

RAQUEL FRANCINE LIERMANN GARCIA

PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO *GENE IL-28B*
NA POPULAÇÃO DE JOINVILLE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO
TRATAMENTO NOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C

Joinville-SC

2012

RAQUEL FRANCINE LIERMANN GARCIA

PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO *GENE IL-28B*
NA POPULAÇÃO DE JOINVILLE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO
TRATAMENTO NOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C

Dissertação apresentada como requisito final para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE.
Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho.
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

Joinville-SC

2012

TERMO DE APROVAÇÃO

“PREVALÊNCIA DOS POLIMORFISMOS RELACIONADOS AO *GENE IL-28B* NA
POPULAÇÃO DE JOINVILLE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO
TRATAMENTO NOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C”

por

Raquel Francine Liermann Garcia

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente,
área de concentração Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger
Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:

Prof. Dr Carlos Eduardo Brandão Mello

Prof. Dr. Edsom Campos
(UNIVILLE)

Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho
Orientador (UNIVILLE)

Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França
Coorientador (UNIVILLE)

Joinville, 23 de outubro de 2012

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho e que sem a colaboração de cada uma delas não teria chegado a termo, o meu mais profundo agradecimento.

Aos meus pais, Renato e Eliana e aos meus filhos, Giulia e Pietro, pelo amor, carinho e paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho e ao coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França minha eterna gratidão pelo apoio, pela confiança e pelo exemplo de pesquisadores que são.

À equipe do laboratório de Biologia Molecular pelo apoio, carinho e amizade.

A Simone Moreira, Andréia Gutberlet, Bruna Cristina Bertol e Leslie Ecker Ferreira pela dedicação e apoio.

Aos professores do curso de Mestrado em Meio Ambiente.

Aos amigos de classe por todo carinho e apoio.

Aos ilustres Hepatologistas: Angelo A. de Mattos, Cristiane Tovo, Lysandro Nader, Arnaldo J. Dominici, Carlos Eduardo Brandão-Mello e Cristiane Alves Villela-Nogueira que contribuíram para realização deste projeto com envio de amostras e dados.

E finalmente, um agradecimento eterno ao meu companheiro de trabalho, chefe de equipe, sócio, estatístico, revisor, companheiro de todos dos meus dias, pai dos meus filhos, Dr Christian Evangelista Garcia.

RESUMO

Introdução: A hepatite C (HCV) representa um problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Apesar de novas drogas, como boceprevir e telaprevir já estarem disponíveis, o tratamento ainda baseia-se em interferon peguilado (PegINF) associado a ribavirina (RBV). Sabe-se, porém que o tratamento promove apenas 50% de resposta virológica sustentada (RVS) em portadores de HCV genótipo 1. Fatores relacionados ao vírus e ao hospedeiro contribuem para esta resposta insatisfatória. Em 2009, através de ampla investigação do genoma humano (GWAS) polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados próximo ao *gene IL28B*, foram identificados e relacionados a resposta ao tratamento. Dois polimorfismos - *rs12979860* e *rs8099917* - e seus respectivos alelos - *C* e *T* - foram observados em forte associação com RVS. **Objetivos:** Identificar a prevalência das variantes genóticas decorrentes do polimorfismo *rs12979860* (*C/T*) e *rs8099917* (*T/G*) na população de Joinville (SC). Identificar a frequência destes polimorfismos em portadores de hepatite C e a relação com a resposta ao tratamento. **Metodologia:** Amostras de 199 indivíduos procedentes do HEMOSC (Joinville/SC) e 145 pacientes submetidos a tratamento, genótipo 1, e procedentes de 6 centros brasileiros foram avaliados. A genotipagem em 277 amostras (198-controles/79-HCV) consistiu em amplificação do segmento gênico via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguidos de RFLP (Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição). Os *amplicons* obtidos foram separados via eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta. Em 66 amostras (HCV) a metodologia empregada para análise dos polimorfismos foi o sequenciamento DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing for MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech®). **Resultados:** A distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos *rs12979860* e *rs8099917* mostrou diferença significativa entre grupo controle e portadores de HCV com maior proporção dos genótipos favoráveis *CC* e *TT* no grupo controle ($p=0,037$ e $p=0,046$, respectivamente) e *TT* e *GG* no grupo HCV ($p=0,0009$ e $p=0,0001$). RVS foi observada em 39% dos pacientes. O polimorfismo *rs12979860* e seu genótipo *CC* foi associado à RVS (45% vrs. 21%, $p=0,02$). Não houve relação significativa para o polimorfismo *rs8099917* e a resposta ao tratamento, mas portadores do alelo *T* apresentaram maiores taxas de RVS ($p=0,024$). **Conclusões:** Os polimorfismos *rs12979860* e *rs8099917* e seus respectivos alelos *C* e *T*, respectivamente apresentaram maior frequência no grupo controle. Este achado possivelmente confere efeito protetor à infecção ao HCV. O polimorfismo *rs12979860* e seu genótipo *CC* apresentou relação significativa com a resposta ao tratamento.

Palavras chave: Hepatite C, *IL28B*, Polimorfismos de Nucleotídeo Único, Resposta Virológica Sustentada (RVS)

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C (HCV) represents a public health problem in Brazil and worldwide. Although new drugs, like boceprevir and telaprevir are already available, the treatment is still based on pegylated interferon (PegINF) and ribavirin (RBV). It is known however, that only 50% of genotype 1 patients will achieve sustained virological response (SVR). Host and viral factors contribute to this unsatisfactory response. In 2009, through a wide investigation of the human genome (GWAS), single nucleotide polymorphisms (SNPs), located near the *IL28B* gene was identified and related to treatment response. Two polymorphisms - *rs12979860* and *rs8099917* - and their respective alleles - *C* and *T* - were observed in a strong association with therapy response. **Aims:** Identify the prevalence of *rs12979860*(C/T) and *rs8099917* (T/G) in Joinville (SC). