do HCV, suas proteínas, suas enzimas NS2-3 e NS3-4A proteases, NS3 Helicase e NS5B RdRp que são essenciais para a replicação viral novas drogas são desenvolvidas para o tratamento anti-HCV quadro 3.

Classe	geração	composto	laboratório	fase
Inibidor de protease NS3-4A	Primeira onda, Primeira geração	Telaprevir boceprevir	Vertex/Janssen/Mitsubishi Merck	Aprovado Aprovado
	Segunda onda, primeira geração.	Simeprevir Paritaprevir/r Asunaprevir Vaniprevir Vedoprevir sofaprevir	Janssen Abbvie Bristol-Myers Squibb Merck Gilead Achilion	Aprovado Aprovado Aprovado(Japão III) III (Japão) II II
	Segunda geração	Grazoprevir ACH-2684	Merck Achilion	III II
Análogo nucleosídeo/nucleotídeo	Análogo nucleotídeo	Sofosbuvir MK-3682 ACH-3422 AL-335	Gilead Merck Achilion Janssen	Aprovado II II I
Inibidor de RNA-HCV não nucleosídeo dependente de RNA polimerase		Dasabuvir Beclabuvir GS-9669	Abbvie Bristol-Myers Squibb Gilead	Aprovado III II
Inibidor NS5A	Primeira geração	Daclastavir Ledispavir Ombitasvir	Bristol-Myers Squibb Gilead Abbvie	Aprovado Aprovado Aprovado
	Segunda geração	Elbasvir GS-5816 ACH-3102	Merck Gilead Achilion	III III II

Quadro 3 - Drogas antivirais de ação direta (DAAs) aprovadas e ainda a serem aprovadas nos EUA, União Européia e Japão

/r ritonavir

Fonte: Pawlotski, 2015

Segundo as recomendações brasileiras atuais para o tratamento da infecção crônica HCV, os pacientes com estágio de fibrose severo e cirrose, pacientes que experimentaram o tratamento com a combinação PR, os diferentes genótipos do HCV, manifestações extra-hepáticas da infecção HCV, pacientes com estágio de fibrose moderado e que vem se mantendo por três anos, todas estas situações tem indicação de tratamento com esquemas atualizados seguindo suas contra indicações, incluindo regimes livres de Interferon (AASLD, 2015, EASL, 2015, BRASIL, 2015).

As recomendações sobre o tratamento da Hepatite C, a Associação Latino Americana para Estudo do Fígado, para indivíduos com HCV-1 são disponibilizados seis esquemas de tratamento incluindo dois regimes contendo o Peg-Interferon e quatro regimes livres de Interferon (EASL, 2015).

No Brasil o tratamento segue as orientações dadas pela portaria do Ministério da Saúde (BRASIL, 2015). Com os novos esquemas propostos para o tratamento da Hepatite C, mudaram os períodos de tratamento, as avaliações de RVS e aumentaram significativamente

as chances de cura com possibilidade de regimes livres de interferon, no entanto o Interferon continua e não foi retirado do arsenal terapêutico.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

O tratamento da infecção crônica HCV vem evoluindo e atualmente com proposta de esquemas de tratamento livres de Interferon. No Brasil, atualmente estão sendo disponibilizadas três drogas que pertencem ao grupo de antivirais de ação direta com perspectiva de altas chances de respostas virológicas sustentadas.

Ainda que mais e mais drogas sejam introduzidas ao esquema de terapia anti-viral contra a infecção crônica HCV, o Interferon ainda tem o seu lugar no arsenal terapêutico principalmente porque existem pacientes que não podem receber as medicações antivirais de ação direta como já existem relatos de efeitos adversos como cardiomiotoxicidade por inibidor de polimerase. O conhecimento do polimorfismo em populações miscigenadas tem sua importância já que poucos estudos são feitos com marcadores genéticos de ancestralidade e se as contribuições de ancestralidade influenciam nos polimorfismos da IL1-28B e do IFNL4.

A proposta desse estudo se justifica por se tratar de uma infecção crônica em que 3% da população mundial está infectada e a evolução para doença hepática grave com suas complicações interfere na qualidade de vida do paciente expondo-o a maior morbidade e mortalidade, elevando maior número de internações no serviço público.

Uma das estratégias para impedir essa evolução se faz com as melhores opções de tratamento para a hepatite C e melhor conhecimento a cerca de fatores virais e fatores relacionados ao paciente.

##### **4.1 OBJETIVOS GERAIS**

Descrever as influências dos polimorfismos nos genes da Interleucina 28-B rs 12979860, 8099917 e nos genes do Interferon lambda 4 rs469415590, em uma população miscigenada com infecção crônica HCV, de Belém-Pará-Brasil.

##### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1-Descrever os percentuais de contribuições étnicas e frequências genótípicas dos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 C/C, CT, T/T, rs 8099917 G/G, G/T, T/T, e

nos genes do IFNL4 ss 469415590  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ ,  $T/T/T/T$  em pacientes com infecção crônica HCV e controles.

2- Avaliar possíveis associações dos genótipos dos rs 12979860, rs8099917 e ss469415590 com resposta terapêutica, estagio de fibrose hepática, níveis de ALT e carga viral (RNA HCV/UI/ml).

4- Descrever os percentuais de contribuições étnicas de acordo com os genótipos dos rs 12979860, rs8099917 e ss469415590 nos pacientes com infecção crônica HCV e nos controles.

3- Avaliar as contribuições étnicas de acordo com os genótipos dos rs 12979860, rs8099917 e ss469415590 e resposta ao tratamento da infecção HCV com o esquema de Interferon Peguilado e Ribavirina nos pacientes com HCV-1.

4 avaliar as prováveis variáveis preditoras de resposta terapêutica.

## **5 MÉTODO**

### **5.1 TIPO DE ESTUDO**

Estudo caso controle de pacientes acompanhados no ambulatório de Fígado da FSCMPA que receberam tratamento para a infecção pelo vírus da hepatite C.

O caso foi considerado o paciente com infecção HCV e o controle foi considerado o indivíduo saudável.

### **5.2 ÁREA DE ESTUDO.**

O estudo foi realizado no ambulatório de doenças hepáticas da FSCMPA, localizado na cidade de Belém- Pará-Brasil.

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Foram selecionados 366 pacientes, com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, com anti-HCV reagente confirmado por HCV-RNA pela técnica de RT-PCR, realizados pelo Instituto Evandro Chagas, atendidos no ambulatório no programa de hepatopatias crônicas da

FSCMPA em qualquer estágio da doença hepática, tratados e/ou em tratamento e/ou com indicação para o tratamento com a combinação de IFN Peguilado e Ribavirina.

#### 5.4 PACIENTES E MÉTODOS

O programa de hepatopatias Crônicas da FSCMPA tem registrado os pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite C em seus arquivos. Os dados referentes aos sujeitos da observação com infecção crônica pelo vírus da hepatite C elegíveis para o estudo (2002 a 2013) foram retirados deste arquivo.

Pacientes que estavam em seguimento clínico ou que estavam iniciando o tratamento com Interferon peguilado associado com Ribavirina foram incluídos e consentiram a coleta de 5ml de sangue para a extração de DNA. Todo o processo foi realizado após aprovação do projeto pelo comitê de ética do HFSCMPA com consentimento prévio do paciente (termo de consentimento).

A infecção pelo vírus da hepatite C foi confirmada pela detecção sérica do RNA HCV.

Os dados referentes aos estágios de fibrose hepática foram coletados do arquivo da FSCMPA, determinados por biopsia de fígado realizada na FSCMPA pelo mesmo grupo de médicos do ambulatório de Fígado que atende aos pacientes do programa de hepatopatias crônicas. O exame do fragmento retirado do fígado foi feito no Hospital Universitário João de Barros Barreto no departamento de Patologia da Universidade Federal do Pará que usou o escore do sistema METAVIR para a análise: F0 sem fibrose, e com fibrose portal (F1, F2, F3, F4) e (A) = atividade histológica com necrose em saca bocado e necrose lobular), (Bedossa, Poynard, 1996).

O diagnóstico e o tratamento foi conduzido pelo mesmo grupo de médicos (Grupo de fígado da FSCMPA) e o acompanhamento clínico seguiu critérios estabelecidos para o diagnóstico e tratamento orientados pelo Ministério da Saúde.

Paciente coinfectados com os vírus da Imunodeficiência humana e ou hepatite B ou doenças auto-imunes foram excluídos.

Para análise de resposta ao tratamento padrão com o Interferon peguilado e ribavirina (PEG IFN/RBV) foram definidos como resposta virológica sustentada (RVS) os sujeitos tendo indetectabilidade dos níveis de RNAHCV na semana 24 após o término do tratamento (RVS). Os indivíduos que não alcançaram RVS, bem como os que tiveram recidivas, ou seja, pacientes que obtiveram indetectabilidade no final do tratamento, mas se tornaram detectáveis

na 24<sup>a</sup> semana após o término do tratamento ou sem resposta virológica precoce foram considerados não RVS (NRVS). A resposta virológica rápida foi definida como indetectabilidade do RNA HCV na semana quatro de tratamento e a resposta virológica lenta quando o RNA HCV foi indetectável na semana 24 de tratamento.

A etnia foi avaliada por marcadores genéticos para as contribuições de ancestralidade Européia, Africana e Ameríndia e não foi usado o sistema de autodefinição da cor da pele.

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EXAMES DE LABORATÓRIO

A caracterização clínica, epidemiológica, exames laboratoriais e exames histopatológicos assim como os resultados dos exames sorológicos e moleculares para o diagnóstico do HCV foram obtidos de prontuários e/ou banco de dados do Programa de hepatopatias do ambulatório da FSCMPA e que seguiram o protocolo de atendimento do ambulatório de fígado da FSCMPA. Estes foram submetidos à anamnese com identificação, procedência, estado civil, ocupação, antecedentes mórbidos pessoais e hábitos.

### **5.5.1 Genotipagem dos polimorfismos nos genes do IFNL3(IL-28B) e nos genes do IFNL4.**

Foram coletadas amostras de sangue (4 ml/amostra) e enviadas ao Laboratório de Genética Humana e Médica, Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará e uma alíquota enviada a Universidade de São Paulo para a realização da genotipagem dos polimorfismos nos genes do IFNL4. A coleta e o processamento de amostras para polimorfismo dos genes da IL-28B. A extração do DNA foi feita pelo método Fenol-Clorofórmio descrito por Sambrook et al (1989). A partir do DNA extraído, foram detectados e genotipados os SNPs: rs8099917 (TG), rs12979860 (CT) e rs368234815 (ΔG/TT), localizados no braço longo do cromossomo 19. Para a realização da detecção e genotipagem desses polimorfismos, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Foram utilizados ensaios TaqMan® SNP Genotyping Assays pré-desenhados (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, EUA), entretanto para os SNPs rs12979860 e rs368234815 o ensaio foi customizado, ou seja, a sequência do gene contendo o polimorfismo de interesse foi enviada ao fabricante e a partir dela foram desenhados os iniciadores e as sondas (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Esses ensaios se baseiam na amplificação e detecção de alelos específicos em amostras de DNA genômico. Durante a etapa de amplificação a enzima Taq DNA polimerase amplifica o DNA utilizando iniciadores

específicos, e as sondas TaqMan® MGB, ligadas ao DNA alvo, são degradadas durante a extensão das fitas de DNA. A partir desse momento as sondas passam a emitir um sinal de fluorescência, que é detectada pelo equipamento. Uma vez que as sondas são alelo-específicas e apresentam fluorescências distintas, a diferenciação dos alelos se dá pela cor emitida.

### **5.5.2 Marcadores individuais de ancestralidade**

A população brasileira é altamente miscigenada, com uma predominância de contribuição de ancestralidade Européia e contribuições variáveis de ancestralidade Ameríndia e Africana. Quatro décadas de estudos realizados em Belém, Pará, revelou proporções de contribuições de ancestralidade Africana, Ameríndia e Européia variando 0,12-0,33, 16-0,3 e 0,48-0,61, respectivamente. Assim, para evitar distorções na subestruturação população, foi avaliada a proporção de mistura étnica indivíduo usando 48 polimorfismos de inserção/deleção previamente validados como marcadores de ascendência ideais para a população de Belém [Santos NP, et al, 2010]. Os marcadores de ascendência encontrou dois critérios principais: i) elevada diferença entre as frequências alélicas ( $\geq 40\%$ ) entre Africano, Europeu e etnias ameríndias, e ii) localização em cromossomos diferentes ou em regiões físicas distintas de um mesmo cromossomo [Santos NP, et al, 2010]. As concentrações do iniciador e sequências, bem como as condições de PCR multiplex e eletroforese capilar obedeceram as indicações do fabricante ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Santos NP, et al, 2010).

### **5.5.3 Exames sorológicos e moleculares para o diagnóstico do HCV**

Testes imunológicos e moleculares (qualitativos e quantitativos) foram realizados no laboratório de Sorologia e Biologia Molecular da Seção de Hepatologia do Instituto Evandro Chagas. Amostras de sangue (10ml) foram coletadas e examinadas para os marcadores sorológicos das hepatites B e C e para a pesquisa de ácido nucléico (HCV-RNA). O sangue de cada paciente foi coletado em tubos a vácuo sem o anticoagulante. Após retração do coágulo em temperatura ambiente, foi centrifugado a 1500 G por 20 minutos. O soro foi dividido, em duas alíquotas. Uma foi utilizada para os testes imunológicos (anti-HCV, HBsAg) e a outra mantida sob refrigeração ( $-70^{\circ}\text{C}$ ), somente foi descongelada no momento da realização dos testes moleculares. Para detecção do anti-HCV, foram utilizados kits do laboratório Ortho® (OrthoTM HCV 3.0 ELISA Test System), que consistem na pesquisa qualitativa deste anticorpo, que tem como fase sólida, microplacas revestidas com antígenos recombinantes do vírus da hepatite C. Em todos os testes sorológicos foram obedecidas as recomendações do

fabricante. Os resultados foram considerados indeterminados (zona cinza) quando a densidade óptica ficou 20% acima ou abaixo do valor de corte, para o imunoensaio enzimático (EIA) e imunoensaio enzimático de micropartículas (MEIA).

A pesquisa do HCV-RNA foi feita de modo qualitativo, utilizando kits comerciais do Laboratório Roche, registrados como HCV COBAS AMPLICOR® versão 2.0 que utiliza a reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de uma transcrição reversa (RT-PCR) para amplificação e hibridização do RNA ou por meio de técnicas similares. O AMPLICOR HCV, versão 2.0, é baseado em quatro etapas principais: a preparação dos espécimes; a amplificação por RT-PCR das frações do RNA utilizando-se primers complementares específicos do HCV; a hibridização dos produtos amplificados através de sondas de oligonucleotídeos específicos; a determinação do produto da hibridização através de determinação colorimétrica.

A preparação do espécime tem por finalidade liberar o HCV viral através da centrifugação e lise do vírus. A amplificação do HCV-RNA com o HCV COBAS AMPLICOR, versão 2.0, é realizado simultaneamente com RNA padrão interno – Internal Standard (IS) que é incorporado a cada espécime testado. O (IS) é uma molécula RNA não infeccioso que contém primers idênticos a sítios do RNA e, uma única região que permite que a amplificação do IS seja distinguida da amplificação do HCV-RNA do espécime.

No processo de amplificação por RT-PCR do HCV COBAS AMPLICOR, versão 2.0 utilizam-se como reagentes a Taq polymerase, a AmpErase® e deoxiuridina trifosfato que são adicionadas a mistura e, posteriormente, em um termociclador automático são executados ciclos específicos de amplificação. Após o processo de amplificação, sondas de oligonucleosídes específicas são utilizadas para o processo de hibridização. No processo de detecção é utilizado um conjugado de bases anti-DNP fosfatase alcalina e um substrato para-nitrofenilfosfato com conseqüente formação de cor. O AMPLICOR® - HCV, v2.0 utiliza primers KY78 e KY80, que delimita uma seqüência de 244 nucleotídeos da região altamente conservada não- codificadora 5'. O processo de amplificação necessita de uma etapa inicial de transcrição reversa do RNA-alvo, gerando um DNA complementar (cDNA).

A quantificação do HCV-RNA será realizada por meio de kit diagnóstico por PCR em tempo Real/ HCV- COBAS AMPLIPREP TaqMan Roche, aferido conforme o padrão internacional para HCV RNA NAT ensaios da Organização Mundial de Saúde. Foram obedecidas as orientações preconizadas pelo fabricante. O limite mínimo de sensibilidade atribuído ao teste é de 43 UI/mL. A pesquisa de genótipos do HCV foi realizada por meio de hibridização reversa (INNO-LIPA HCVII, Immunogenetic), que utiliza fitas de nitrocelulose



onde são imobilizadas sondas de oligonucleotídeos da região 5' NC complementares a cada tipo/subtipo do HCV. Após a hibridização com produtos do PCR marcados com primers biotinilados, um conjugado de avidina terá a função de ligar-se ao híbrido biotinilado. O substrato então levará a formação de um produto colorido que irá precipitar-se na fita e revelar o tipo viral presente na amostra, descritos como tipos de 1 a 6 e subtipos, 1a, 1b, 2a-c, 3a-c, 5a e 6a.

#### 5.4.4 Exame histopatológico

A avaliação histopatológica seguiu o protocolo do ambulatório de fígado da FSCMPA para o diagnóstico das hepatites crônicas com avaliação da atividade necro-inflamatória e estadiamento de fibrose segundo a classificação METAVIR tabela 2. A classificação METAVIR avalia a atividade periportal e o estadiamento de fibrose, com graduação padronizada (BEDOSSA, POYNARD, 1996).

Tabela 2 - Classificação histopatológica escore METAVIR

Atividade histológica	Estágio de fibrose
A0 = nenhum	F0 = ausência de fibrose
A1 = leve	F1 = fibrose periportal sem septos
A2 = moderada	F2 = fibrose periportal e raros septos
A3 = severa	F3 = = fibrose periportal e numerosos septos sem cirrose
	F4 = cirrose

Fonte: Bedossa, Poynard, 1996.

## 6. TRATAMENTO

O protocolo de tratamento obedeceu aos regulamentos do Ministério da Saúde (BRASIL, 2007).

## **7. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto, bem como os procedimentos adotados ao longo da investigação, foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que trata de pesquisa envolvendo seres humanos. Os dados foram coletados após a autorização dos sujeitos da pesquisa por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – ANEXO B) e o acesso ao arquivo de prontuários referentes aos sujeitos da pesquisa liberado após aprovação do projeto de pesquisa pelo comitê de Ética da FSCMPA.

## **8. ANÁLISE DOS DADOS**

A análise, organização e tabulação dos dados da pesquisa foram feitas pelo programa EPI INFO 6.0, EXCEL e pelo programa BioEstat 5.0. Para descrever a amostra do estudo, foram usadas proporções para variáveis categóricas, bem como media, mediana, desvio padrão para variáveis contínuas.

Foi feito um quadro com variáveis genéticas incluindo as referentes ao HCV como genótipo e as variáveis genéticas referentes ao hospedeiro, no caso o polimorfismo da IL28B incluindo rs 12979869 e rs 8099917 e contribuições étnicas. As variáveis genéticas foram cruzadas com as variáveis clínicas no caso RVS, estágio de fibrose hepática e atividade inflamatória usando a classificação METAVIR (F e A), Alaninoaminotransferase, RNAHCV quantitativo (UI/ml) e gama-glutamiltanspeptidase (G/G/T). Para as variáveis contínuas com distribuição normal foi usado o Teste T, para as variáveis contínuas que não apresentaram distribuição normal foi usado o teste Mann Whitney (Wilcoxon Rank Sum Test), para uma amostra foi usado o Kolmogorov-Smirnov. Estabeleceu-se em 0.05 (5%) o nível de rejeição da hipótese de nulidade (valor de  $p \leq 0,05$ ) e intervalo de confiança (IC) de 95%.

## **9. RESULTADOS**

### **9.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA.**

A descrição da coorte estudada a análise do estudo é mostrada na figura 1.

De um total de 366 pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C atendidos no ambulatório de fígado do Hospital da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará no período de 2002 a 2014, 197(54%) foram submetidos ao exame na região do gene codificante da Interleucina (IL- 28B) para rs 12979860 e 196 (53,5 %), para rs 8099917, 190 (52%) pacientes foram avaliados para polimorfismo do IFNL4 ss 469415590 e 136 (38%) foram avaliados para ancestralidade e submetidos a exame com marcadores genéticos para as contribuições étnicas: Africana, Europeia e Ameríndia; 336 (92%) pacientes foram submetidos à genotipagem do HCV com a avaliação de 238 subtipos (70%) e 332 (91%) pacientes submetidos à biópsia hepática com avaliação da classificação METAVIR ( A) 266 (80%) pacientes e (F) 332 (100%) pacientes. Dos 366 pacientes, 243 (66,4%) foram submetidos ao tratamento com PEG IFN e RBV e destes, 235 completaram o tratamento sendo que, 206 pacientes com HCV-1 (RVS= 105 (51%) e NRVS= 96 (49.%) e 36 pacientes com HCV-2 e HCV-3 (RVS n= 25, NRVS ( n=09) . As características basais dos pacientes com infecção crônica HCV estão sumarizados na tabela 3.

## 9.2 DADOS DEMOGRÁFICOS

Foram incluídos no estudo 366 pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite C com procedência de Belém – PA, outras cidades do Pará como: Altamira, Aguas Brancas, Barcarena, Benevides, Bragança, Cametá, Capanema, Carajás, Castanhal, Concórdia do Pará, Ilha do Marajó, Igarapé Miri, Icoaraci, Macapá, Mocajuba, Jacundá, Oiapoque, Paragominas, Santarém, Porto de Mós, Oriximiná, Redenção, Santo Antônio do Tauá, Santa Izabel do Pará, Tucuruí e Nova Timboteua.

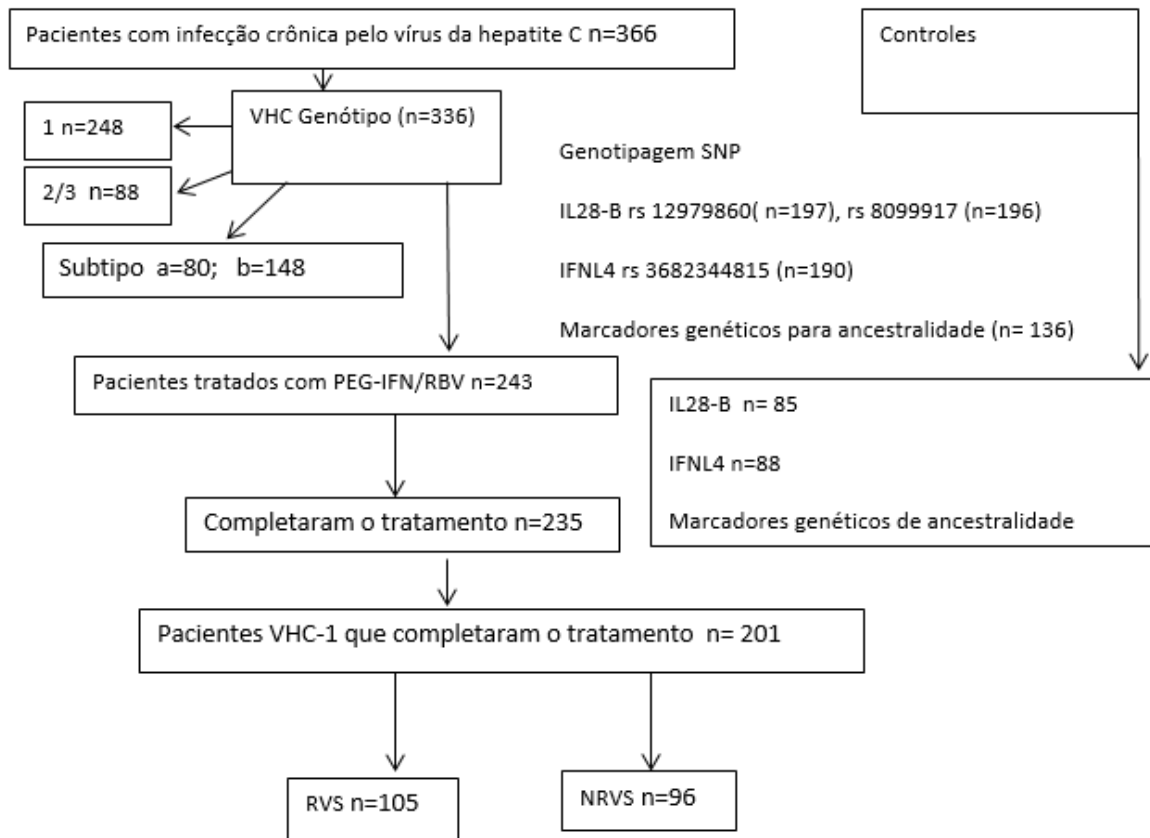


Figura 12 - Organograma com as características da coorte estudada. IL-28B, IFNL4, Ancestralidade e resposta terapêutica.

Tabela 3 - Características dos 366 pacientes com infecção crônica HCV atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará

Variáveis	Todos (366)	RVS*n=130 (%)	NRVS** n=105 (%)
Media de Idade ± DP	52.12 ± 11.7	51,9 ±	54,4 ± 9
Sexo			
masc	221 (60%)	72 (55,4%)	75 (71,4%)
Fem	145 (40%)	58 (44,6%)	30 (28,6%)
Etnia n =136	n=122	n=67	n=55
Africano (média)	0,125	0,1286	0,1094
Europeu (média)	0,60	0,5926	0,5945
Ameríndio (média)	0,275	0,2758	0,2843
IL 28B			
rs 12979860 n=197	rs 12979860	rs 12979860 77	rs 12979860
C/C	42 (21%)	18 (23,4%)	10 (15,4%)
CT	116 (59%)	45 (58,4%)	43 (66,1%)
T/T	39 (20%)	14 (18,2%)	12 (18,5%)
CT e T/T	155	59	55
rs8099917n=196	rs8099917	rs8099917	rs8099917
G/G	10 (05%)	02 (2,6%)	04 (6%)
G/T	88 (45%)	27 (35,5%)	37 (57%)
T/T	98 (50%)	47 (61,9%)	24 (37%)
G/G e G/T	186	29	41
IFNL4			
ss 469415590	ss 469415590	ss 469415590	ss 469415590
ΔG/ΔG	38 (20%)	14(18,9%)	11 (18%)
ΔG/T/T	113 (59, 5%)	45 (60,8%)	40 (65,6%)
T/T/T/T	39 (20, 5%)	15(20,3%)	10 (16,4%)
ΔG/T/T e ΔG/ΔG	152	59	51
METAVIR (F)			
F1	65 (19, 5%)	15 (12%)	04 (7%)
F2	126 (38%)	68 (56%)	18 (32%)
F3	51 (15, 4%)	21 (17%)	15(27%)
F4	90 (27, 1%)	18 (15%)	19 (34%)
F3F4	141	39	34
METAVIR (A)			
A1	110 (41%)	42 (38%)	24 (34%)
A2	133 (50%)	60 (54%)	39 (55%)
A3	23 (09%)	09 (8%)	08 (11%)
HCV Genotipo			
1	248 (74%)	105 (81%)	96 (91,4%)
2/3	88 (26%)	25 (19%)	09 (8,6%)
Subtipo			
a	80 (33,61%)	22(25%)	20 (26,%)
b	148 (62,18%)	60 (69%)	53 (71%)
ab	08 (3,36%)	05 (6%)	02 (3%)
Carga viral basal (UI/ml)			
<600.000	99 (45,4%)	48 (56,5%)	16 (24,6%)
≥ 600.000	119 (54,6%)	37 (43,5%)	49 (75,4%)

\*Resposta Viroológica Sustentada, \*\* Não Resposta Viroológica Sustentada,  
 Fonte: Banco de dados elaborado para a tese .

### 9.3 FREQUÊNCIAS DAS CONTRIBUIÇÕES ÉTNICAS E FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS nos rs 12979860 C/C, CT, T/T, rs 8099917 G/G, G/T, T/T, ss 469415590 $\Delta$ G/ $\Delta$ G, $\Delta$ G/T/T, T/T/T/T NOS PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA HCV E CONTROLES.

A avaliação genética para os polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, em pacientes com infecção crônica HCV e controles estão resumidas na tabela 4.

Na Avaliação dos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 os genótipos agrupados CT e T/T, foram mais frequentes no grupo de pacientes com infecção crônica HCV demonstrando susceptibilidade figura 15, O genótipo C/T versus o genótipo selvagem C/C também foi mais frequente nos pacientes com infecção crônica HCV OR=2,15, p= 0,0013, IC 95%= 1,20-3,85.

Os genótipos avaliados referentes ao polimorfismo da IL-28B rs 8099917 não mostraram diferenças entre o grupo de pacientes com infecção crônica HCV e o controle.

A avaliação do polimorfismo nos genes do IFNL4 ss 469415590 mostrou que os genótipos de susceptibilidade ( $\Delta$ G $\Delta$ G e  $\Delta$ G T/T vs T/T/T/T) foram mais frequentes no grupo de pacientes com infecção crônica HCV em relação aos controles assim como também agrupados em homozigose figura 16 e figura 17. Foram avaliadas as frequências dos genótipos heterozigostos de susceptibilidade nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979840 CT, nos genes do IFNL4 ss 469415590  $\Delta$ G/T/T e nos genes da IL-28B rs 8099917 G/T vs os genótipos protetores nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979840 C/C, dos genes do IFNL4 ss 469415590 T/T/T/T e rs 8099917 T/T, nos pacientes com infecção crônica HCV e nos controles. Nesta avaliação, as sequências de genótipos de susceptibilidade foram mais frequentes nos pacientes com infecção crônica HCV em relação aos controles  $p=0,022$  figura 18.

Tabela 4 - Frequência das contribuições étnicas e frequência de polimorfismos da IL- 28B e IFNL4 de pacientes com infecção crônica HCV e controles.

VARIÁVEIS GENÉTICAS	Pacientes HCV	Controles	<i>p</i>	OR	<i>p</i>	IC95%	<i>P<sup>b</sup></i>
<b>Ancestralidade</b>	n=136	n=243					
Africano (mediana) *	0,060	0,04	0,423				
Europeu (media)**	0,588	0,662	0,001				
Ameríndio (media)	0,275	0,214	0,002				
<b>IL-28B rs 12979860</b>	n=197	n=85					
C/C	42 (21%)	32 (38%)					0,0004
CT	116 (59%)	41 (48%)					
T/T	39 (20%)	12 (14%)					
CT e T/T	155 (79%)	53 (62%)		2,22	0,006	1,27-3,88	0,004
C/C	42 (21%)	32 (38%)					
<b>IL-28B rs 8099917</b>	n= 196	n=85					
G/G	10(05%)	09 (10,5%)					0,07
G/T	88(45%)	28 (33%)					
T/T	98(50%)	48 (56%)					
G/G e G/T	98 (50%)	37 (44%)		1,28	0,38	0,77-2,16	0,3
T/T	98 (50%)	48 (56%)					
<b>IFNL4 ss469415590</b>	n= 190	n=88					
ΔG/ΔG	37 (20%)	12 (13,7%)					0,010
ΔG T/T	113 (59,5%)	43 (48,8%)					
T/T T/T	39 (20,5%)	33 (37,5%)					
ΔGΔG e ΔG T/T	150 (79,5%)	55 (62,5%)		2,30	0,004	1,32-4,02	0,001
T/T/T/T	39 (20,5%)	33 (37,5%)					
Genótipos desfavoráveis*** versus Genótipos heterozigotos favoráveis****	60 29	23 27		2,42	0,022	1,19-4,94	0,013

\*\*\*sequência rs 12979840 genótipo CT, ss 469415590 genótipo ΔG/T/T e rs 8099917 Genótipo G/G\*\*\*\*sequência rs 12979840 genótipo C/C, ss 469415590 genótipo T/T/T/T e rs 8099917 Genótipo T/T, <sup>b</sup> Qui-Quadrado.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

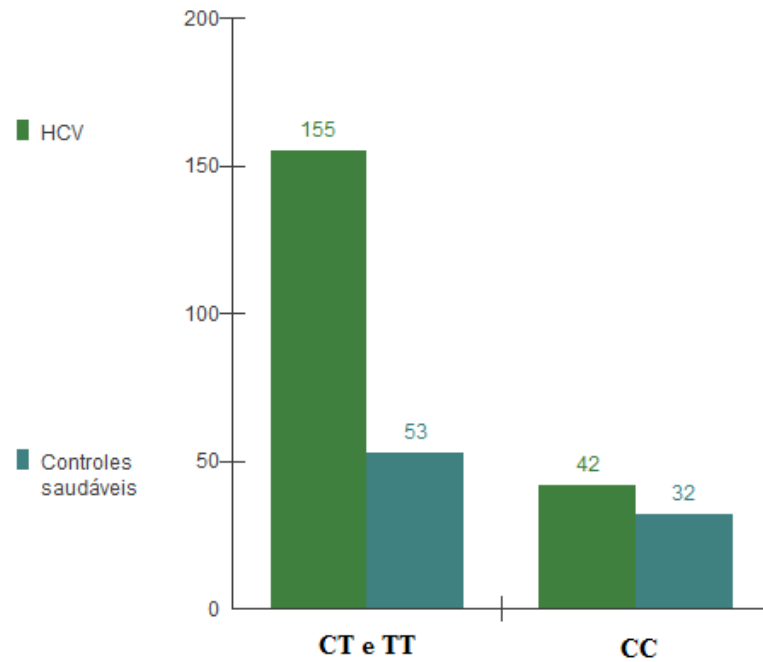


Figura 13 - Polimorfismo nos genes da IL-28B rs 12979860 com genótipos agrupados C/C vs CT e T/T em pacientes com infecção crônica HCV e controles  $p=0,0042$ .

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

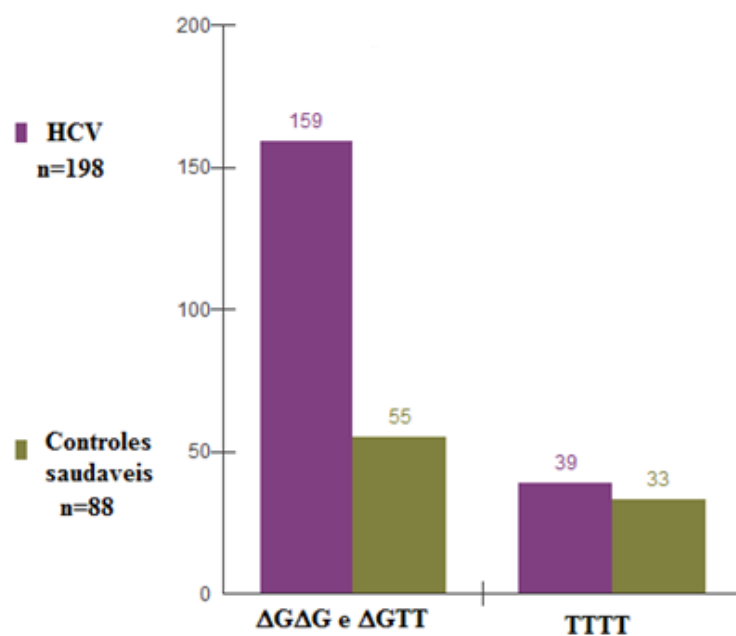


Figura 14 - Frequência dos genótipos agrupados em genótipos de susceptibilidade e genótipo protetor no polimorfismo nos genes do IFNL4 ss 469415590 nos pacientes com infecção crônica HCV e controles  $p=0,0014$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.



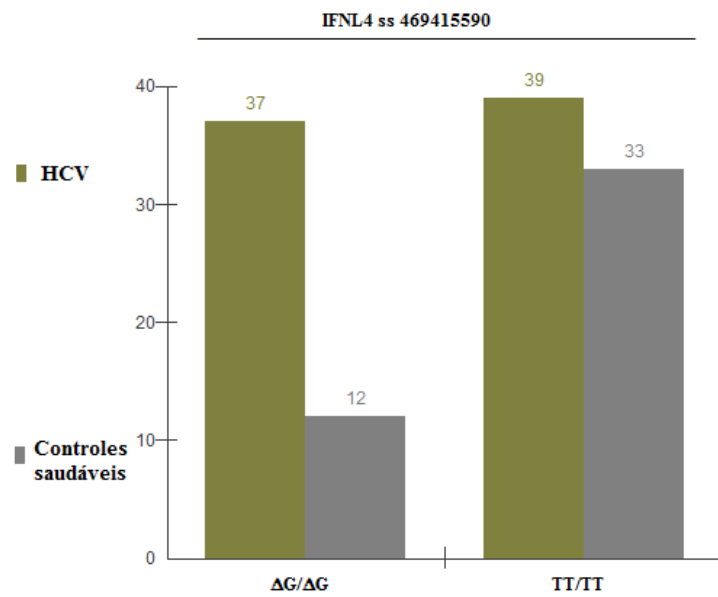


Figura 15 - Frequência dos genótipos de susceptibilidade e protetor em homozigose nos polimorfismo dos genes do IFNL4 ss 469415590 nos pacientes com infecção crônica HCV e controles  $p=0,017$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

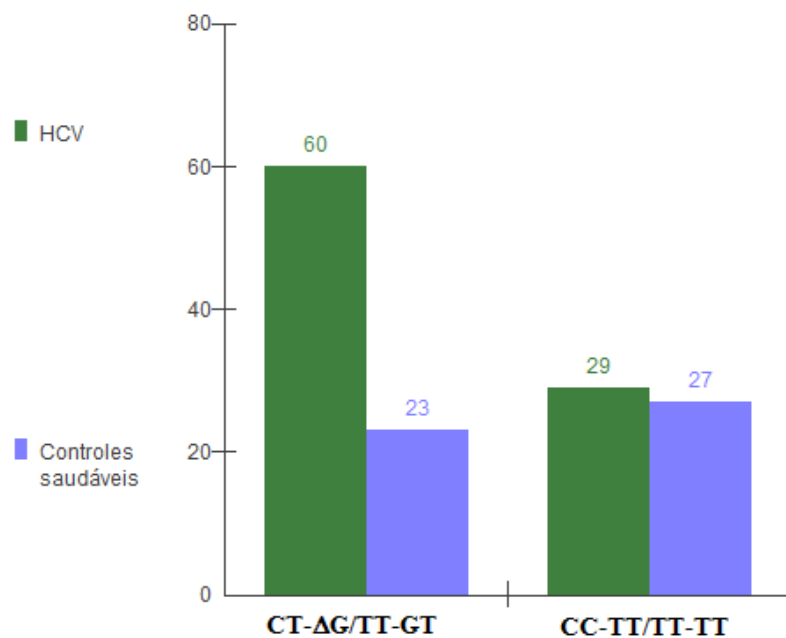


Figura 16 - Frequência dos genótipos mutantes rs 12979840 C/T, ss 469415590 ΔG/T/T e rs 8099917 G/T vs os genótipos selvagens rs 12979840 C/C, ss 469415590 T/T/T/T e rs 8099917 T/T, nos pacientes com infecção crônica HCV e nos controles  $p=0,022$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

### 10.3.1 Equilíbrio Hardy-Weinberg no polimorfismo da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, IFNL4 ss 469415590 nos pacientes e controles

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi encontrado nos controles avaliados para polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 genótipos C/C, CT, T/T ; rs 8099917 genótipos G/G, G/T, T/T; polimorfismos nos genes do IFNL4 ss 469415590 genótipos  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ , T/T/T/T e observado desequilíbrio (HWE) nos pacientes com infecção crônica pelo vírus da Hepatite C avaliados para polimorfismos nos genes 12979860 C/C, CT,T/T; polimorfismos nos genes do IFNL4 ss 469415590 genótipos  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ , T/T/T/T e uma tendência ao desequilíbrio para os polimorfismos nos genes rs 8099917 genótipos G/G,G/T,T/T tabela 5.

Tabela 5 - Estimação de parâmetros dos polimorfismos da Il-28B, do IFNL4, segundo a Lei de Hardy-Weinberg

		Controles			
		Observado	Esperado	P*	Estimação do alelo
rs 12979860	C/C	32	32,42%	0,84	Alelo C= 61,76%
	CT	41	40,14%		
	T/T	12	12,42%		Alelo T=38,24%
rs 8099917	G/G	09	6,22%	0,13	Alelo G=27,06%
	G/T	28	33,55%		
	T/T	48	45,22%		Alelo T=72,94%
ss 469415590	$\Delta G / \Delta G$	12	12,75%	0,73	Alelo $\Delta G$ =38,07%
	$\Delta G/T/T$	43	41,49%		
	T/T/T/T	33	33,75%		Alelo T/T=61,93%
		Pacientes HCV			
rs 12979860	C/C	42	50,76	<b>0,0125</b>	Alelo C=0,5076
	CT	116	98,47		
	T/T	39	47,76		Alelo T=0,4924
rs 8099917	G/G	10	14,87%	<b>0,080</b>	Alelo G=27,55
	G/T	88	78,24%		
	T/T	98	102,87%		Alelo T=72,45
ss 469415590	$\Delta G / \Delta G$	37	46,25%	<b>0,0071</b>	Alelo $\Delta G$ =48,47
	$\Delta G/T/T$	113	94,48%		
	T/T/T/T	39	48,25%		Alelo T/T=50,59

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

#### 9.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E VARIÁVEIS GENÉTICAS EM 366 PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO HCV

##### 9.4.1- Avaliação dos Genótipos 1 e 2/3 do HCV vs RVS, Gênero, Idade, Estágio de Fibrose e Inflamação F e A (METAVIR), RNAHCV Quantitativo, Níveis de ALT e de G/G/T tabela 4

Quando avaliados gênero, idade, estágio de fibrose (F) e inflamação (A) pela classificação METAVIR de acordo com os genótipos 1 HCV e genótipos 2/3 HCV, dos pacientes com infecção crônica HCV, não mostraram diferenças.

A resposta virológica sustentada em pacientes que trataram com o esquema PR quando avaliadas de acordo com os genótipos 1 HCV e genótipos 2/3 HCV mostraram melhor resposta em pacientes com genótipo 2/3 HCV  $p=0,020$  figura 19.

Observado tendência a uma maior carga viral nos pacientes com genótipo 1 em relação aos pacientes com genótipos 2/3,  $P$  unilateral= 0,027 e  $P$  bilateral =0.05. Os níveis de ALT, AST e G/G/T nos dois grupos genotípicos HCV não mostraram diferenças tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis clínicas e variáveis genéticas de pacientes com infecção crônica HCV

Variáveis clínicas	Variáveis genéticas		$P$
	Genótipo 1 HCV	Genótipo 2/3 HCV	
GÊNERO	Fem= 101, Masc= 147	Fem=30, Masc= 59	$p^a= 0,24$
IDADE	<45anos=60, ≥60anos =181	<45anos=27, ≥60anos =52	$p^a=0,107$
RVS*	RVS=105, NRVS=96	n=80 RVS=25, NRVS= 09	$p^a=0,020$
METAVIR (F)	n=231 F1=37 F2=100 F3=40 F4=54	n=78 F1=19 F2=26 F3=11 F4=22	$p^a=0,94$
METAVIR (A)	n=190 A1=97 A2=99 A3=17	n=66 A1=29 A2=31 A3=06	$p^a= 0,94$
RNAHCV quantitativo (UI/ml)	n=167 mediana 809.000l	n=46 mediana 474.025	$P^b =0.05$

\* Resposta ao tratamento com o esquema de Interferon Peguilado e Ribavirina, Gamaglutamiltranspeptidase, Alanina aminotransferase, <sup>a</sup> Qui-quadrado, <sup>b</sup> Mann-Whitney.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

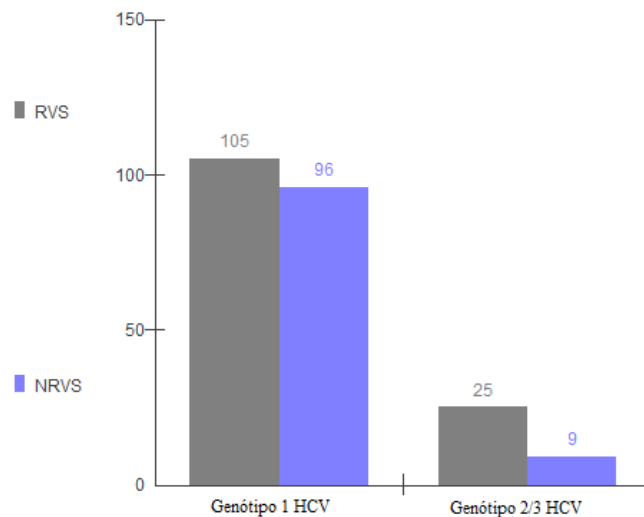


Figura 17 - Resposta virológica sustentada (RVS) e não resposta virológica sustentada (NRVS) em pacientes com infecção crônica HCV, tratados com o esquema combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina de acordo com o HCV-genótipo  $p=0,020$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

#### 10.4.2- Polimorfismo nos genes da IL-28B rs 12979860 genótipos C/C, CT, T/T, rs 8099917 genótipos G/G, G/T, T/T, polimorfismo nos genes do IFNL4 rs 469415590 genótipos $\Delta G/\Delta G$ , $\Delta G/T/T$ , T/T/T/T versus RVS em pacientes HCV-1 tratados com a combinação PR.

Os SNPs rs 12979860, ss 469415590 quando avaliados em relação a RVS estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 - Resposta Virológica Sustentada em pacientes com infecção crônica HCV-1 baseado nos polimorfismos nos genes da IL-28B e IFNL4

Variáveis clínicas	Variáveis genéticas											
	IL-28B								IFNL4			
	rs 12979860				rs8099917				ss 469415590			
	C/C	CT	T/T	*	G/G	G/T	T/T	**	$\Delta G/\Delta G$	$\Delta G/T/T$	T/T/T/T	*
RVS (n)	15	39	11	50	02	22	41	24	11	39	13	50
NRVS (n)	10	40	11	51	04	33	24	37	10	37	10	47
	$X^2 p=0,641$				$X^2 p= 0,027$				$X^2 p= 0,90$			
	C/C vs CT e T/T $X^2 p= 0,347$				(G/G e G/T) vs T/T $X^2 p=0,007$ OR 2,63, $p=0,0129$ IC 95% 1,28-5,40				T/T/T/T vs $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ $X^2 p= 0,66$			

\*Genótipos desfavoráveis agrupados CT e T/T, \*\* G/T e G/G, \*\*\*  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$ .

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

O polimorfismo dos genes da IL-28B rs8099917 mostrou associação do genótipo T/T com resposta terapêutica **figura 19**. Agrupando os genótipos de susceptibilidade em homozigose e em heterozigose (G/T e G/G) vs genótipo protetores (T/T) em relação a resposta terapêutica e não resposta, também mostram significância OR 2,63,  $p=0,0129$ , IC95% 1,28-5,40 ou seja, o paciente portando o alelo G em homozigose ou em heterozigose tem 2,63 vezes mais chance de obter falha no tratamento com a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina em comparação com o homozigoto T/T.

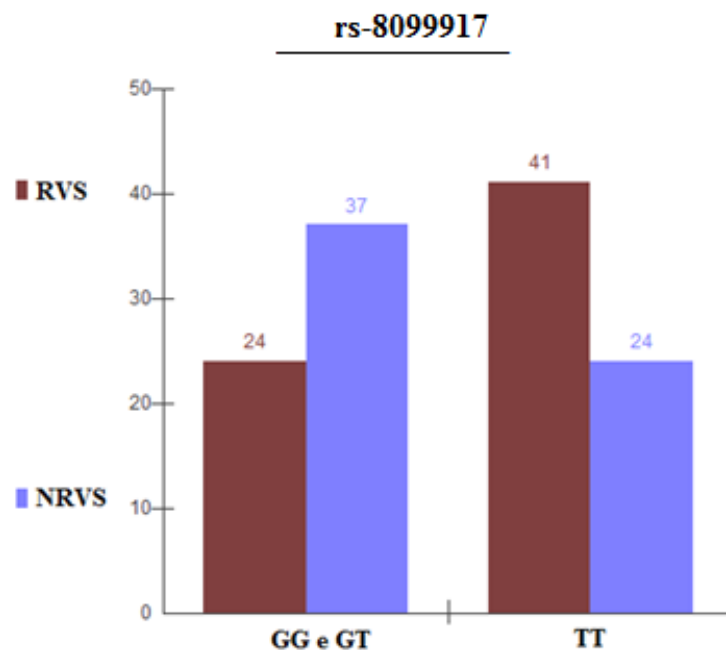


Figura 19 - RVS em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV, baseado no polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917.  $X^2 p=0,007$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

#### **10.4.3 rs-860 C/C, CT, T/T, rs-917 G/G, G/T, T/T, IFNL4 rs-590 $\Delta G/\Delta G$ , $\Delta G/T/T$ , T/T/T/T baseados nos estágios de fibrose hepática, atividade inflamatória (METAVIR), RNAHCV quantitativo e níveis de ALT em pacientes com HCV-1**

Estas variáveis clínicas e genéticas estão sumarizadas na tabela 8.

Os estágios de fibrose hepática agrupados F1F2, F3F4 de acordo com os polimorfismos estudados, mostraram associação com o rs -917 figura 20.

Com relação ao rs-917 agrupados ou não em alelos mutantes em homozigose ou em heterozigose comparados com o selvagem, mostraram associação entre estágios de fibrose F3 F4 com os alelos mutantes OR 2,85  $p=0,006$ , IC95% 1,39- 5,85 tabela 8.

Os níveis de RNA-HCV UI/ml avaliados também com genótipos agrupados em protetores e de susceptibilidade, mostrou associação dos maiores níveis de RNA-HCV com os genótipos selvagens nos rs12979860 (CT, T/T) e nos ss -590 ( $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ ) figura 22 e figura 23.

Tabela 8 - Variáveis Clínicas e variáveis genéticas

Variáveis clínicas	Variáveis genéticas											
	rs 12979860				rs8099917				ss 469415590			
	C/C	CT	T/T	*	G/G	G/T	T/T	**	$\Delta G/\Delta G$	$\Delta G/T/T$	T/T/T/T	***
F1F2 <sup>a</sup>	15	46	14	60	02	27	46	29	15	43	14	58
F3F4	09	34	13	47	05	31	20	36	12	34	07	46
A1 <sup>a</sup>	05	27	10	37	01	16	25	17	10	25	06	35
A2	13	34	10	44	03	24	30	27	08	33	11	41
A3	05	03	02	05	01	02	07	03	03	03	04	06
ALT	C/C vs CT e T/T Mann-Whitney $P=0,15$				T/T vs G/G e G/T Mann-Whitney $p=0,83$				$\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ vs T/T/T/T Mann-Whitney $p=0,69$			
F1F2/F3F4	C/C vs CT e T/T $p=0,56$				T/T vs G/G e G/T $X^2$ $p=0,0037$ , <b>OR 2,85</b> $p=0,006$ , <b>IC95% 1,39-5,85</b>				T/T/T/T vs $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ $P=0,35$			
A1,A2,A3	C/C vs CT e T/T $X^2$ $p=0,0267$				T/T vs G/G e G/T $X^2$ $p=0,53$				$\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ vs T/T/T/T $X^2$ $p=0,199$			
RNAHCV UI/ml	C/C (Mediana <b>2.896,325</b> ) CT e T/T (Mediana <b>617.984</b> ) Mann-Whitney $p=0,0006$				T/T (Mediana 546.000) G/G e G/T (mediana 689.000) Mann-Whitney $p=0,78$				T/T/T/T (Mediana <b>2.220,000</b> ) $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ (Mediana 689.000) Mann-Whitney <b><math>P=0,038</math></b>			

Genótipos mutantes: \*CT e T/T, \*\* G/T e G/G, \*\*\*  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$ , <sup>a</sup> Classificação METAVIR.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

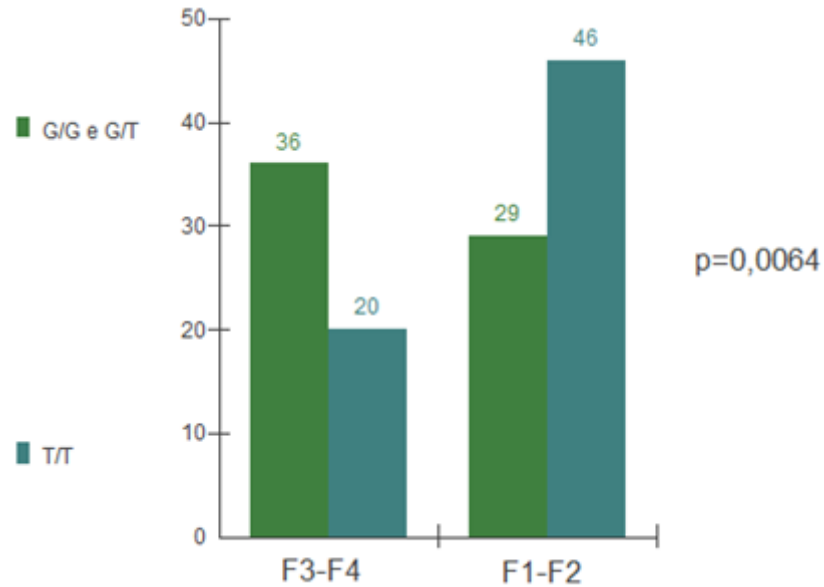


Figura 20 - Estágio de Fibrose Hepática (METAVIR) em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV, baseado no polimorfismo nos genes da IL-28B rs 8099917

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

Avaliando os estágios de fibrose hepática pela classificação METAVIR de acordo com os polimorfismos estudados (nos genes do IFNL3 e IFNL4), independente do HCV-genótipo, foi encontrado similaridades entre os polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 e nos genes do IFNL4 ss469415590. As frequências dos genótipos de susceptibilidade para HCV foram exatamente iguais para F1, F2, F3 e muito próximas para F4. Os genótipos C/T e T/T corresponderam aos genótipos  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$  como pode ser observado na tabela 9.

Não foi observado associação com significância dos estágios de fibrose hepática com o rs 12979860 ou ss469415590, mas houve associação do polimorfismo nos genes da IL-28B rs 8099917 G/G e G/T com os estágios mais avançados de fibrose hepática (F3 e F4)  $p=0.02$ .

Tabela 9 - Estágios de fibrose hepática (classificação METAVIR) de acordo com os polimorfismos nos genes da IL-28B rs-860, rs-917 e do IFNL4 em pacientes com infecção crônica HCV atendidos no Hospital Santa Casa de Misericórdia do Pará no período de 2003 a 2013

IL-28B e IFNL4	F1	F2	F3	F4
rs 12979860				
C/C	07	14	04	11
CT	12	41	18	29
T/T	07	13	06	11
<b>CT e T/T</b>	<b>19</b>	<b>54</b>	<b>24</b>	<b>40</b>
rs8099917				
G/G	04	01	02	03
G/T	10	24	13	28
T/T	13	42	13	20
G/G e G/T	14	25	15	31
ss469415590				
$\Delta$ G/ $\Delta$ G	07	14	06	09
$\Delta$ G/T/T	12	40	18	29
T/T/T/T	08	11	03	10
<b><math>\Delta</math>G/<math>\Delta</math>G e <math>\Delta</math>G/T/T</b>	<b>19</b>	<b>54</b>	<b>24</b>	<b>38</b>

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.



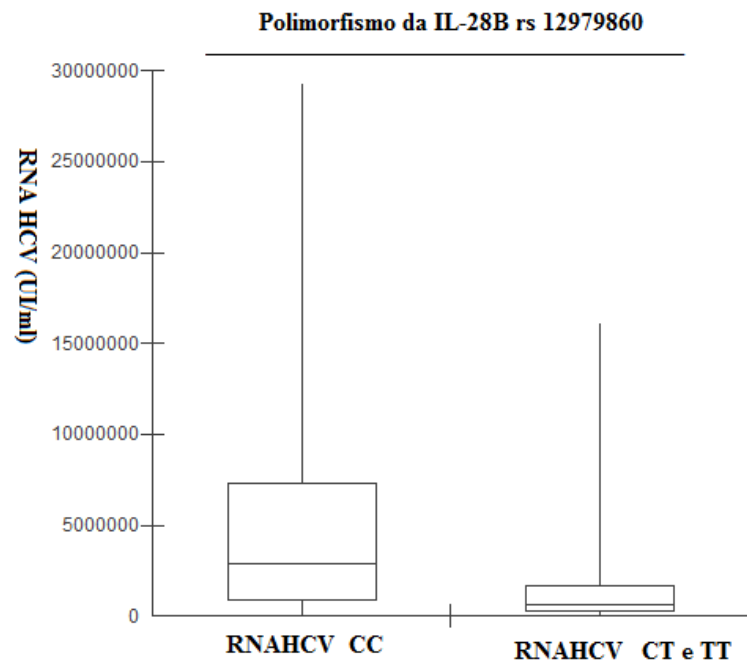


Figura 21 - RNA HCV UI/ml em pacientes com infecção crônica HCV-1, baseado no polimorfismo nos genes da IL-28B rs 12979860  $p=0,0006$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

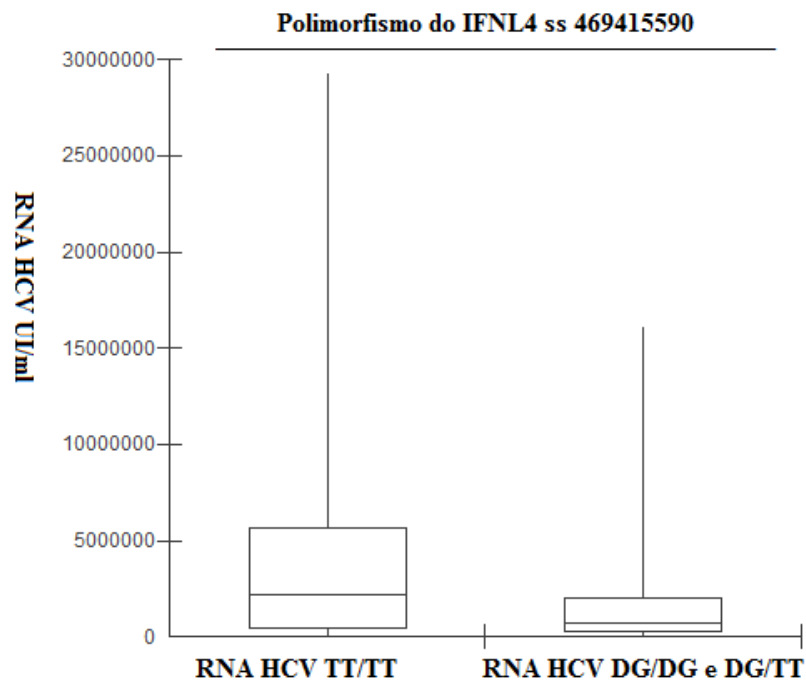


Figura 22 - RNA HCV UI/ml em pacientes com infecção crônica HCV-1, baseado no polimorfismo nos genes do IFNL4ss 469415590  $p=0,038$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

## 9.5 ANCESTRALIDADE

### 9.5.1 Avaliação da composição étnica em Pacientes HCV e Controles

As frequências das contribuições étnicas nos pacientes com infecção crônica HCV e controles (tabela 10) mostraram diferenças, tendo sido encontrada maior quantidade de contribuição da ancestralidade Ameríndia no grupo de pacientes com infecção crônica HCV comparado aos controles, e menor quantidade de contribuição da ancestralidade Européia no grupo de infecção crônica HCV quando comparado aos controles figura 24 e figura 25.

Tabela 10 - Ancestralidade genética em pacientes e controles estudados

Ancestralidade genética	Pacientes HCV n=136	Controles n=243	<i>p</i>
Africano (mediana) *	0,060	0,04	0,423
Europeu (media)**	0,588	0,662	0,001
Ameríndio (media)	0,275	0,214	0,002

\*Mann-Whitney, \*\* Teste t

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

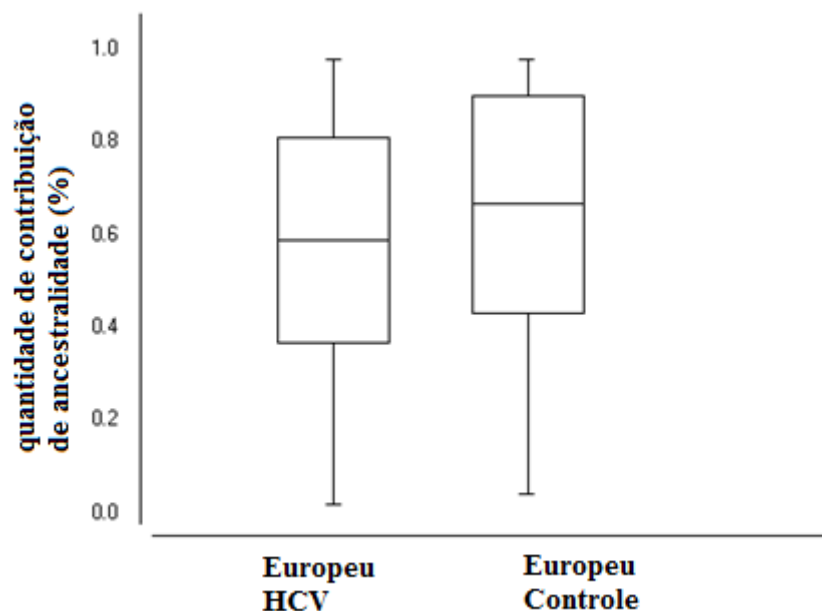


Figura 23 - Quantidade de Contribuição da ancestralidade europeia nos pacientes com infecção HCV e controles  $p=0,0019$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

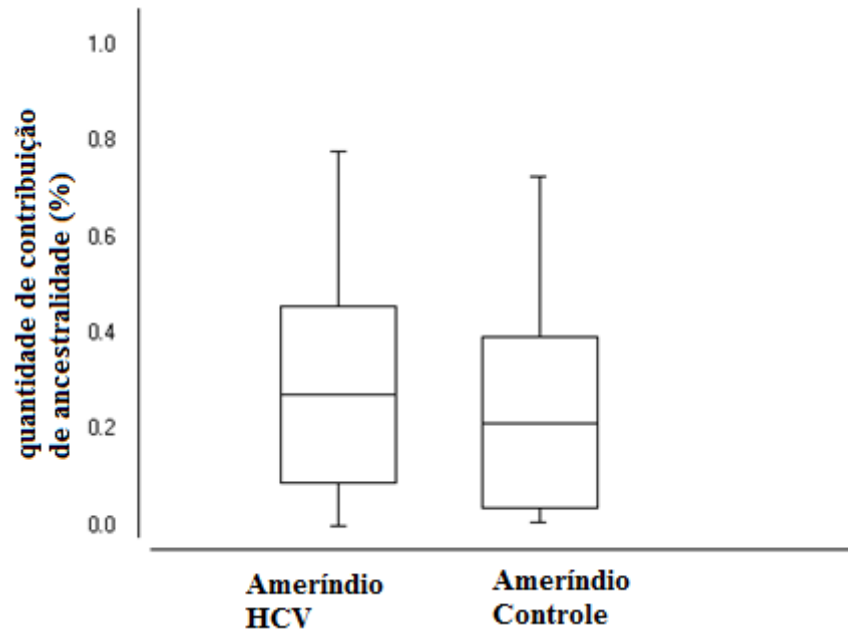


Figura 24 - Quantidade de contribuição da ancestralidade Ameríndia nos pacientes com infecção HCV e controles  $p=0,0022$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

### 9.5.2 Frequências Genóticas dos Polimorfismos da IL-28B rs 12979860 nas Contribuições Étnicas

As quantidades de contribuições das ancestralidades de acordo com o polimorfismo da IL-28B em pacientes com infecção crônica HCV estão na tabela 11.

O percentual de contribuição da ancestralidade Européia em pacientes com rs 12979860 genótipo C/C foi maior que nos pacientes de contribuição de ancestralidade Européia CT, T/T e agrupados em (CT e T/T) figuras 26, 27 e 28.

Os percentuais de contribuições de ancestralidade Ameríndia em pacientes com rs 12979860 genótipo CT, T/T e agrupados (CT e T/T), foram maiores que nos pacientes com contribuição da ancestralidade Ameríndia C/C, figuras 29 e 30.

Tabela 11 - Frequências dos Polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 de acordo com as contribuições étnicas em pacientes com infecção crônica HCV

Etnia e rs 12979860	teste	p
Africano C/C (n=27; mediana=0,040) vs Africano CT (n=81; mediana=0,070)	Mann Whitney	0.7847
Africano C/C (n=27; mediana=0,040) vs Africano T/T (n=28; mediana=0,050)	Mann Whitney	0.9329
Africano CT (n=81, mediana=0,070) vs Africano T/T (n=28; mediana=0,050)	Mann Whitney	0.9696
Africano C/C (n=27; mediana=0,040) vs Africano CT e T/T (n=109; mediana=0,060)	Mann Whitney	0.8124
Europeu C/C (n=27; media 0,678) vs Europeu CT (n=81; media=0,583)	Teste t	<b>0.0459</b>
Europeu C/C (n=27; media=0,678) vs Europeu T/T (n=28; media=0,515)	Teste t	<b>0.0103</b>
Europeu CT (n=81; media= 0,583) vs Europeu T/T ( n=28; media=0,517)	Teste t	0.1639
Europeu C/C e (n=27; media=0,678) vs Europeu CT e T/T (n=109; mediana=0,565)	Teste t	<b>0.0182</b>
Ameríndio C/C (n=27; media=0,20) vs Ameríndio CT (n=81; media=0,29)	Teste t	<b>0.0188</b>
Ameríndio C/C (n=27 ; media=0,201 ) vs Ameríndio T/T (n=; media=0,280)	Teste t	0.0982
Ameríndio CT ( n=81; media=0,29) vs Ameríndio T/T (n=28; media=0,28)	Teste t	0.6717
Ameríndio C/C (n=27; media=0,20 ) vs Ameríndio CT eT/T (n=109;media=0,29)	Teste T	<b>0.0202</b>

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

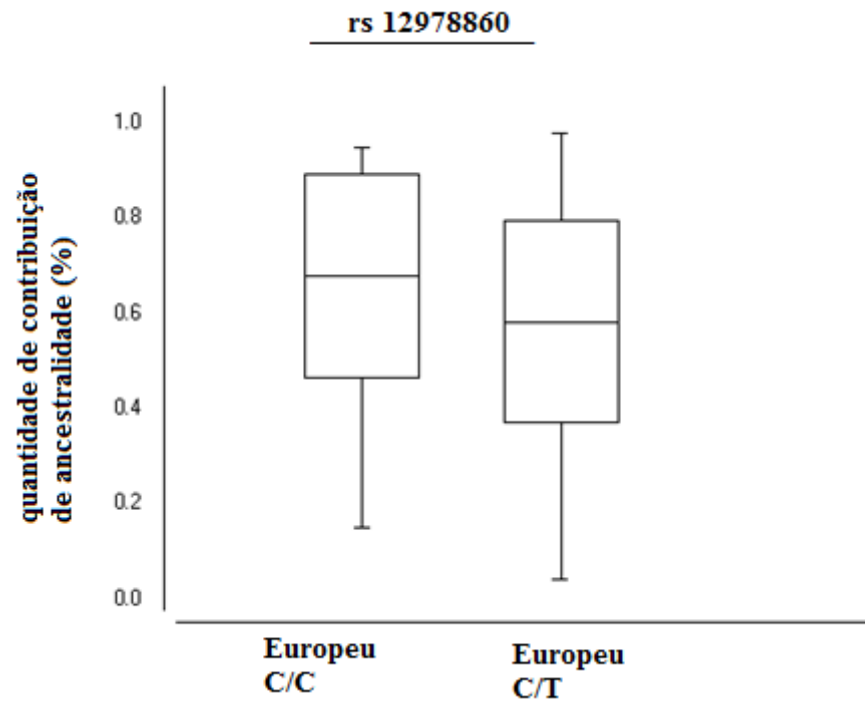


Figura 25 - Frequência do genótipo rs -860 C/C vs CT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia,  $p=0,045$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

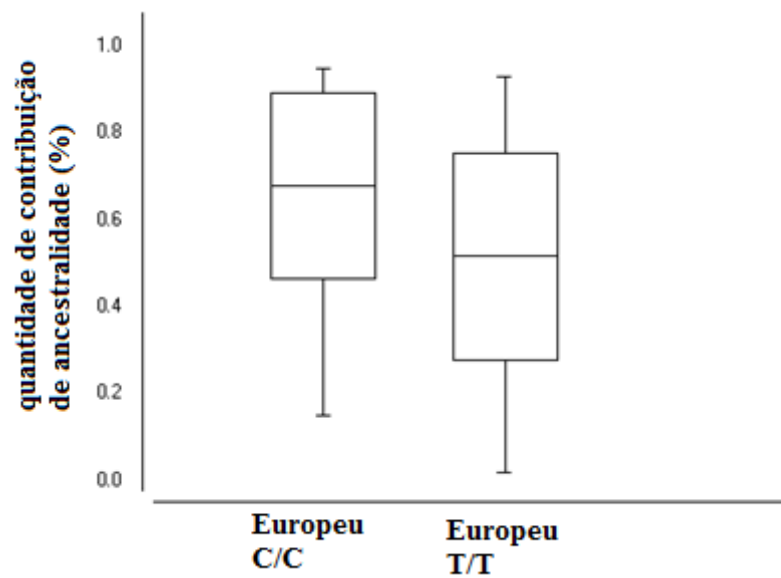


Figura 26 - Frequência do genótipo rs -860 C/C vs T/T em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia,  $p=0,010$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

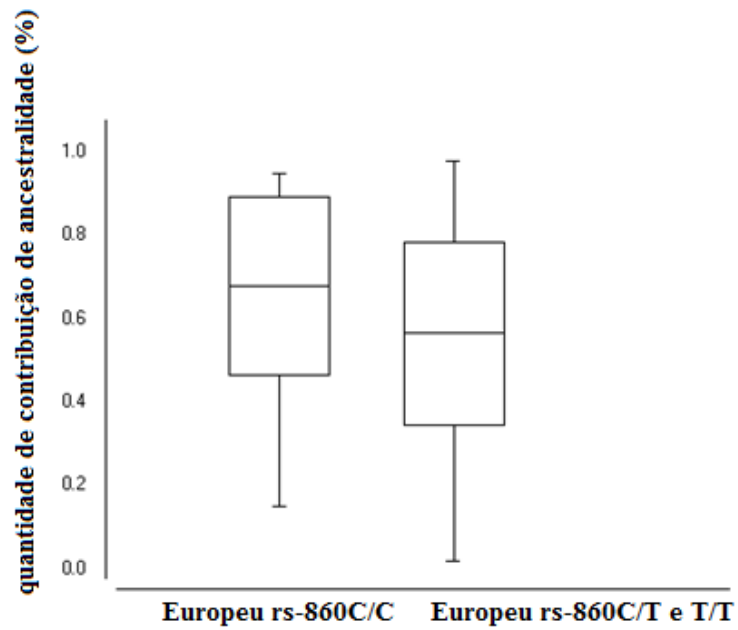


Figura 18 - Frequência do genótipo rs 12979860 C/C vs CT e T/T em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia,  $p=0,082$ .

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

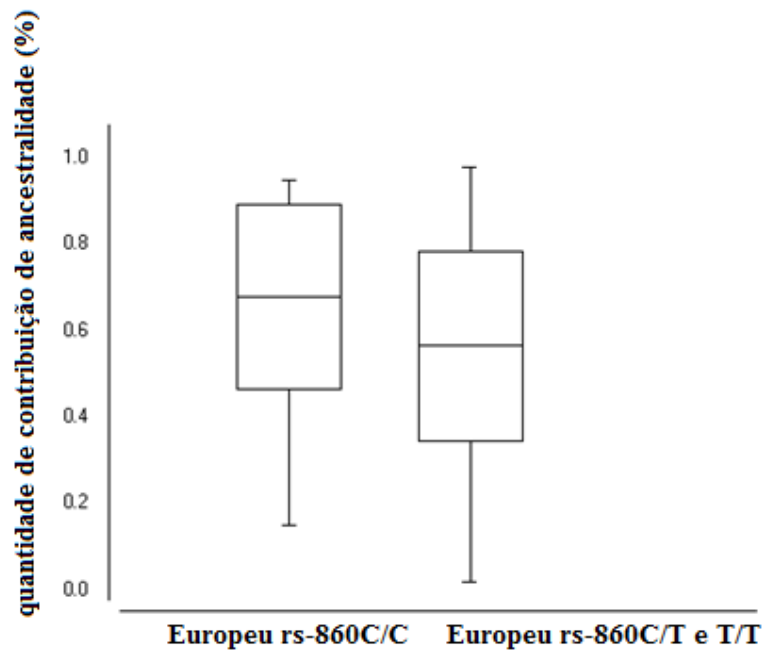


Figura 28 - Frequência do genótipo rs 12979860 C/C vs CT em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia,  $p=0,018$ .

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

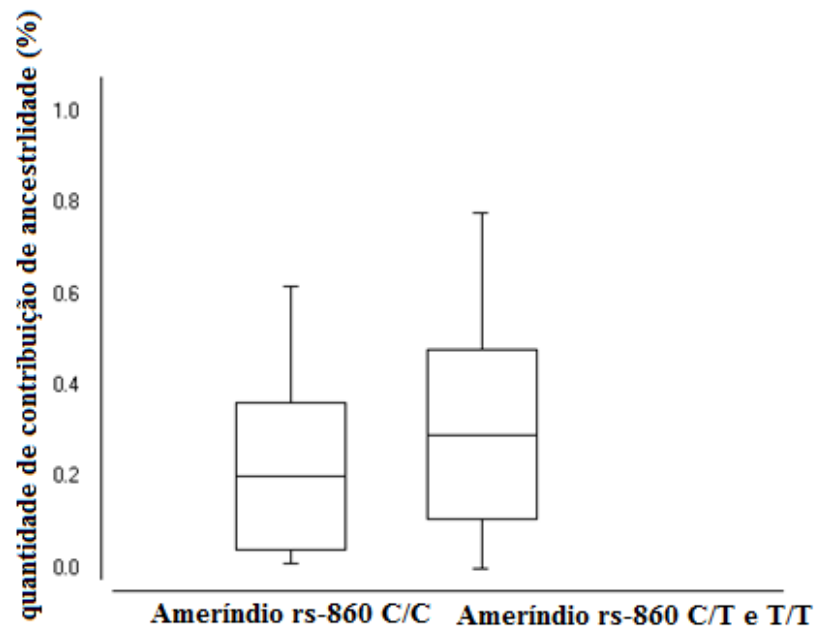


Figura 29 - Frequência do genótipo rs 12979860 C/C vs CT e T/T em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia,  $p=0,0202$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

### 9.5.3 Frequências Genotípicas dos Polimorfismos na IL-28B rs 8099917 nas Contribuições Étnicas

Os percentuais de contribuições das ancestralidades de acordo com o polimorfismo nos genes da IL-28B rs 8099917 em pacientes com infecção crônica HCV não mostraram diferenças significativas, tabela 12.

Tabela 12 - Frequências dos Polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860 de acordo com os percentuais de contribuições de ancestralidade étnicas em pacientes com infecção crônica HCV

Etnia e rs 8099917	<i>p</i>
Africano G/G (n=06; mediana=0,05) vs Africano G/T (n=60; mediana=0,06)	0.9200
Africano G/G (n=06; mediana=0,05) vs Africano T/T (n=70; mediana=0,07)	0.7800
Africano G/T (n=60; mediana=0,06) vs Africano T/T (n=70; mediana=0,07)	0.4592
Africano G/G e G/T (n=66; mediana=0,06) vs Africano T/T (n=70; mediana=0,07)	0.4513
Europeu G/G (n=06; media=0,593) vs Europeu G/T (n=60; media=0,562)	0.7550
Europeu G/G (n=06; media=0,593) vs Europeu T/T (n=70; media=0,609)	0.8628
Europeu G/T (n=60; mediana=0,562) vs Europeu T/T (n=70; mediana=0,609)	0.2316
Europeu G/G e G/T (n=66; mediana=0,565) vs Europeu T/T (n=70; mediana=0,609)	0.2490
Ameríndio G/G (n=06; media=0,288) vs Ameríndio G/T (n=60; media=0,299)	0.8924
Ameríndio G/G (n=06; media=0,288) vs Ameríndio T/T (n=70; media=0,252)	0.6331
Ameríndio G/T (n=60; mediana=0,299) vs Ameríndio T/T (n=70; mediana=0,252)	0.1489
Ameríndio G/G e G/T (n=66; mediana=0,29) vs Ameríndio T/T (n=70; mediana=0,24)	0.1435

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese



### 9.5.4 Frequências Genóticas dos Polimorfismos nos genes do IFNL4 ss 469415590 nas Contribuições Étnicas

As quantidades de contribuições das ancestralidades de acordo com o polimorfismo do IFNL4 em pacientes com infecção crônica HCV estão na tabela 13.

A quantidade de contribuição da ancestralidade Européia em pacientes com ss 469415590 genótipo T/T/T/T (favorável ao tratamento PR) foi maior que nos pacientes de contribuição da ancestralidade Européia  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$  e agrupados em  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$  (desfavoráveis ao tratamento PR) figuras 31, 32 e 33.

A quantidade de contribuição da ancestralidade Ameríndia em pacientes com ss469415590  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$  e agrupados em  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$  (desfavoráveis ao tratamento PR), foi maior que nos pacientes de contribuição da ancestralidade Ameríndia T/T/T/T (favorável ao tratamento PR) figuras 34 e 35.

Tabela 13 - Frequências dos Polimorfismos do IFNL4 ss469415590 de acordo com as contribuições étnicas em pacientes com infecção crônica HCV.

Etnia e ss469415590			<i>p</i>
Africano $\Delta G/\Delta G$ (n=29; mediana=0,02)	vs	Africano $\Delta G/T/T$ (n=81; mediana=0,07)	0.1836
Africano $\Delta G/\Delta G$ (n=29; mediana=0,02)	vs	Africano T/T/T/T (n=23; mediana=0,04)	0.6852
Africano $\Delta G/T/T$ (n=81; mediana=0,07)	vs	Africano T/T/T/T (n=23; mediana=0,04)	0.4312
Africano $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ (n=110; mediana=0,06)	vs	Africano T/T/T/T (n=23; mediana=0,04)	0.6405
Europeu $\Delta G/\Delta G$ (n=29 ; mediana=0,56)	vs	Europeu $\Delta G/T/T$ (n=81 ; mediana=0,59)	0.8176
Europeu $\Delta G/\Delta G$ (n=29; mediana=0,56)	vs	Europeu T/T/T/T (n=23; mediana=0,71)	<b>0.0333</b>
Europeu $\Delta G/T/T$ (n=81; mediana=0,59)	vs	Europeu T/T/T/T (n=23; mediana=0,71)	<b>0.0130</b>
Europeu $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ (n=110; mediana=0,59)	vs	Europeu T/T/T/T (n=23; mediana=0,71)	<b>0.0101</b>
Ameríndio $\Delta G/\Delta G$ (n=29; media=0,284)	vs	Ameríndio $\Delta G/T/T$ (n=81; media=0,298)	0.7424
Ameríndio $\Delta G/\Delta G$ (n= 29; media=0,284)	vs	Ameríndio T/T/T/T (n=23; media=0,191)	0.0591
Ameríndio $\Delta G/T/T$ (n=81; media=0,298)	vs	Ameríndio T/T/T/T (n=23; media=0,191)	<b>0.0155</b>
Ameríndio $\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$ (n=110; media=0,294)	vs	Ameríndio T/T/T/T (n=23; media=0,191)	<b>0.0147</b>

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

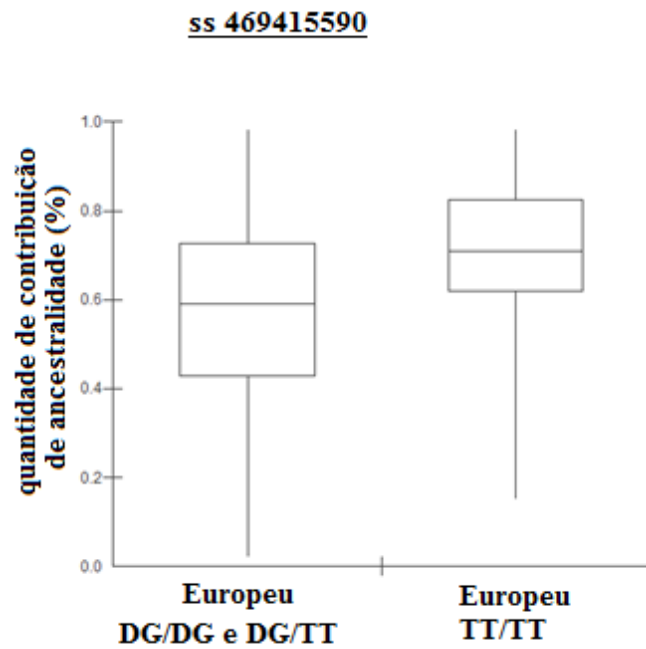


Figura 30 - Frequência do genótipo ss 469415590 T/T/T/T vs  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$  em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia,  $p=0,010$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

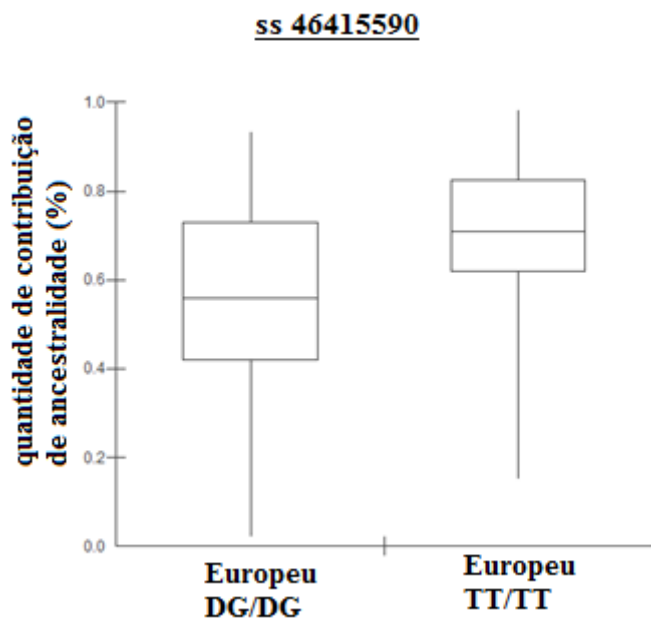


Figura 31 - Frequência do genótipo ss 469415590 T/T/T/T vs  $\Delta G/\Delta G$  e T/T/T/T em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Européia,  $p=0,03$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

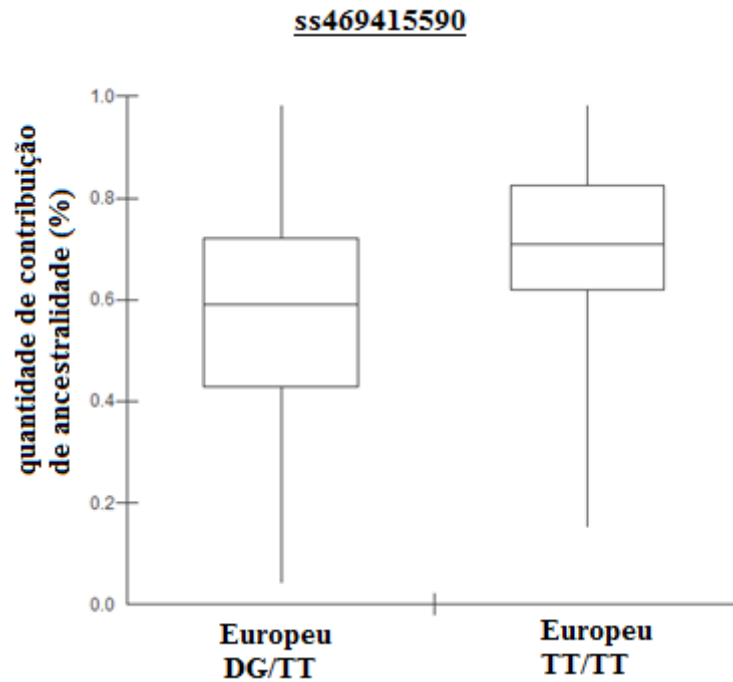


Figura 32- Frequência do ss 469415590  $\Delta G/T/T$  vs  $T/T/T/T$  em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Europeu,  $p=0,0130$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

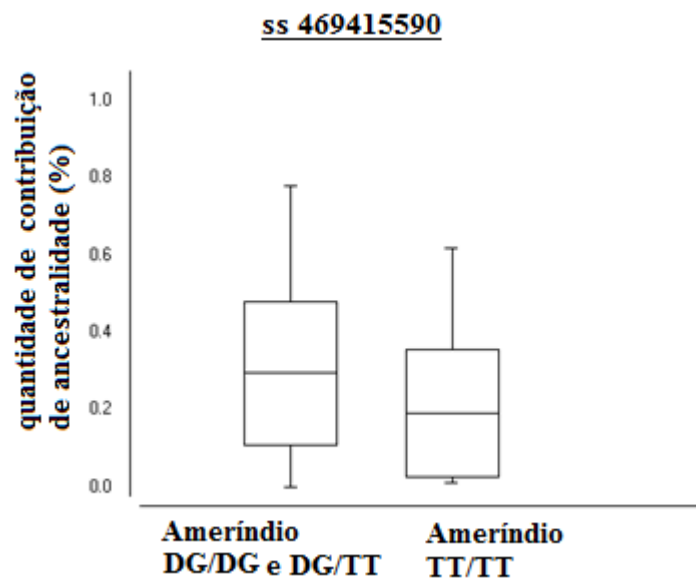


Figura 19 - Frequência do ss 469415590  $T/T/T/T$  vs  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$  em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia,  $p=0,014$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

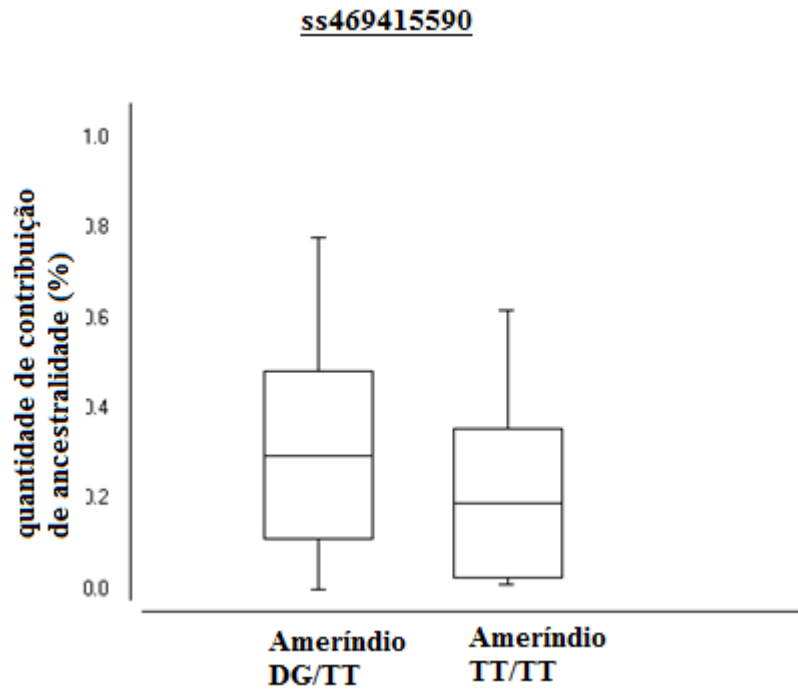


Figura 34 - Frequência do genótipo ss 469415590 T/T/T/T vs  $\Delta$ G/T/T em pacientes com infecção crônica HCV na contribuição étnica Ameríndia,  $p=0,015$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

### 9.5.5 Contribuições de Ancestralidade Genética e Resposta Terapêutica com o Esquema Combinado PR em Pacientes com Infecção Crônica HCV-1 de acordo com as Contribuições Étnicas.

A resposta virológica sustentada não foi influenciada pelas contribuições de ancestralidade tabela 14.

Tabela 14 - Resposta ao tratamento PR e contribuições étnicas

Contribuições étnicas	RVS	NRVS	$p$
Africano (Mediana)	0,07	0,04	0,24 <sup>a</sup>
Europeu (Média)	0,601	0,598	0,94 <sup>b</sup>
Ameríndio (média)	0,276	0,282	0,85 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mann-Whitney, <sup>b</sup> Teste t.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

### 10.5.6 Contribuição de ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo dos genes da IL-28B rs 12979860, rs8099917, do IFNL4 ss469415590 e resposta terapêutica com a combinação PR em pacientes com infecção crônica HCV-1

As avaliações das contribuições de ancestralidade de acordo com os polimorfismos estudados estão demonstradas nas tabelas 15 A, 15 B, 15 C.

A quantidade de contribuição da ancestralidade Africana nos pacientes com infecção crônica HCV apresentando rs 8099917 genótipo T/T, foi maior nos pacientes que responderam (RVS) ao tratamento com o esquema PR quando comparada com os pacientes de contribuição da ancestralidade Africana apresentando rs 8099917 genótipo T/T que não alcançaram resposta virológica sustentada (NRVS).

Tabela 15A – Percentual de contribuição de ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo dos genes da IL-28B rs 12979860 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes com HCV-1.

Genótipo	Ancsralidade	Resposta terapêutica	Percentual de contribuição de ancestralidade	<i>p</i>
C/C	Africano	RVS	0,07	0,06
		NRVS	0,02	
	Europeu	RVS	0,68	0,52
		NRVS	0,74	
	Ameríndio	RVS	0,15	0,264
		NRVS	0,22	
CT	Africano	RVS	0,07	0,64
		NRVS	0,06	
	Europeu	RVS	0,58	0,75
		NRVS	0,57	
	Ameríndio	RVS	0,30	0,71
		NRVS	0,31	
T/T	Africano	RVS	0,08	1,0
		NRVS	0,02	
	Europeu	RVS	0,54	0,80
		NRVS	0,56	
	Ameríndio	RVS	0,34	0,175
		NRVS	0,23	
CT e T/T	Africano	RVS	0,07	0,64
		NRVS	0,04	
	Europeu	RVS	0,57	0,88
		NRVS	0,57	
	Ameríndio	RVS	0,30	0,68
		NRVS	0,29	

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Tabela 15B. Contribuição da ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo nos genes da IL-28B rs 8099917 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes HCV-1.

rs 8099917	Ancestraliade	Resposta terapêutica	Percentual de contribuição de ancestralidade	<i>p</i>
G/G	Africano	RVS NRVS	-	-
	Europeu	RVS NRVS	-	-
	Ameríndio	RVS NRVS	-	-
G/T	Africano	RVS NRVS	0,06 0,04	0,798
	Europeu	RVS NRVS	0,56 0,54	0,81
	Ameríndio	RVS NRVS	0,33 0,32	0,76
T/T	Africano	RVS NRVS	0,07 0,02	<b>0,0272</b>
	Europeu	RVS NRVS	0,61 0,64	0,27
	Ameríndio	RVS NRVS	0,25 0,26	0,83

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Tabela 15C. Contribuição da ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo nos genes do IFNL4 ss 469415590 e resposta a terapia antiviral com o esquema PR em pacientes HCV-1.

ss 469415590	Ancestralidade	Resposta terapêutica	Percentual de contribuição de ancestralidade	<i>p</i>
$\Delta G/\Delta G$	Africano	RVS NRVS	0,02 0,02	0,732
	Europeu	RVS NRVS	0,59 0,54	0,61
	Ameríndio	RVS NRVS	0,33 0,26	0,40
$\Delta G/T/T$	Africano	RVS NRVS	0,07 0,06	0,471
	Europeu	RVS NRVS	0,58 0,55	0,60
	Ameríndio	RVS NRVS	0,28 0,31	0,54
$T/T/T/T$	Africano	RVS NRVS	0,06 0,03	0,16
	Europeu	RVS NRVS	0,66 0,79	0,17
	Ameríndio	RVS NRVS	0,17 0,17	0,99
$\Delta G/\Delta G$ e $T/T/T/T$	Africano	RVS NRVS	0,07 0,04	0,52
	Europeu	RVS NRVS	0,58 0,57	0,82
	Ameríndio	RVS NRVS	0,29 0,30	0,86

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

### 10.5.7 Estágio de fibrose hepática (F) METAVIR e níveis de RNA-HCV(UI/ml) em pacientes com infecção crônica HCV, independente de HCV-genótipo de acordo com as contribuições genéticas de ancestralidade

As contribuições das ancestralidades não mostraram influenciar os estágios de fibrose hepática e nem a carga viral HCV Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Estágio de fibrose hepática F (METAVIR) e contribuições étnicas.

Contribuições étnicas	F1F2	F3F4	<i>p</i>
Africano (Mediana)	0,07	0,06	0,88 <sup>a</sup>
Europeu (Média)	0,598	0,573	0,55 <sup>b</sup>
Ameríndio (média)	0,260	0,2960	0,27 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mann-Whitney, <sup>b</sup> Teste t.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Tabela 17 - RNA HCV UI/ml e contribuições étnicas

Contribuições étnicas	RNA HCV UI/ml		p
	<600.000	≥600.000	
Africano (Mediana)	0,07	0,06	0,49 <sup>a</sup>
Europeu (Média)	0,577	0,609	0,45 <sup>b</sup>
Ameríndio (média)	0,286	0,250	0,31 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Mann-Whitney, <sup>b</sup> Teste t.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

## 9.6 RESPOSTA AO TRATAMENTO COM A COMBINAÇÃO PR EM PACIENTES COM INFECÇÃO CRÔNICA HCV-1.

### 9.6.1 Resposta Viroológica Rápida (RVR) e Resposta Viroológica Lenta (RVL) baseado nos polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, do IFNL4 ss 469415590

A avaliação de Resposta virológica rápida (RVR) e resposta virológica lenta (RVL) baseada no Polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917 genótipos G/G e G/T vs T/T em pacientes com infecção crônica HCV, mostrou que os genótipos agrupados tem mais chances de resposta lenta ao tratamento PR que o genótipo T/T OR=6,5,  $p=0,0312$ , IC95% 1,39-30,36, tabela 18A.

### 9.6.2 RVS, RVR e RVL Baseados nos Polimorfismos nos genes da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, do IFNL4 ss 469415590 com Genótipos Agrupados em genótipos protetores vs genótipos de susceptibilidade.

A avaliação de RVS com os genótipos agrupados não mostrou diferença tabela 18A, porém quando avaliadas as respostas virológicas rápidas e lentas, os genótipos de susceptibilidade agrupados, foram mais frequentes nos pacientes respondedores lentos tabela 18B.



Tabela 18A - Resposta virológica sustentada (RVS), resposta virológica não sustentada (NRVS), baseada no Polimorfismo dos genes da IL-28B e do IFNL4 com genótipos agrupados

Polimorfismo da IL- 28B rs 12979860, rs 8099917 e polimorfismo do IFNL4 ss 469415590	NRVS (n)	RVS (n)	$p^a$
Genótipos de susceptibilidade* C/C - T/T/T/T – T/T	08	10	0,22
Genótipos protetores** C/T - ΔG/ΔG – G/T	24	15	

\*sequência rs 12979840 genótipo CT, ss 469415590 genótipo ΔG/T/T e rs 8099917 Genótipo G/G \*\*sequência rs 12979840 genótipo C/C, ss 469415590 genótipo T/T/T/T e rs 8099917 Genótipo T/T, <sup>a</sup> Qui-quadrado.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Tabela 18B- Resposta virológica rápida (RVR), resposta virológica lenta (RVL), baseada no Polimorfismo dos genes da IL-28B e dos genes do IFNL4 com genótipos agrupados em protetores e heterozigotos de susceptibilidade.

Polimorfismo da IL- 28B rs 12979860, rs 8099917 e polimorfismo do IFNL4 ss 469415590	RVR	RVL	$p^a$
Genótipos de susceptibilidade* C/C -T/T/T/T – T/T	05	02	<b>0,034</b>
Genótipos protetores** CT - ΔG/ΔG – G/T	02	08	

\*sequência rs 12979840 genótipo CT, ss 469415590 genótipo ΔG/T/T e rs 8099917 Genótipo G/G \*\*sequência rs 12979840 genótipo C/C, ss 469415590 genótipo T/T/T/T e rs 8099917 Genótipo T/T, <sup>a</sup> Qui-quadrado.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

### 9.6.3 Resposta virológica sustentada de acordo com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais

Na avaliação geral da RVS em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina, foi observado que fatores como: Gênero, Idade menor que 45 anos, contagem de plaquetas, RNA HCV quantitativo, estágio de fibrose leve e moderado (F1F2), atividade periportal e parenquimatosa moderada, mostraram significância com relação à resposta terapêutica. tabela 19.

Tabela 19 - Resposta terapêutica de acordo com dados demográficos, estágio de fibrose, atividade histológica, HCV-1 (Subtipo), carga viral, AST, ALT, G/G/T, níveis de plaquetas e em pacientes com infecção crônica HCV-1

Variáveis	RVS*n=105	NRVS** n=96	<i>p</i>
Idade <sup>a</sup>			
<45 anos	27	09	<b>0,0044</b>
≥45 anos	76	80	
Sexo <sup>a</sup>			<b>0,0073</b>
masc	55	68	
Fem	50	28	
METAVIR (F) <sup>a</sup>			<b>&lt;0,0001</b>
F1	09	10	
F2	63	28	
F3	16	20	
F4	12	33	
METAVIR (A) <sup>a</sup>			<b>0,0392</b>
A1	34	24	
A2	53	39	
A3	05	08	
Subtipo <sup>a</sup>			0,373
a	12	16	
b	57	52	
Carga viral basal <sup>a</sup> (UI/ml)			<b>&lt;0,0001</b>
<600.000	48	16	
≥ 600.000	37	49	
AST U/l (mediana) <sup>b</sup>	57	71.5	<b>0.051</b>
ALT U/L (mediana) <sup>b</sup>	85	93	0.7
G/G/T U/L ( mediana) <sup>b</sup>	67	68	0.1
Plaquetas/ mm <sup>3</sup> (média) <sup>c</sup>	204.73	169.04	<b>0.0010</b>

Quadrado, <sup>b</sup> Mann-Whitney, <sup>c</sup> teste t

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

<sup>a</sup>  
Qui-

OS subtipos genotípicos do HCV não foram significativos entre os dois grupos de respondedores e não respondedores ao tratamento assim como os níveis de ALT e G/G/T. Houve tendência a maiores níveis de AST associados com RVS.

#### 9.6.4 Variáveis preditoras de RVS em Pacientes com Infecção Crônica HCV-1 Tratados com o Esquema Combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina

Foram encontrados como variáveis preditoras de RVS: gênero Feminino, Idade menor que 45 anos, Fibrose leve a moderada, polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917 genótipo T/T, níveis de RNA-HCV abaixo de 600.000UI/ml e níveis de plaquetas  $\geq 150 \times 10^4$  /mm<sup>3</sup> tabela20, figuras 36, 37,38,39,40 e 41. As variáveis preditoras de resposta ao tratamento

foram avaliadas por análise de regressão logística simples e por regressão logística múltipla tabelas 21A e 21B. Na análise por teste de Regressão logística simples, as variáveis gênero e rs 8099917 da IL-28B não mostraram significância. As variáveis: Estágio de Fibrose hepática, Contagem de plaquetas, RNA HCV quantitativo e Genótipo HCV foram avaliados por teste de Regressão logística múltipla e somente contagem de Plaquetas não apresentou significância, porém mostrou tendência a ser preditor de RVS com níveis acima de  $150.000/\text{mm}^3$ .

Tabela 20 - Fatores preditores de RVS em pacientes com infecção HCV-1, que receberam tratamento com esquema de Interferon peguilado e Ribavirina

Preditor de RVS	OR	IC 95%	P <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>
Gênero fem	2,20	1,22-3,92	0,011	0,0073
Idade < 45 anos*	3,15	1,39- 7,14	0,077	0,0044
Fibrose ** leve a moderada (F1F2)	3,58	1,96-6,55	<0,0001	<0,0001
rs8099917 genótipo T/T***	2,63	1,28- 5,40	0,0129	0,027
RNA HCV*** <600.000UI/ml	3,97	1,95-8,07	0,0002	<0,0001
Plaquetas $\geq 150 \times 10^4/\text{mm}^3$ *****	4,31	2,01-9,22	0,0002	0,0001

\* Idade <45 anos vs  $\geq 45$  anos ; \*\* F1F2 vs F3F4 (METAVIR; \*\*\* (rs 8099917 ) T/T vs G/T G/G);  
 \*\*\*\*\* RNAHCV <600.000UI/ml vs RNAHCV  $\geq 600.000$ UI/ml, \*\*\*\*\* Contagem de plaquetas  
 $\geq 150 \times 10^4/\text{mm}^3$  vs Contagem de plaquetas  $\geq 150 \times 10^4$ , P<sup>a</sup> OR, P<sup>b</sup> Qui-Quadrado.

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

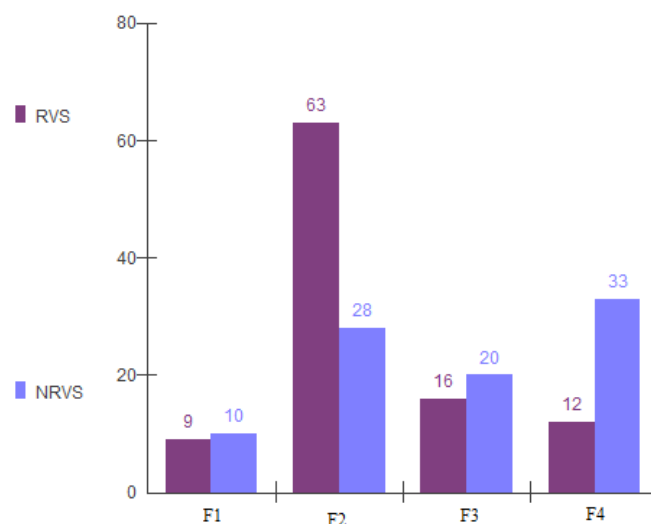


Figura 35 - Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos estágios de fibrose hepática em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p < 0,0001$ .

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

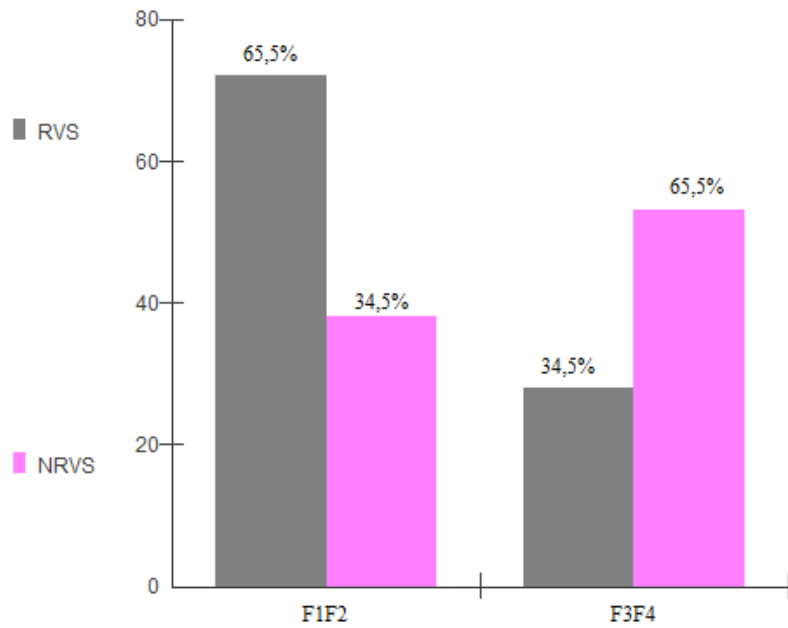


Figura 36 - Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos estágios de fibrose hepática F1F2, F3F4 em pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p < 0,0001$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

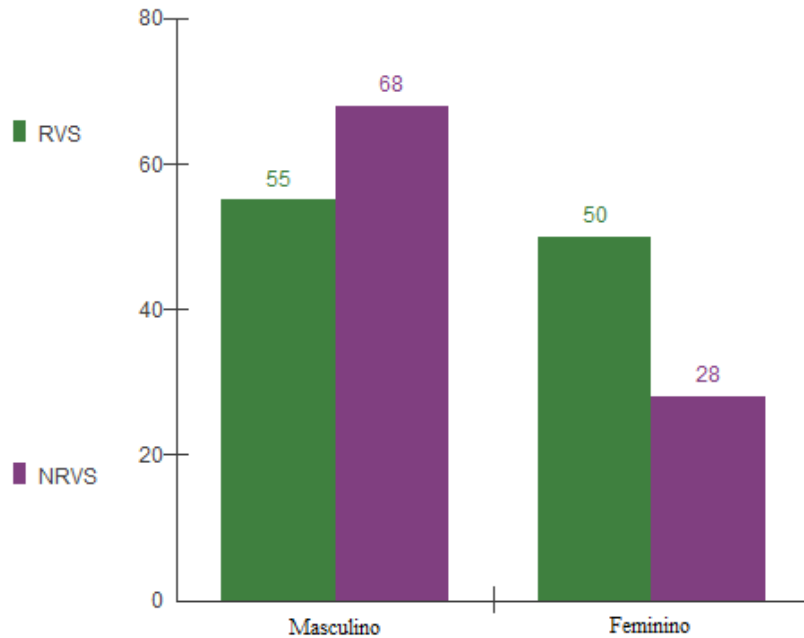


Figura 20 - Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos gêneros dos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p = 0,0073$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

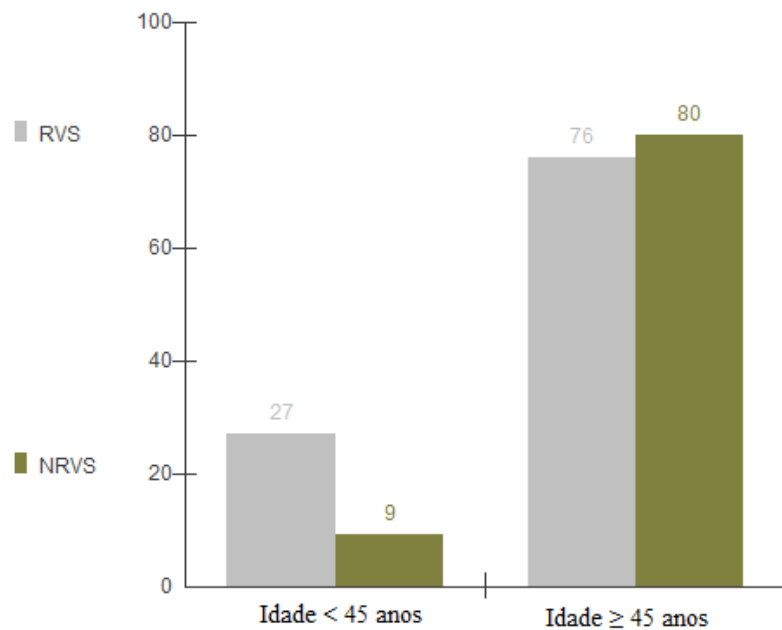


Figura 38 - Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nas idades < 45 anos e ≥ 45 anos de pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p=0,0044$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

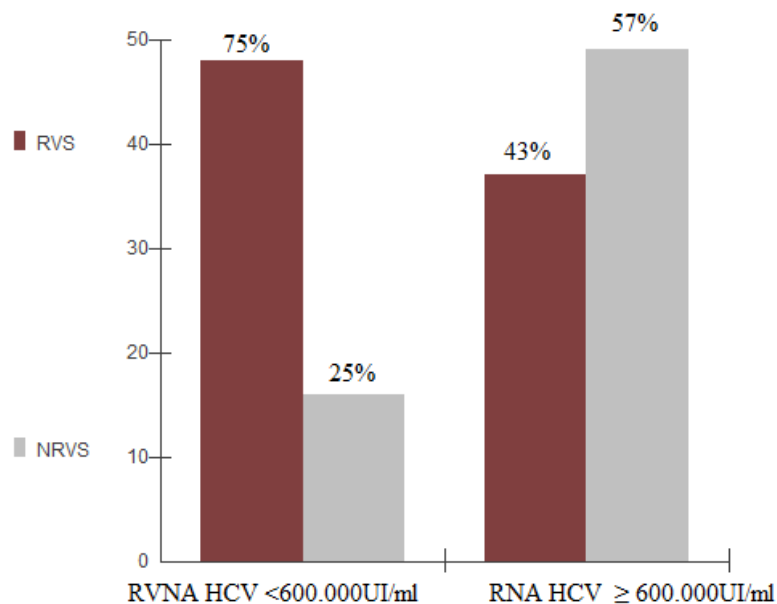


Figura 39 - Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos níveis de RNA HCV <600.000UI/ml e ≥ 600.000UI/ml (carga viral) nos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p<0,0001$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

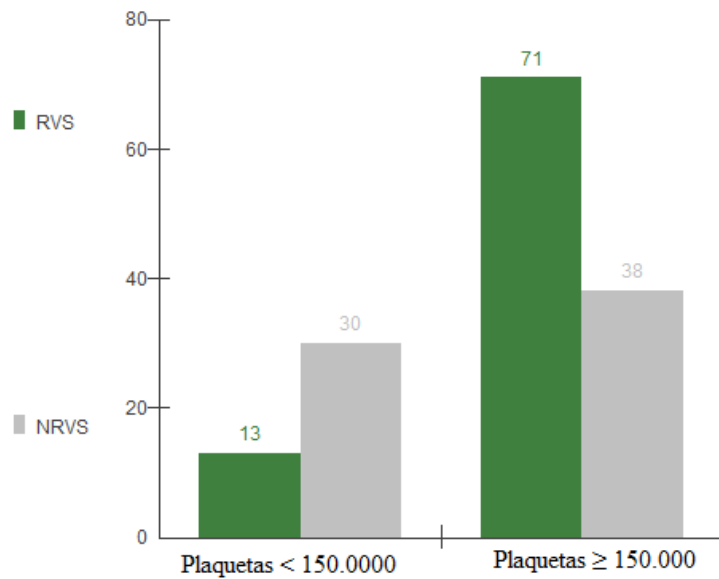


Figura 40 - – Resposta virológica sustentada e não resposta virológica sustentada baseada nos níveis de Plaquetas <150.000 e ≥ 150.000 nos pacientes com infecção crônica HCV genótipo 1 HCV tratados com o esquema de PEG- Interferon e Ribavirina  $p < 0,0001$

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese.

Tabela 21 A - Fatores preditores de RVS em pacientes HCV-1, tratados com o esquema combinado PR avaliados por teste de Regressão Logística Simples, de acordo com as variáveis : idade, gênero, estágio de fibrose hepática, níveis plaquetários e carga Viral

Variáveis	<i>p</i>	OR	IC95%
Idade (anos)	<b>0,0265</b>	5.8500	1,23-27,86
Sexo	0,0526	2.3262	0,99-5,46
Fibrose hepática (F) METAVIR	<b>0,0028</b>	3.8333	1,59-9,24
Polimorfismo IL-28B rs-8099917	0,1090	1.9833	0,86-4,58
Níveis de Plaquetas	<b>0,0217</b>	3.1731	1.18-8.50
RNA HCV quantitativo	<b>0,00050</b>	3.6167	1.47-8.87

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Tabela 21B Fatores preditores de RVS em pacientes HCV-1, tratados com o esquema combinado PR avaliados por análise de regressão logística múltipla, de acordo com as variáveis Estágio de fibrose hepática, Níveis Plaquetários e Carga Viral.

Variáveis	<i>p</i>	OR	IC95%
Fibrose hepática (F) METAVIR	0,0057	4.2547	1.53-11.87
Níveis de Plaquetas	0,1394	2.33	0.76-7.19
RNA HCV quantitativo	0,0022	4.9905	1.78-13.95

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

Os fatores associados com RVS em pacientes HCV-1 foram submetidos à análise de regressão logística simples e as variáveis: Idade < 45 anos, Plaquetas  $\geq 150 \times 10^4 / \text{mm}^3$ , RNA HCV < 600.000UI/ml, estágio de fibrose leve a moderado (F1F2), apresentaram significância em relação à RVS. Estas três variáveis foram submetidas ao teste de regressão logística múltipla e foi feita a estimação probabilística de RVS a partir da combinação de fatores preditivos positivos e/ou negativos de RVS com duas ou três destas variáveis.

Os valores probabilísticos de RVS, foram analisados por regressão logística múltipla considerando as combinações das seguintes variáveis representadas por X1, X2 e X3 os quais: X1= Estágio de fibrose hepática (F), X1=0 (F3F4), X1=1 (F1F2); X2= Níveis de Plaquetas, X2=0 (Plaquetas  $\leq 150.000/\text{mm}^3$ ), X2=1 (Plaquetas  $> 150.000/\text{mm}^3$ ); X3= RNA HCV Quantitativo (UI/ml), X3=0 (RNA HCV  $\geq 600.000$ ), X3=1 (RNA HCV < 600.000). Foi encontrada estimação probabilística de RVS= 88,21 quando os três fatores preditivos positivos estavam presentes como: Plaquetas  $\geq 150 \times 10^4 / \text{mm}^3$ , RNA HCV < 600.000UI/ml e estágio de fibrose F1 ou F2 Tabela 22.

Tabela 22 - Estimativa probabilística de RVS em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com esquema combinado de Interferon Peguilado com Ribavirina, por teste de Regressão logística Múltipla de acordo com estágio de fibrose (F), níveis de Plaquetas e carga viral do HCV ( RNA-HCV UI/ml).

X1 (F)	X2 (Níveis de Plaquetas/mm <sup>3</sup> )	X3 RNA HCV (UI/ml)	Probabilidade de RVS %
F3F4	≤150.000		13,11
F3F4	>150.000		26,06
F1F2	≤150.000		39,11
F1F2	>150.000		<b>59,99</b>
	≤150.000	≥600.000	13,11
	≤150.000	< 600.000	42,96
	>150.000	≥600.000	26,06
	>150.000	< 600.000	<b>63,75</b>
F3F4		≥600.000	13,11
F3F4		< 600.000	42,96
F1F2		≥600.000	39,11
F1F2		< 600.000	<b>76,22</b>
F3F4	≤150.000	≥600.000	13,11
F3F4	>150.000	< 600.000	<b>63,75</b>
F1F2	≤150.000	≥600.000	39,11
F1F2	>150.000	< 600.000	<b>88,21</b>
F3F4	≤150.000	< 600.000	42,96
F3F4	>150.000	≥600.000	<b>59,99</b>

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

#### 10.6.5- Avaliação dos Polimorfismos Estudados de Acordo com a não-RVS no Tratamento com a Combinação PR em Pacientes com HCV-1.

Observado associação para o rs 8099917 G/G e G/T com a falha ao tratamento mas não com o ss 469415590 e rs 12979860, avaliados por regressão logística simples e por teste de regressão logística múltipla tabela 23.



Tabela 23 - Pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com a combinação PR, avaliados para falha terapêutica por Regressão logística simples de acordo com os polimorfismos estudados

Genótipos da IL28B e IFNL4	<i>p</i>	OR	IC 95%
$\Delta G/\Delta G$ e $\Delta G/T/T$	0,34	1,59	0,61-4,18
G/G e G/T	0,030	2,24	1.08-4.67
CT e T/T	0,66	1,22	0.49-3.05

Fonte: Banco de dados elaborado para a tese de doutorado referente aos indivíduos incluídos no estudo.

## 10 DISCUSSÃO

Atualmente estão sendo introduzidas as novas opções de tratamento para infecção crônica HCV, inclusive com regimes livres de Interferon (AASLD/IDSA, 2015, EASL, 2015, BRASIL, 2015), porém este não foi retirado dos esquemas direcionados contra a infecção HCV.

Fatores genéticos como os polimorfismos da IL-28B e do IFNL-4 estão relacionados com a resposta virológica sustentada quando usado o esquema com Interferon, porém o conhecimento sobre o seu comportamento em população miscigenada é escasso (CAVALCANTE, et al 2012).

Pesquisas conduzidas em busca de maior conhecimento relacionado ao hospedeiro e/ou ao vírus são importantes principalmente quando novas drogas são introduzidas no arsenal terapêutico com ótimas perspectivas de respostas virológicas, porém ainda vão ocorrer falhas e vão surgir as chamada RAVS variantes associadas à resistência (PEIFFER, et al., 2015).

Os diversos estágios da doença orquestram o direcionamento do processo infeccioso, muitos pacientes não se enquadrarão nas indicações do novo tratamento (AASLD/IDSA, 2015, EASL, 2015, Brasil, 2015), continuará a susceptibilidade ao carcinoma hepatocelular e muitos serão candidatos ao transplante de fígado.

É certo que o futuro chegou com esta nova perspectiva terapêutica, mas as pesquisas continuam sempre voltadas para atender melhor ao doente e melhorar o seu prognóstico.

Este estudo foi realizado por se tratar de uma população miscigenada de contribuição étnica tri-híbrida que pouco conhecemos e buscar respostas para alguns questionamentos.

Quais as frequências genotípicas da IL-28B rs 12979860, rs 8099917, do IFNL4 ss 469415590 encontradas nos pacientes com infecção crônica HCV e controles neste estudo?

Em relação às frequências genotípicas estudadas em pacientes com infecção HCV e controles, mostraram maiores frequências do rs12979860 genótipo C/C e do ss469415590 genótipo T/T/T/T nos controles do que nos pacientes com infecção crônica HCV, demonstrando proteção contra esta infecção viral. Encontrada significativa diferença entre os pacientes e controles nas distribuições de alelos e de genótipos de ambos rs 12979860 e 8099917, com predomínio dos alelos e genótipos “benéficos” nos controles (Garcia, et al.,

2013). A presença do rs12979860 alelo T foi fortemente associada com a infecção crônica HCV tendo sido encontrado com maior frequência nos pacientes com infecção HCV que os controles (FALLETI, E. *et al*).

Em estudo realizado baseado nos indivíduos em situação de risco, expostos a infecção HCV como os usuários de drogas ilícitas endovenosa, não foi observado maior frequência do rs 12979860 genótipo C/C (KNAPP, et al., 2011), porém em outra publicação, entre indivíduos infectados com o HCV-1, foi observado frequência menor do rs12979860 genótipo C/C (LUNDBO, et al., 2014). Em uma coorte de 225 pacientes tailandeses houve uma frequência bem maior do rs 12979860 genótipo C/C, assim como menor frequência do rs 12979860 genótipo T/T do que a encontrada no estudo aqui apresentado, (AKKARATHAMRONGSIN, 2014) e outro grupo encontrou diferentes frequências do rs 12979860 alelo C em diferentes grupos étnicos (CHUANG, YU, 2013).

As distribuições das frequências genóticas encontradas neste estudo o rs 8099917 genótipos G/G, G/T e T/T foram semelhantes as encontradas no estudo de Rauch (2010), que encontraram as frequências genóticas seguintes: T/T, G/T, e G/G foram de 50%, 37% e 5%, respectivamente nos pacientes com infecção crônica HCV. O alelo G quando se apresentou em homo ou em heterozigose, obteve chance de 5,19 vezes mais de falha terapêutica com o esquema PR quando comparado aos pacientes que portavam o rs 8099917 genótipo T/T (RAUCH et al., 2010) sendo maior do que a encontrada no estudo aqui apresentado mas ainda corroborando este resultado.

De acordo com dados do Projeto 100 genomas as frequências dos rs8099917 genótipos são variáveis de acordo com a etnia.

A frequência estimada do rs 8099917 alelo G no estudo aqui apresentado foi alta (27,55%), quando comparada ao projeto 1000 genomas em que descreve a frequência mais baixa de 4% na população Africana e a mais alta de 28% na população Americana (ENSEMBL GENOME BROWSER, 2015).

Na publicação de (CAVALCANTE, et al., 2012), encontraram maior frequência do rs 8099917 alelo T (80,7%) e menor frequência do alelo G de 19,3%, ressaltando que esta população é miscigenada e do Nordeste do Brasil, aspecto este diferente do encontrado no estudo em questão.

A frequência do rs 12979860 genótipo C/C foi baixa no estudo aqui apresentado, quando comparado com o outro estudo, porém diferente em relação ao rs 8099917 em que foi encontrada maior frequência do genótipo G/G (CAVALCANTE, et al., 2012).

Sobre a variante IFNL4 rs 368234815 foi encontrado neste estudo maior percentual dos genótipos desfavoráveis  $\Delta G/T/T$  (58%) e  $T/T/T/T$  (21,13%) nos pacientes com infecção HCV comparado aos controles em que os genótipos protetores apresentaram maior frequência, diferente do encontrado em estudo prévio (OCHI, et al., 2014) com maior percentual do genótipo protetor  $T/T/T/T$  (66%) e menor percentual do genótipo desfavorável  $\Delta G/\Delta G$  (3,5%). No estudo tailandês (AKKARATHAMRONGSIN, 2014) também encontraram frequência maior do ss469415590 do genótipo favorável  $T/T/T/T$  e menor frequência do genótipo  $\Delta G/\Delta G$  diferente do encontrado no estudo aqui apresentado. A população asiática tem os SNPs rs 12979860, rs 8099917 e ss 469415590 com os genótipos mais favoráveis o que justificaria esta distribuição genotípica (ENSEMBL GENOME BROWSER, 2015).

Interessante observar que os indivíduos com rs 12979860 os genótipos C/C, CT e T/T corresponderam aos genótipos do ss 469415590  $T/T/T/T$ ,  $T/T/\Delta G$  e  $T/T/T/T$  nos pacientes e controles. Aspecto semelhante foi observado em estudo prévio (ERICMEISSENER, 2014).

Em estudo realizado com indivíduos caucasianos com HCV-1 ou HCV-4 de seis hospitais de Madri e um da Áustria, encontraram correspondência entre os SNPs localizados no rs 12979860 e ss 469415590 na predição de RVS (REAL, et al., 2014). A frequência de genótipos benéficos para ambos os SNPs no estudo de Real (2014), foram maiores que a encontrada neste estudo com população miscigenada, porém a correspondência das frequências genotípicas entre esse SNPs foram semelhantes embora diferindo com relação a resposta terapêutica em que não houve associação dos dois SNPs com resposta virológica sustentada.

Ambos os marcadores e ss469415590 e rs12979860 estão localizados no exon1 e intron1 do gene que codifica o IFNL4, respectivamente, distantes 367 pares de bases um do outro, com maior correspondência entre Caucasianos que Africanos (PROKUNINA, 2013), porém não foi observado benefício na predição de resposta terapêutica em caucasianos (STATTERMAYER, et al., 2014).

Setecentos e cinquenta e quatro pacientes caucasianos que foram tratados com o esquema combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina, apresentaram correspondência entre os SNPs rs12979860 e rs12979860 (STATTERMAYER, et al., 2014), a semelhança dos resultados aqui apresentado, embora com distribuições das frequências genotípicas diferentes.

Neste estudo paraense, foi observado frequência maior dos genótipos  $\Delta G/\Delta G$ , e do  $\Delta G/T/T$  em comparação com o estudo de (STATTERMAYER, et al., 2014), assim como menor frequência do genótipo  $T/T/T/T$  ou seja, a população miscigenada aqui estudada, foi menos favorecida geneticamente. A diferença nestes dois estudos está na população estudada, a paraense é miscigenada e a população estudada por Stattermayer é predominantemente caucasiana podendo justificar as diferenças aqui encontradas.

As frequências dos rs12979860 genótipo CT e T/T, rs8099917 genótipo G/G e G/T e rs469415590 genótipo T/T/T/T, foram maiores no grupo de pacientes com infecção crônica HCV quando comparado com os controles demonstrando susceptibilidade a infecção HCV, aspecto semelhante foi encontrado em estudo realizado no Japão (OCHI, et al., 2014).

Foi encontrado desequilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) no grupo de pacientes com infecção crônica HCV, mas não nos controles em relação aos SNPs estudados (IL28B rs 12979860, IFNL4 rs 3682344815) e tendência ao desequilíbrio com o SNP rs 8099917. Em estudo Japonês foi observado desequilíbrio não significativo ou nos pacientes com HCV ou nos controles saudáveis para qualquer dos SNPs (OCHI et al., 2014).

Weinberg em 1908 escreveu seu importante artigo sobre a Lei de Weinberg que ficou esquecida por muitos anos, e em 1988 foi editado com o título relacionando há oitenta anos sobre os primórdios da genética populacional. Se as gerações passam sem que ocorram mudanças, ou seja, sem que ocorram mutações, migrações ou seleções, as quantidades dos genótipos nas populações não mudariam seria quase tautológico, e neste caso ocorreria o equilíbrio pela lei de Hardy-Weinberg (CROW, DOVE, 1988).

Quais os fatores preditores de RVS foram encontrados em pacientes com HCV-1 tratados com o esquema combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina?

O presente estudo foi concordante com aspectos já descritos na literatura em relação aos fatores preditores de RVS em pacientes que receberam o tratamento com a combinação PR. A idade < 45 anos, gênero feminino, HCV-2 e HCV-3, níveis de Plaquetas  $\geq 150 \times 10^4$  /mm<sup>3</sup>, RNA HCV < 600.000UI/ml, estágio de fibrose leve a moderado (F1, F2) (RAUCH, et al., 2010, THOMPSON, et al., 2010, McHUTCHISON, et al., 2009, EASL, 2009, AFDHAL, et al., 2012).

Diferente do encontrado no estudo aqui apresentado, não houve associação significativa de resposta terapêutica com gênero, idade ou níveis de aminotransferases em estudo feito na Bahia (CAVALCANTE, et al 2012).

Menor nível de RNA-HCV, menor estágio de fibrose hepática, rs 8099917 alelo G e gênero feminino, foram associados com resposta terapêutica quando comparado com não resposta ao tratamento (TANAKA, et al., 2009).

Neste estudo foi encontrado o rs 8099917 genótipo T/T como preditor de RVS em pacientes com HCV-1. São várias as publicações sobre associações dos polimorfismos da IL-28B rs 12979860 e rs8099917 com a RVS, e estão relacionados com os seus genótipos protetores C/C e T/T, respectivamente (TANAKA, et al, 2009, SUPPIAH, et al., 2009, THOMAS, et al 2009, GE et al., 2009).

Em análise de modelo de regressão logística simples, foram encontrados no presente estudo, os genótipos G/G e G/T como fator preditivo de falha terapêutica entre os polimorfismos da IL-28B e do IFNL4 analisados. O grupo de Tanaka identificou forte associação do rs8099917 alelo G com falha terapêutica (TANAKA et al, 2009). Associação do rs12979860 genótipo C/C com RVS e o CT e T/T com falha terapêutica foi encontrado no estudo realizado na região Nordeste do Brasil (CAVALCANTE et al., 2012). Observamos que dentro do mesmo país encontramos diferenças, já que no presente estudo foi encontrado associação do rs 8099917 genótipo T/T com RVS mas não com o rs12979860.

Em avaliação de 280 indivíduos caucasianos com infecção crônica HCV tratados com a combinação PR, foi encontrada associação da RVS com o polimorfismo do IFNL4 ss 469415590 alelo selvagem T/T com OR de 7.25 IC 95%1.91–27.51 (COVOLO L, et al., 2014).

O alelo principal do ss469415590 T/T/T/T, desempenhou um papel importante na resposta ao tratamento com a combinação de Interferon Peguilado e Ribavirina associado ou não com drogas antivirais de ação direta (DAAs) em paciente HCV-1 (MIYAMURA et al, 2014).

Avaliando os estágios de fibrose hepática como fator de predição para a falha terapêutica foi encontrado odds ratio de 3.5 para F3-F4, bem maior que o encontrado no estudo de Afdhl et al que encontrou odds ratio de 2.7 (LAI; AFDHAL, 2012).

A estimação probabilística de resposta virológica sustentada em pacientes com infecção crônica HCV-1 tratados com esquema combinado de Interferon Peguilado com Ribavirina, por teste de Regressão logística Múltipla, favorece deteCTar o indivíduo que terá mais ou menos chance de resposta terapêutica se reunir bons ou péssimos fatores preditores de RVS.

Os polimorfismos da IL28B rs 1297960 C/C, CT, T/T; rs 8099917 – T/T, T/G, G/G, polimorfismo do IFNL4 ss 469415590  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ , T/T/T/T mostraram associação com estágio de fibrose hepática, níveis de ALT e RNA-HCV UI/ml?

A história natural da infecção HCV mostra que alguns indivíduos permanecem por longos períodos sem evoluir nos estágios de fibrose e outros evoluem para estágios avançado e mesmo cirrose com suas complicações (HAJARIZADEH , et al., 2013).

São vários os fatores que podem contribuir para a evolução da fibrose hepática e entre eles são descritos: a ingestão de álcool, esteato hepatite, coinfeção com outros vírus, Diabetes melitus tipo 2 (COELHO, VILLELA-NOGUEIRA, 2010).

O polimorfismo da IL-28B tem sido implicado na progressão da fibrose hepática (MATSURA, et al, 2014). Neste estudo aqui apresentado foi observada associação de maior estágio de fibrose com o rs8099917 genótipos G/G e G/T. Em estudo de (NOUREDDIN et al., 2014) usando o modelo METAVIR, indivíduos com o rs 12979860 genótipo C/C apresentaram menor estágio de fibrose pelo escore Ishak comparados ao CT e T/T, mas não fazem referência quanto a associação como rs8099917, neste mesmo estudo foi observada associação do rs 12979860 genótipo C/C com grande necroinflamação hepática, altos níveis de ALT, sugerindo acentuada resposta imune, sem aumentar a fibrose hepática.

Em abordagem sobre a expressão de mi RNA 122 e polimorfismo do IFNL3 (IL-28B) em 133 pacientes com infecção crônica HCV, observaram que os pacientes que portavam o genótipo CT e T/T apresentaram maior escore de fibrose com menor expressão do micro RNA (ESTRABAUD et al., 2014).

O rs 12979860 genótipo C/C parece estar associado ao efeito protetor contra a fibrose hepática avançada e encontrada associação do rs 12979860 genótipo C/C com acentuado risco de fibrose hepática (SATO, 2014) sem associação com o polimorfismo dos genes da IL-28B rs 8099917.

Em população asiática foi encontrada associação de mais altos níveis de ALT nos pacientes com o rs 12979860 genótipo C/C (AKKARATHAMRONGSIN , et al., 2014).

Entre os pacientes com rs469415590 genótipo T/T/T/T não foi encontrada associação entre esses dois SNPs com níveis de RNA-HCV ou estágio de fibrose (AKKARATHAMRONGSIN, et al., 2014).

O polimorfismo da Interferon lambda 3 (IL-28B) rs 12979860 genótipo CT e T/T foi associado com estágios avançados de fibrose hepática (CHANG et al., 2015). Baseado em análise de regressão logística, o rs 12979860 genótipo T/T foi associado com predição de alto escore de fibrose hepática (FALLETI et al, 2011).

Neste estudo foram encontradas associações dos níveis mais altos de RNA-HCV com os genótipos protetores dos rs12979860, rs469415590 C/C e T/T/T/T, respectivamente,

porém não foi observada esta associação em outro estudo (COVOLO, et al., 2014). Em outra publicação níveis mais elevados de RNA-HCV foram encontrados em pacientes com rs 12979860 genótipo C/C comparado ao genótipo CT e T/T com odds ratio de 2.13 com IC95%, 1.24-3.66 (LAI; AFDHAL, 2012).

Não foi encontrada na literatura consultada a associação entre níveis de RNA-HCV e o polimorfismo do IFNL-4 genótipo T/T/T/T.

Como já citado anteriormente (PROKUNINA, et al., 2013), é descrito correspondência entre o rs12979860 e o ss469415590, portanto poderia ser explicado os níveis mais elevados de RNA-HCV nos pacientes com polimorfismo do IFNL4 já que o genótipo protetor do ss469415590, correspondeu ao genótipo protetor do rs 12979860.

O primeiro estudo de associação ampla de genoma humano (GWAS) sobre polimorfismo da IL-28B rs 12979860, encontrou um aspecto considerado como paradoxo, já que as mais altas cargas virais foram associadas com o genótipo C/C e este, é considerado fator preditivo de RVS assim como as baixas cargas virais. É especulado que os genes estimulados pelo Interferon (ISGS) poderia ser modulados pelo interferon peguilado e que o polimorfismo da IL-28B teria um papel na regulação intra hepática da expressão dos ISGS com consequências para os níveis de RNA-HCV e resposta terapêutica (GE, et al., 2009).

Em avaliação através de análise multivariada o rs 12979860 genótipo C/C foi associado com maior nível de carga viral e incluindo na análise a ancestralidade porém sem associação significativa (ULCELLINI, et al., 2012).

Quais os aspectos relevantes encontrados na avaliação das contribuições étnicas e polimorfismos estudados?

A quantidade de contribuição de ancestralidade dentro do Brasil é diferente, com predominâncias diferentes em diferentes regiões (SANTOS et al., 2013; CAVALCANTE et al., 2012). A questão da ancestralidade na maioria das vezes é abordada de forma fenotípica e em locais onde a população é miscigenada como no Brasil, fica mais difícil a comparação com os estudos prévios em populações mais homogêneas. Um painel com marcadores genéticos foi desenvolvido para identificar a estratificação em populações miscigenadas e para estimar proporções de contribuições genéticas de forma individual e global.

Em Belém ao Norte do Brasil foram encontradas as contribuições Européia 60%, Ameríndia 28% e Africana 12%, no Sul do Brasil foram encontradas as contribuições genéticas Europeia 94 %, Ameríndia 5 % e Africana 1 % (SANTOS et al,2010).



Enfatizado o quanto são grandes as diferenças nas proporções étnicas e o quanto o Brasil é etnicamente heterogêneo (MANTA F, 2013). Quanto mais a comunidade é isolada e distante das influências da colonização, maior é a participação da contribuição de ancestralidade nativa americana como encontrado em Santa Izabel do Pará e em tribo Ameríndio Terena. Quanto mais urbanizada a população, menor é a contribuição da ancestralidade nativa americana. Embora em percentual menor de contribuição de ancestralidade Européia em comparação com a região Sul do Brasil, Belém apresenta predomínio de ancestralidade Européia em um pouco mais da metade da população.

No presente estudo foram encontrados os mesmos percentuais de contribuições de ancestralidade relatados no estudo de Santos et al (2010) e diferente do encontrado no estudo realizado na Bahia (CAVALCANTE et al., 2012).

O estudo em questão mostrou que nesta população, o polimorfismo da IL-28B rs 8099917 genótipo T/T foi preditor de resposta a terapia combinada com Interferon Peguilado e Ribavirina em pacientes com infecção crônica HCV-1.

Em GWAS em população mais homogênea, foi encontrado associação do rs 8099917 genótipo T/T com RVS (SUPPIAH, et al., 2009) e em outro, foi encontrado associação do rs 12979860 genótipo C/C com RVS em população também mais homogênea (THOMPSON et al., 2010; MC/CARTHHY et al., 2010; GE et al., 2009). Em estudo com população miscigenada que foram encontrados ambos os rs 12979860 genótipo C/C e rs 8099917 genótipo T/T associados com Resposta virológica sustentada (CAVALCANTE et al., 2012).

Foram identificados maiores percentuais de contribuições étnicas Europeias e Ameríndias nos controles e nos pacientes com infecção crônica HCV, respectivamente. A contribuição de ancestralidade Européia parece desempenhar papel importante na proteção contra a infecção HCV e a contribuição Ameríndia na predisposição a infecção HCV. Não foram encontrados na literatura consultada aspectos semelhantes.

Os percentuais de contribuições étnicas Europeias e Ameríndias foram maiores nos pacientes que portavam o rs 12979860 genótipo C/C, ss469415590 genótipo T/T/T/T e o rs 12979860 genótipo CT, T/T, ss469415590 genótipo  $\Delta G/\Delta G$ ,  $\Delta G/T/T$ , respectivamente. Observado que os genótipos considerados protetores, tiveram maiores contribuições de ancestralidade Européia e os genótipos desfavoráveis apresentaram maior contribuição de ancestralidade Ameríndia. No estudo de Cavalcante (p.478, 2012), sobre Infecção crônica pelo vírus da Hepatite C em população miscigenada, usou marcadores genéticos de ancestralidade o que possibilitou comparações com o estudo aqui apresentado. Nesta

publicação, os polimorfismos da IL-28B rs 12979860 e rs 8099917, que são marcadores de resposta terapêutica na infecção HCV, são influenciados pela ancestralidade genética. Houve diferença na quantidade de contribuição genética, encontraram maior percentual de contribuição Africana seguida de Européia e Ameríndia em comparação com o estudo aqui apresentado onde foi encontrado maior percentual de contribuição étnica Européia.

Vale ressaltar, que houve diferença em relação à frequência do rs8099917 alelo G que foi bem menor (19.3%) no estudo de Cavalcante (p. 480, 2012), comparada ao estudo em questão onde foram encontrados 27,55%. A semelhança do estudo baiano, a amostra paraense mostrou associação do rs8099917 alelo G com falha terapêutica e associação do rs8099917 genótipo T/T com resposta terapêutica, porém diferente com relação ao rs12979860 genótipo C/C em que na população paraense estudada, não foi encontrada associação com resposta terapêutica.

Houve diferença com relação às contribuições genéticas de acordo com o polimorfismo dos genes da IL-28B e resposta terapêutica em pacientes HCV-1 em relação ao estudo de Cavalcante (p.483, 2012). No estudo paraense foi encontrada maior percentual de contribuição de ancestralidade africana nos pacientes portando rs 8099917 genótipo T/T associado com RVS, enquanto no estudo de Cavalcante et al foi encontrado associação com falha terapêutica.

De acordo com o projeto 1000 genomas, a frequência do rs 12979860 em todos os grupos étnicos para os alelos T é de 36% e C= 64%, nas ancestralidades Africana T= 67% e C= 33%, Americana T=40% e C=60%, leste Asiática T=8% e C=92%, Européia T=31% e C=69% e Sul Asiático T= 23% e C=77%. Com relação ao rs 8099917 em todos os grupos étnicos para os alelos T é de 87% e G= 13%, na ancestralidade Africana T é de 96% e G=4%, para Americano T=72% e G=28%, leste Asiático T=92% e G=8%, Europeu T=83% e G=17% e Sul Asiático T= 83% e G=17%.

Assim, dois estudos realizados no mesmo país com populações miscigenadas, o percentual de contribuição de ancestralidade é diferente, assim como a influência da ancestralidade no polimorfismo da IL-28B.

Por indisponibilidade de dados publicados não foi possível a comparação do polimorfismo do IFNL4 em população Brasileira estudada com marcadores genéticos de ancestralidade assim como também não foi possível fazer a comparação com os achados de maior contribuição de ancestralidade Ameríndia entre os pacientes portando rs 12979860 genótipos (C/T e T/T ) e ss469415590 genótipos ( $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/T/T$ ), e não foi possível a

comparação de maior contribuição de ancestralidade Européia entre os pacientes portando rs 12979860 genótipo C/C e ss469415590 genótipo T/T/T/T.

O rs 12979860 genótipo C/C foi encontrado com maior frequência na contribuição de ancestralidade Européia e Ameríndia mas não interferiu na RVS.

No estudo em questão, entre os polimorfismos estudados (IFNL3 e IFNL4), foi encontrado somente associação do rs 8099917 genótipo T/T com maior resposta virológica sustentada na contribuição de ancestralidade Africana. Os genótipos favoráveis dos polimorfismos estudados em indivíduos com maior percentual de contribuição de ancestralidade Européia e os genótipos desfavoráveis dos polimorfismos estudados com maior percentual de contribuição de ancestralidade Ameríndia, não foi preditor de resposta terapêutica.

A frequência do rs12979860 genótipo C/C se mostrou significativamente mais elevado na população argentina que nos bolivianos, peruanos ou paraguaios, demonstrando influencia étnica na frequência do genótipo C/C (J Trinks et al., 2014).

Como existe um único estudo sobre infecção HCV realizado na Bahia usando marcadores genéticos de ancestralidade e estudando polimorfismo da IL-28B em população miscigenada, os resultados aqui apresentados estão sendo comparados com este estudo (CAVALCANTE et al., 2012). Neste, entre pacientes com infecção crônica HCV-1 com rs 8099917 genótipo T/T, a contribuição Africana foi maior em pacientes com falha terapêutica e a ancestralidade Européia e Ameríndia foi maior no grupo de respondedores ao tratamento (CAVALCANTE, et al, 2012). Mesmo dentro do Brasil estamos encontrando diferentes perfis de RVS de acordo com as contribuições genéticas de ancestralidade. Ressaltando que o polimorfismo da IL-28 B rs 8099917 foi influenciado pela contribuição da ancestralidade Ameríndia. O grupo de Prokunina (p.3, 2013) avaliou resposta ao tratamento com a combinação Interferon Peguilado e Ribavirina em dois grupos étnicos: população de Europeu-americano, Afro-americano e população de Europeu-americano e Afro-americano tendo encontrado diferenças nas taxas de resposta virológica sustentada entre os indivíduos estudados, demonstrando que o aspecto racial influencia na resposta terapêutica.

Houve correspondência entre o rs 12979860 e o ss469415596 em relação ao maior percentual na contribuição de ancestralidade Européia e Ameríndia sem interferência na resposta virológica sustentada. Este achado não foi encontrado em literatura pesquisada em população miscigenada avaliada por marcadores genéticos. Em estudo comparando os polimorfismos do IFNL4 e IFNL3 em pacientes tratados com o esquema combinado de Interferon Peguilado e Ribavirina, embora tenham encontrado forte correlação do IFNL4 com

o rs 12979860, não encontraram vantagem em prever resposta ao tratamento em pacientes caucasianos e moderada correlação com o rs 8099917 (STÄRT/TERMAYER, et al., 2014). No estudo em questão, a população estudada foi miscigenada e não homogênea como a observada por STÄTTERMAYER, porém foi encontrado correspondência entre os dois SNPs ( ss469415590 e rs 12979860) mas não com o rs 8099917.

Os estudos em que são apresentadas correspondências entre o rs 12979860 e ss469415590 foram feitos em populações homogêneas sendo bem correlacionadas em Asiáticos e Europeus, entretanto em Africanos esta associação é apenas moderada (PROKUNINA, et al, 2013, COVOLO, et al, 2014, STÄTTERMAYER, et al., 2013). A associação da IL-28B rs 8099917 e IFNL4 ss469415590 foi encontrada mais alta em população Asiática, moderada em Europeus e mais baixa em Africanos (PROKUNINA, et al., 2013).

Foram encontradas associações genóticas dos rs12979860 e ss469415590 com parâmetros clínicos, níveis basais de ALT foram mais elevados em pacientes da Tailândia com rs12979860C/C comparado aos pacientes com genótipo não-C/C assim como aspecto similar encontrado nos pacientes com ss469415590 genótipo T/T/T/T comparado com aqueles pacientes não-T/T/T/T. Neste mesmo estudo, não foi encontrado diferença significativa nos níveis basais de RNA-HCV entre indivíduos com rs12979860 genótipo C/C e não-C/C e de forma similar não foi encontrado diferença significativa entre indivíduos com ss469415590 genótipo T/T/T/T com aqueles não-T/T/T/T e também não apresentaram correlação com estágios avançados de fibrose hepática (AKKARATHAMRONGSIN, et al., 2014). Neste estudo aqui apresentado, diferente por se tratar de população miscigenada, foram encontrados aspectos similares entre os rs 12979860 genótipos protetores C/C vs não-C/C e ss 469415590 T/T/T/T vs não-T/T/T/T com alguns aspectos aqui relacionados como: os níveis de RNA-HCV, estágio de fibrose, Resposta terapêutica, contribuição de ancestralidade genética de acordo com o polimorfismo da IL-28B e correspondências entre os genótipos entre pacientes com infecção HCV e controles.

Muitos fatores podem influenciar a resposta terapêutica da infecção HCV com o esquema combinado de Interferon Peguilado, e que a ancestralidade genética não influencia isoladamente na resposta terapêutica ou nos níveis de RNA HCV ou em estágios de fibrose mas podem ser influenciados pelos genótipos (IL-28B, IFNL4).

## 11 CONCLUSÕES

A contribuição da ancestralidade **Européia** foi mais frequente na população estudada.

Foi encontrada frequência alta do **alelo G** em rs 8099917 da IL-28B nesta população.

Maior frequência alélica protetora nos controles

Maior frequência de genótipos considerados desfavoráveis nos indivíduos com infecção HCV.

O rs 8099917 genótipo **T/T** se associou com **RVS** e os genótipo (**G/G** e **G/T**) com falha terapêutica.

O rs 8099917 genótipos (**G/G** e **G/T**) se associaram com estágios mais avançados de fibrose hepática (**F3** e **F4**) e o rs 12979860 **C/C** se associou com atividade histológica moderada (A2).

A somatória de três fatores considerados favoráveis a RVS apresentaram probabilidade de resposta de **88.21%** e o inverso destes parâmetros a estimativa foi de **13.11%**.

A **RVS** foi maior em indivíduos com maior percentual de contribuição de ancestralidade Africana portando o rs8099917 genótipo **T/T**.

Os polimorfismos nos genes da IL-28B **rs12979860** e nos genes do IFNL4 **ss469415590** apresentaram correspondência genotípica.

O gênero **feminino**, **Idade** > 45 anos, níveis de **RNA-HCV** < 600.000UI/ml, estágio de fibrose hepática (**F1** e **F2**) e rs8099917 genótipo **T/T**, níveis de Plaquetas  $\geq 150 \times 10^4/\text{mm}^3$  foram preditores de resposta terapêutica.

**As contribuições de ancestralidade** isoladamente **não** foram relacionadas com **RVS**.

Maior contribuição de ancestralidade **Ameríndia** no grupo de indivíduos com **infecção HCV** e a contribuição de ancestralidade **Européia nos controles**.

Maior contribuição de ancestralidade **Ameríndia** nos genótipos de susceptibilidade **rs -860 (TT e CT)** e **ss -590  $\Delta G/\Delta G$  e  $\Delta G/TT$** .

Maior contribuição de ancestralidade **Européia** nos genótipos protetores **rs-860 CC** e **ss-590 TT/TT**.

**Maiores níveis de RNA HCV** nos pacientes com genótipos protetores **rs-860 CC** e **ss-590 TT/TT**.

## 12 REFERÊNCIAS

1. ANDRIULLI, A.; MANGIA, A.; IACOBELLIS, A., IPPOLITO, A., LEANDRO, G., ZEUZEM, S. Meta-analysis: the outcome of anti-viral therapy in HCV genotype 2 and genotype 3 infected patients with chronic hepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v.28, p. 397-404, 2008.
2. AKKARATHAMRONGSIN, S., et al. IFNL3 (IL28B) and IFNL4 polymorphisms are associated with treatment response in Thai patients infected with HCV genotype 1, but not with genotypes 3 and 6. **Journal of Medical Virology**, v. 86, p. 1482–1490, 2014.
3. ALTER, M.J. Hepatitis C virus infection in the United State. **Journal of Hepatology**, v.31, p.88-91, 1999.
4. ANTONELLI, G. et al. Twenty-five years of type I interferon-based treatment: a critical analysis of its therapeutic use. **Cytokine Growth Factor Rev**,v.26,p.121-31,2015.
5. AASLD HCV Guidance Panel.Hepatitis C Guidance: AASLD-IDS Recommendations for Testing, Managing, and Treating Adults Infected With Hepatitis C Virus. **Hepatology**, vol. 62, p. 932-053, 2015.
6. ANDRÉ, P. *et al.* Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. **J Virol**,v.76,p.6919-28,2015.
7. ASSELAH, T. Genetic polymorphism and response to treatment in chronic hepatitis C: The future of personalized medicine. **Journal of Hepatology**.vol.52,p.452-454,2010.
8. \_\_\_\_\_, MARCELLIN P. New direct-acting antivirals' combination for the treatment of chronic hepatitis C. **Liver Int**,v.31p.68-77,2011.
9. BARRET/T, L.; GRANT, M. Brothers in harm: Immunological and clinical implications of coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. **Clinical and Applied Immunology Reviews**. v.2, p.93-114, 2002.
10. BALLAGOPAL, A.; THOMAS, D.; CHLOE, T. IL 28B and the control of hepatitis C Virus infection. **Gastroenterology**,vol.139,p.1865-1876,2010.
11. BEDOSSA, P.; POYNARD, T. Na algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.24, p.289-293,1996.
12. BARTH, H. *et al.* Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulphate. **J Biol Chem**, v. 278,p.41003-41012,2003.
13. BRASIL, Ministério da Saúde. **Recomendações para Tratamento da Co-infecção entre HIV e Hepatites Virais**. Ministério da Saúde - Coordenação Nacional de DST e

- AIDS. Programa Nacional de Hepatites Virais: Série Manuais. n. 55. Brasília: MS, 2003.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções/** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 101, p. -il, 2015.
  15. BONNARD Philippe et al. Documented rapid course of hepatic fibrosis between two biopsies in patients coinfectEd by HIV and HCV despite high CD4 cell count. **J Viral Hepat**,v.14,p.806–811, 2007.
  16. BOYER, L. **Current treatment of hepatitis C- the HIN consensus.** Sociedade Brasileira de Hapatologia - Curso de Hepatologia Clínica. Pernambuco: Ed. Universitária da UFPE, p.241-242, 2003
  17. BUCHANAN, R.; HYDES, T.; KHAKOO, S.I. Innate and adaptive genetic pathways in HCV infection. **Tissue Antigens**, v. 85, p.231-40 85, 231-240,2015.
  18. CARNEIRO, L.V. **Análise do Polimorfismo do KIR em pacientes com Hepatite Crônica C submetidos à Terapia Antiviral.** Dissertação (Mestrado em Imunologia). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.
  19. CASSINOT/TO *et al.* Liver fibrosis: noninvasive assessment with aconstic radiation force impulse elastography-comparison whith fibroscan M and XL probs and fibrotest in patients with chronic liver disease. **Radiology**,v. 269, p.283-292,2013.
  20. CAVALCANTE, L.N, *et al.* L28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver Int**,v.32,p.476-86-2012.
  21. CONNOLLY, M. *et al.* In liver fibrosis, dendritic cells govern inflammation in mice via TNF- $\alpha$ . **The Journal of Clinical Investigation**, v.119,p. 3213-25,2009.
  22. CATANESE, M.T. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus. **Virology**,p.221–233-2015.
  23. CHANG, K.C, *et al.* A polymorphism in interferon L3 is an independent risk factor for development of hepatocellular carcinoma after treatment of hepatitis C virus infection. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**,v.13,p.1017–1024,2015.
  24. CHEN MY, *et al.* Value of interleukin-28b genetic polymorphism on retreatment outcomes of chronic hepatitis c genotype 1 relapsers by peginterferon alfa plus ribavirin. **J Gastroenterol Hepatol**, v.29,p.102-9,2014.
  25. CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER A, J. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.21,p.359-62,1989.
  26. CHUANG W.L.; YU, M. Host factors determining the efficacy of hepatitis C treatment. **J Gastroenterol**, v.48,p.22-30,2013.

27. COELHO, H. S.; VILLELA-NOGUEIRA, ALVES, C. Predictors of response to chronic hepatitis C treatment. **Annals of hepatology Latin American association for the study of the liver, Practice Guidelines, diagnosis, management, and treatment of hepatitis C**, v. 19, p.54-60-,2010.
28. COVOLO, L.; et al. The novel ss469415590 variant predicts virological response to therapy in patients with chronic hepatitis C virus type 1 infection. **Aliment Pharmacol Ther**, v.39,p. 322–330,2014.
29. CRAXI, A.; CAMMA, C.; GIUNTA, M. Definition of response to antiviral therapy in hepatitis C. **Journal of Hepatology**, v.31, p.160-167, 1999.
30. CRAWFORD, J.M. **Role of immunopathology in diagnosis and therapy**. AASL, S. Francisco, 2005.
31. DÁVALOS, M. Epidemiologia de la infección por el virus de la hepatitis C en el Perú y Latinoamérica. Perú, **Rer Gastroenterol**, v.29,p.347-3,2009.
32. DAVIS G.L.; HOOFNAGLE J,H. Interferon in viral hepatitis: role in pathogenesis and treatment. **Hepatology**, v.6,p.1038-41,1986.
33. DONNELLY R.P.; KOTENKO, S.V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. **J Interferon Cytokine Res**, v.30, p.555-64, 2010.
34. DUBUISSON, J.; COSSET, F. L; Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. **Journal of Hepatology**, v.61,p.13,2014.
35. ECHEVERRÍA, N.; MORATORIO, G.; MORENO, J. C. Hepatitis C virus genetic variability and evolution. **World journal of hepatol**,v.7,p. 831-45,2015.
36. EASL. Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2015. **Journal of Hepatology**, p.1-20,2015.
37. EGLI, A.; SANTER, D. M.; O’SHE, D. *et al*. The impact of the interferon-lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. **Emerging Microbes and Infections**, v.3, p. 1-12,2014,2014.
38. ENSEMBLGENOME BROWSER78:Homosapiens-populationgenetics rs8099917(SNP).Disponível em:<[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39742665-v=rs8099917;vdb=variation;vf=5779622](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39742665-v=rs8099917;vdb=variation;vf=5779622). Acesso em: 22 mai. 2015
39. ESTRABAUD, E, et al. Reduction of MicroRNA 122 Expression in IFNL3 CT/T/T Carriers and during Progression of Fibrosis in Patients with Chronic Hepatitis C. **Journal of Virology**,v.88, p. 6394–6402,2014.
40. MEISSNER, E. G.; BON, D.; PROKUNINA-OLSSON, L.; *et al*. IFNL4-ΔG Genotype Is Associated With Slower Viral Clearance in Hepatitis C, Genotype-1 Patients Treated With Sofosbuvir and Ribavirin. **J Infect Dis**, v.209,p.1700-1704,2014.



41. FALLETI, E. *et al.* Role of interleukin 28B rs12979860 CT polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis C: relationship with gender and viral genotype. **J Clin Immunol**, 2011, 31:891–899.
42. FONSECA, J. C. F.; BRASIL, L. M. Infecção pelo vírus da hepatite C na região Amazônica brasileira. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical. Hepatologia Tropical**, v. 37, p.1-8,2004.
43. FRIED, M.; *et al.* Rapid virological response is the most important prediCTor of sustained virological response across genotypes in patients with chronic hepatitis C virus infection. **J Hepatol**, vol. 55, p.69-75,2011.
44. FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**,v.134, p.1655-69, 2008.
45. FUKUSHI, S. *et al.* Ribosomal Protein S5 Interacts with the Internal Ribosomal Entry Site of Hepatitis C Virus. **J Biol Chem**,v.276, p.2824-6, 2001.
46. GE, D. *et al.* Genetic variation in IL-28B predict hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, vol.461, p.399-401,2009.
47. GONZALEZ, S. A.; TALAL, A. H. Hepatitis C Virus in Human Immunodeficiency Virus-infected Individuals: An Emerging Comorbidity with Significant Implications. **Seminars in Liver Disease**, v.23, n.2, p.149-166, 2003.
48. GHANY, M., *et al.* AASLD Practice Guidelines. Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C: Um Update. **Hepatology**, v. 49, p.418-43, 2009.
49. HADZIANNIS, S. *et al.* Peginterferon-alfa2a and riavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribaviin dose. **Ann. Intern.Med**,v.140, p.346-355, 2004..
50. HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G.J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**,vol.10; p.553-562, 2013.
51. HANAFIAH, *et al.* Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. **Hepatology**,v.57:1333-1342, 2013.
52. HELLER, T. *et al.* An in vitro model of hepatitis C virion production. **Proc Natl Acad Sci USA**,v.102, p.2579-83, 2005.
53. HEPATITIS C TREATMENT: The Data Flood Goes on-An Update From the Liver Meeting, 2014 **Gastroenterology**, v. 148:468-479,2015.
54. IKEJIMA, K., *et al.* Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. **J Gastroenterol Hepatol**,v.22,p.87-92,2007.
55. JINUSHI, M., *et al.* Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell aCTivation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. **J. Immunol**,v.170, p.1249-1256, 2003.

56. KNAPP, S, et al. A Polymorphism in IL28B Distinguishes Exposed, Uninfected Individuals From Spontaneous Resolvers of HCV Infection. **Gastroenterology**, v.141,n.1, p: 320 – 325,2011.
57. LAU-CORONA, D.; KERSHENOBICH, D.; GUTIERREZ-REYES, G. The impact of genetic variability on liver disease in the Hispanic/Latin-American population **Autoimmunity**,v. 44, p. 549-554, 2011.
58. LINDENBACH, B.; RICE, C. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. **Nature**, v. 36,p. 933-938,2005.
59. KAVADA, N. Evolution of hepatic fibrosis research. **Hepatology research**, v.41 p.199-208,2011.
60. KOTENKO, S. *et al.* IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**, vol.4,p.69-77,2003.
61. DONNELLY, R.P; KOTENKO, S. V. Interferon-lambda: a new addition to an old family. **J Interferon Cytokine Res**, v.30, p.555-64, 2010.
62. LAI, M.; AFDHAL, N.H. Clinical utility of interleukin-28B testing in patients with genotype 1. **Hepatology**, v. 56, n.1, p.367-72, 2012.
63. LAYDEN-ALMER, J.E.; LAYDEN, T.J. Viral Kinetics in Hepatitis C Virus: Special Patient Populations. **Seminars in Liver Disease**. v.23, p.29-33, 2003.
64. MANTA, F.S.N.; PEREIRA, R., VIANNA, R. *et al.* Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLOS ONE**, v.8, n.9, p.1-11, 2013.
65. MC/CARTHY, J. J.; LI, J.H.; THOMPSON, A., *et al.* Replicated Association Between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. **Gastroenterology**, v.138,p.2307-14, 2010.
66. McHUTCHISON, J.G; *et al.* Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis infection. **N Engl J Med**, v.361, p. 580-93, 2009.
67. MESSINA, J.P.; HUMPHREYS, I; FLAXMAN, A. *et al.* Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**, v. 61p.77-87, 2015.
68. MIYAMURA T, et al.. IFNL4 ss469415590 Variant Is Associated with Treatment Response in Japanese HCV Genotype 1 Infected Individuals Treated with IFN-Including Regimens. **Int J Hepatol**, article ID 723868,p. 1-6, 2014.
69. MOHAMMED, E. *et al.* **Nat Commun**, v.5,p.1-10,2015
70. MONTES-CANO, M.A, *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. **Hepatology**, v. 52, p.33-37,2010.
71. UC/CELLINI, L.; TSENG, F.C.; MONACO, A. *et al.* HCV RNA Levels in a Multi-Ethnic Cohort of Injection Drug Users: Human Genetic, Viral and Demographic Associations.**Hepatology**,v.56, p.86-94, 2012.

72. NEUMANN-HAEFILIN, C. *et al.* T cell response in hepatitis C virus infection. **Journal of Clinical Virology**. v.32, p.75-85, 2005.
73. NIH-NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENT: MANAGEMENT OF HEPATITIS C 2002. **Gastroenterology**. v.123, n.6, p.2082-2099. 2002.
74. NOUREDDIN, M.; *et al.* Association of IL28B Genotype with Fibrosis Progression and Clinical Outcomes in Patients with Chronic Hepatitis C: A Longitudinal Analysis. **Hepatology**, v.58, p. 1548-1557, 2013.
75. OCHI, H.; MIKI, D.; HAYES C.N. *et al.* IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. **J Gen Virol**, v.95p.1297-306, 2014.
76. O'BRIEN T.R. Interferon- $\alpha$ , interferon- $\lambda$  and hepatitis C. **Nat Genet**,v.41,p.1048-50, 2009.
77. O'FARRELLY, C; GOLDEN-MASON, L.; HEGART, J.E. Systemic and regional roles for innate immune mechanisms in the liver: pathological significance and potential therapeutic targets. AASLD Moscone West Convention Center, San Francisco, California.
78. PATEL, K.; BEDOSSA, P.; CASTERA, L. Diagnosis of liver fibrosis: present and future. **Semin Liver Dis**, v.35,p.166-83,2015.
79. PAWLOTSKI, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **TRENDS in Microbiology**, v.12, n. 2, p. 96-102, 2004.
80. \_\_\_\_\_. What are the pros and cons of the use of host-targeted agents against hepatitis C? **Antiviral Research**, v.105,p: 22–25, 2014.
81. \_\_\_\_\_. New Hepatitis C Therapies: The Toolbox, Strategies, and Challenges. **Gastroenterology**, v.146 n.5,p:1176-92, 2014.
82. \_\_\_\_\_. Hepatitis C Treatment: The Data Flood Goes on—An Update From the Liver Meeting 2014. **Gastroenterology**, v.148,n.3, p:468-79, 2015.
83. PEIFFER, K.H, *et al.* IFN lambda 4 genotypes and resistance-associated variants in HCV genotype 1 and 3 infected patients. **Hepatology**, v.25. 2015.
84. PENIN, F., *et al.* Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**,v.39:p.5-19. 2004.
85. POOLE, T. *et al.* Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. **Virology**,v.206, p.750–754.1995.
86. PELLICORO, A., *et al.* Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nat Rev Immunol** ,v.14,p.181-194, 201, 2014
87. PETERS, M. Mechanisms of action of interferons. **Sem Liv Dis**,v.9, p.235,1989.

88. PILERI, P, *et al.* binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**,v.282 (5390):p.938-941, 1998.
89. POORDAD, F.; KHUNGAR, V. Emerging therapeutic options in hepatitis C virus infection. **Am J Manag Care**, v.17,p.123-30,2011.
90. POYNARD, T. *et al.* Biomarkers as non-invasive assessment of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C. **J. Gastroenterol. Hepatol**, v.19,p.236-45,2004.
91. POL, S.; BRÉCHOT, C. **Treatment of chronic hepatitis C**. Fundação de Estudo das Doenças do Fígado Koutoulas-Ribeiro. Colectanea Symposium: Hepatologia no próximo milênio. 1.ed. São Paulo: Frôntis. p.115-134, , 2000.
92. PREMKUMAR, A.; WILSON, L.; EWART, G.D; Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. **FEBS LETT**,v.16; 557(1-3):99-103, 2004.
93. PROKUNINA, L. *et al.* A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. **Nat Genet**, v. 45, p.164-171, 2013.
94. RAUCH, A. *et al.* Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterol**,v.138,p.1338-45, 2010.
95. REAL, L.M. *et al.* IFNL4 ss469415590 variant shows similar performace to rs 12979860 as predictor of response to treatment against hepatitis C virus genotype 1 or 4 in Caucasians. **PLOS ONE**, v. 9, 95515.
96. RIVA, E, *et al.* Hepatitis C virus and interferon type III(interferon lambda 3/interleukin-28B and interferon lambda 4: genetic basis of susceptibility to infection and response to antiviral treatment. **Clin Microbiol Infect**, v.20,n.12,p.1237-45, 2014.
97. ROBERTSON, B. *et al.* Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C vírus (HCV) and related vírus: proposals for standardization. **Arch Virol**, 143/12, 1998.
98. ROMA, M.; POZZI, E.S. Oxidative stress: A radical way to stop making bile. **Annals of Hepatology**,v.1,p.16-33,2008.
99. SAMUEL, C. Antiviral actions of interferons. **Clin Microbil Rev**,v.14,p.778-809,2001.
100. SANTOS, N.P.; RIBEIRO-RODRIGUES, E.M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K; *et al.* Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Hum Mutat**,v45,p.184-90,2010.
101. SCARSELLI, E. *et al.* The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **EMBO J**, v.p.5017-25, 2002.

102. SIMMONDS, P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. **Journal of Hepatology**, v.31, p.54-60, 1999.
103. SIMMONDS, P, *et al.* Consensus Proposals for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology**,v.42, p.962- 973, 2005.
104. STÄTTERMAYER, A.F, *et al.* Polymorphisms of interferon- $\lambda$ 4 and IL28B – effects on treatment response to interferon/ribavirin in patients with chronic hepatitis C. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**,v. 39, p.104–111, 2014.
105. STRADER, D. *et al.* Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. **Hepatology**, v.39, p.1147-71,2004.
106. SUPPIAH, V. *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy. **Nature Genetics**, v.41, p.1100-04,2009.
107. TANAKA, Y. *et al.* lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. **Hepatol Res**, v.40, p.449-60, 2010.
108. TANAKA, Y. *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- $\alpha$  and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature Genetics**, v. 41,p.1105-10, 2009.
109. TAYLOR, D.; SHI, S.; LAI, M. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes and infection**,v.2,p.1743-56,2000.
110. TE, H.S.; JENSEN, D. Epidemiology of Hepatitis B and C viruses: A Global overview. **Clin Liv Dis**, v.14, p.1-2, 2010.
111. TELLINGHUISEN, T. *et al.* Studying Hepatitis C virus: Marking the best of bad virus. **J virol**,v.81,p.8853-67,2007.
112. THI, C,L; THOMA, D,L. Interleukin-28b: a Key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. **Gastroenterol**, v.138,p.1240-3, 2010.
113. THIMME, R.; SPANGENBERG, H.C.; BLUM, H.E. Hepatitis B or C and human immunodeficiency virus infection. **Journal of Hepatology**, v.42, 2005.
114. THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBWE, F. A target on the move: innate and adaptative immune escape strategies of hepatitis C virus. **Antiviral Res**, v.69, p.129-41, 2006.
115. THOMAS DL, *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v 461, 2009.
116. THOMPSON, A. *et al.* Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. **Gastroenterology**, v.139, p.120-9, 2010.
117. TRAUTWEIN, C. *et al.* Hepatic fibrosis: Concept to treatment. **Journal of Hepatology**, v. 62,p.S15–S24, 2015.

118. TRINKS, J, et al. Distribution of genetic polymorphisms associated with hepatitis C virus (HCV) antiviral response in a multiethnic and admixed population. **The pharmacogenomics Journal**, v.14,p. 549-554, 2015.
119. UC/CELLINI, L. *et al.* HCV RNA levels in a multiethnic cohort of injection drug users: **Hepatology** , v.56, p.86-94, 2012.
120. VASCONCELOS, J.M, *et al.* Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil . **Genetics and Molecular Biology**,v.36, p. 22-27, 2013.
121. VIEIRA, A.M, *et al.* Hepatite C: Casuística da Consulta de Hepatologia de um Hospital Distrital. **J Port Gastreterol**, v.14, p.134-140, 2007.
122. XU, Z. *et al.* Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. **EMBO J**, v.20,p.3840-3848, 2001.
123. WOJCIK, G.L. *et al.* Admixture analysis of spontaneous hepatitis C virus clearance in individuals of African descent. **Genes Immun**,v.15,p.241-6, 2014.
124. WIEGAND, J. *et al.* Importance of minimal residual viremia for relapse prediction in patients with chronic hepatitis C genotype 1 infection. **Clin infect dis**, v.53,p.1111-114, 2011.
125. WEILAND, O. Treatment of naive patients with chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**. v.31,p.168-173, 1999.
126. WIESCH, S.Z. *et al.* The proteins of the hepatitis C virus: Their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. **Arch Virol**, v.148, p.1247-1267,2003.

## 13 APÊNDICES

### APÊNDICE A



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ  
 FUNDAÇÃO SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DO PARÁ  
 DIRETORIA DE ENSINO E PESQUISA  
 GERÊNCIA DE PESQUISA  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



#### TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará analisou no dia 25 de outubro de 2011 o Projeto de Pesquisa intitulado **“RESPOSTA AO TRATAMENTO CLÍNICO ANTIVIRAL DA HEPATITE C CRÔNICA: FATORES PREDITIVOS DE RESPOSTA TERAPÊUTICA”** de **CAAE-0108.0.440.072-11** e protocolo nº. **133/11-CEP**, sob responsabilidade de Ivanete do Socorro Abraçado Amaral, obtendo **APROVAÇÃO** com autorização para desenvolvê-lo nesta Instituição.

Belém, 25 de outubro de 2011.

Informamos ainda, que V. S. deverá apresentar relatório semestral (previsto para 31/12/2011), anual e/ ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto (item VII. 13.d. da Resolução nº 196/96 – CNS / MS).

  
 Mara Lucinda Gonçalves do Amaral  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa / FSCMPA

## 14 ANEXOS

### ANEXO A

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Durante a leitura do documento abaixo, fui informado (a) que posso interromper para fazer qualquer pergunta com o objetivo de tirar minhas dúvidas e ter melhor esclarecimento.

Se necessário, levarei para casa para leitura mais detalhada antes de assinar.

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto: A influência dos polimorfismos nos genes dos Interferons Lambda 3 E Lambda 4 e ancestralidade genética na infecção pelo vírus da hepatite C e resposta ao TRATAMENTO EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA DE BELÉM-PARÁ-BRASIL, sob a orientação do Prof. Dr Juarez Antonio Simões Quaresma e do Prof. Dr, Eduardo José Melo dos Santos, o qual envolve o ambulatório de Fígado da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, Departamento de Patologia do Hospital Universitário João de Barros Barreto (Dra. Marialva Araujo e Dra. Sâmia Demackie, Instituto Evandro Chagas (Dr. Manoel Soares) e Laboratório de Genética da Universidade Federal do Pará (Dr. Eduardo Santos) .

O objetivo geral do projeto é descrever os resultados do tratamento para a hepatite C e fatores que possam estar interferindo em sua resposta. Durante a pesquisa, um membro da equipe coletará os meus dados pessoais e amostra de sangue para a realização de exames laboratoriais quando necessário. A retirada de sangue da veia será feita com material inteiramente descartável. Em caso de exame de biópsia de fígado, exame exigido pelo MS para indicação de tratamento, obedecerá aos critérios de indicação e contra-indicação para este exame que será realizado com toda segurança com risco mínimo para o paciente. Esses materiais (sangue, fragmento da biópsia do fígado) terão apenas a finalidade de pesquisa clínica, sendo identificado, somente com um código. Terei o direito de saber os resultados (positivos ou negativos) após a realização desta pesquisa, os quais, somente serão divulgados em revista científica, nacionais ou internacionais, documentos de trabalhos e eventos científicos. Caso não queira participar ou queira desistir do estudo, não terei prejuízo algum. Se eu aceitar e, no decorrer do estudo, surgir alguma dúvida, esta poderá ser esclarecida pessoalmente nos ambulatórios de Hepatologia da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, a partir das 07hs da manhã, ou pelo telefones: 40092211 ou 40092273.É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer



outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em segredo. Estou ciente também de que não receberei nenhuma recompensa financeira para participar desse projeto.

Fui suficientemente informado (a) a respeito das informações que ou que foram lidas para mim sobre o estudo HEPATITE C CRÔNICA: RESPOSTA AO TRATAMENTO CLÍNICO ANTIVIRAL, Eu discuti com \_\_\_\_\_ membro do Grupo do Fígado da Santa Casa) sobre minha decisão em participar deste estudo. Está claro para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de manter em segredo as informações sobre meus dados, e esclarecimentos quando surgirem dúvidas. Ficou claro também que minha participação neste estudo é isenta de despesas e que tenho direito de acesso a tratamento ambulatorial como na rotina. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido no meu atendimento neste serviço.

Nome do Paciente/Representante Legal: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data: Belém-PA \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura do Paciente/Representante Legal

Pesquisador responsável

Ivanete do Socorro abraçado Amaral

Endereço: Rua Oliveira Belo, 395,

Bairro: Umarizal. Caixa postal: 66055-380

Tel:40092264

ANEXO B

**PROJETO DOUTORADO IL-28B** IFN PEG RBV IFN convenc Bocep Telaprev FILGRAST eritrop  
**Ivanete Amaral** CodCB

pegintron Pegasys vit D registro cirrose idade TTO

nome data Nasc Data inicio trat 1º trat Retrat

sexo  mas  fem telef naturalidade Data final trat medica assistente

Celular procedencia

fone interurbano Data da investigação

etilismo passado ou recente

DM IRC cirurgia previa Coleta sangue IEC com EDTA

pos TX figado RNAHCV UI/ml pre trat Log pre trat

HAS hemofilia transfusao previa ano de transfusão F A

AFRI 48 marcadores

UEDV coinfechIVHCV TARV genotipo subtipo

EUR 48 marcadores

Indio 48 marcadores

peso altura IMC AMP outro

1 2 3 4 outro a b ab outro

0 1 2 3 4 0 1 2 3

**exames pre tratamento**

Hemacias 1 Alb1 siderose hepatica (histop) Histop Esteatose US normal

HB 1 glob 1 eritema palmar EDA normal US HP

HTC 1 TSH1 Ginecomast EDA variz US esteatose

leuc 1 T4 1 Telangiect US espleno US figado heterogen

segmentados 1 Ferritina 1 US nodulo hepat US Hepatom US figado reduzido

plaquetas 1 ferro 1

ALT 1 Ac Úrico 1 Colesterol 1 AFRI 27 marcadores

AST 1 Ureia 1 Triglicer 1 EUR 27 marcadores

FA1 Creat 1 HDL 1 Child A Child B Child C IND 27 marcadores

GGT1 AFP 1 LDL 1 MELD pre trat

BT1 insulinemia polimorfismo da IL28b APRI 1 FIB 4

tempo protrobina 1 rs12979860 rs8099917 ss469415590 deltaG/deltaG deltaG/TT ssTT/TT

Ativ Protr% 1 INR 1 Glicemia 1 HOMA 1

FIBROSCAN (Kpascal) Observações

TOTG 120' (1) Genotipo HCV (GT HCV) 1

HB glicada1 GT HCV- 2

vitamina D (1) GT HCV-3

obito

ANEXO C

Data exame semana 4  RNA HCV quantitativo 4  **SEMANA 4**

RNAHCV 4  
 positivo  
 negativo

RNA HCV 4 Log  RVR

RNA HCV baixou mais que 1log

AFP 4

TSH 4  BT 4

Leuc 4  tempo protromb 4  T4L 4  clesterol 4

AST4  Segment 4  Ativ protrom 4  GGT 4  triglicerid 4

ALT4  Plaquet 4  INR 4  FA 4

glicemia 4  Hemacias4  Albumina 4  ureia 4

Hb glicada 4  HB 4  Globulina 4  creatinina 4

nsulinemia 4  HTC 4

HOMA IR 4  ferritina 4

**SEMANA 12**

RNA HCV 12  
 positivo  
 negativo

RNA HCV 12  RNA HCV 12 Log

RVP  RVP total  
 RVP parcial

RVP  NR

leuc 12  Hemac 12  AST 12  albumina12  suspenso o tratamento

Segmentados 12  HB 12  ALT 12  globulina 12

plaquetas 12  HTC 12  FA12  BT12

Tempo protromb 12  GGT12  Ac urico 12  ureia 12

ativ protromb 12  Colesterol 12  TSH 12  creat 12

INR 12  LDL 12  T4 L 12

Ferritina 12  HDL12  Glicemia 12  HB glicada 12

Ferro 12  Trigl 12

**SEMANA 24**

leucocito 24  Hemac 24  AST 24  RV lenta

segment 24  HB 24  ALT24

Plaquetas 24  HTC 24  FA24  suspenso tratamento

glicose 24  GGT24

ac urico 24  TSH24  T4L24

Homa IR 12  ferritina24

RNA HCV 24  
 positivo  
 negativo

ANEXO D

<p>RNA HCV 48</p> <p><input type="radio"/> positivo</p> <p><input type="radio"/> negativo</p>	<p>RNA HCV 48 <input type="text"/></p>	<b>Final do tratamento</b>			
RVFT <input type="text"/>	Leuc 48 <input type="text"/>	Hemac 48 <input type="text"/>	AST 48 <input type="text"/>	TP 48 <input type="text"/>	
	segment 48 <input type="text"/>	Hb 48 <input type="text"/>	ALT 48 <input type="text"/>	AP 48 <input type="text"/>	
	Plaquetas 48 <input type="text"/>	HTC 48 <input type="text"/>	FA 48 <input type="text"/>	INR 48 <input type="text"/>	
	Ureia 48 <input type="text"/>		GGT48 <input type="text"/>	Albumina 48 <input type="text"/>	
	creatinina 48 <input type="text"/>		BT 48 <input type="text"/>	globulina 48 <input type="text"/>	
	ferro 48 <input type="text"/>		Glicemia 48 <input type="text"/>	vitam D 48 <input type="text"/>	
	ferritina 48 <input type="text"/>			Ac Urico 48 <input type="text"/>	
Colesterol 48 <input type="text"/>	TSH 48 <input type="text"/>				
LDL 48 <input type="text"/>	T4L 48 <input type="text"/>				
HDL 48 <input type="text"/>	insulinemia 48 <input type="text"/>	HOMA IR 48 <input type="text"/>	TOTG 120' 48 <input type="text"/>	APRI 48 <input type="text"/>	
Triglicer 48 <input type="text"/>					
<b>6 MESES DEPOIS</b>					
<p>RNA HCV seis meses depois</p> <p><input type="radio"/> positivo</p> <p><input type="radio"/> negativo</p>	RVS <input type="text"/>	Recidiva virológica <input type="text"/>	Leucocit 6 meses depois <input type="text"/>	segment seis meses depois <input type="text"/>	plaquetas seis meses depois <input type="text"/>
	Hemacias seis meses depois <input type="text"/>		AST seis meses depois <input type="text"/>		
	HB seis meses depois <input type="text"/>		ALT seis meses depois <input type="text"/>		
	HTC seis meses depois <input type="text"/>		GGT seis meses depois <input type="text"/>		
ferro seis meses <input type="text"/>	Ac Urico seis meses depois <input type="text"/>				
Ferritina seis meses depois <input type="text"/>	Glicemia seis meses depois <input type="text"/>		FA seis meses depois <input type="text"/>		
Colesterol seis meses depois <input type="text"/>	insulinemia seis meses depois <input type="text"/>		BT seis meses depois <input type="text"/>		
HDL seis meses depois <input type="text"/>	HB glicada <input type="text"/>		Albumina seis meses depois <input type="text"/>		
LDL seis meses depois <input type="text"/>	HOMA IR seis meses <input type="text"/>		Globulina seis meses depois <input type="text"/>		
Triglicerid seis meses depois <input type="text"/>	Ureia seis meses depois <input type="text"/>		TP seis meses depois <input type="text"/>		
TSH seis meses depois <input type="text"/>	Creatinina seis meses depois <input type="text"/>		AP seis meses depois <input type="text"/>		
T4 L seis meses depois <input type="text"/>	clearance de creatinina seis messe <input type="text"/>		INR seis meses depois <input type="text"/>		
			Efeitos adversos		
tempo protomb seis meses depois <input type="text"/>	APRI seis meses depois <input type="text"/>				
duraç trat 1ano <input type="text"/>	INDICAÇÃO DE TRANSFUSAO durante o tratamento <input type="text"/>				
duraç trat 1 ano e 6 meses <input type="text"/>	Internação durante trat <input type="text"/>				
seis meses de tratamento <input type="text"/>	Efeito Adverso dermatologico <input type="text"/>				
	obito durante o tratamento <input type="text"/>				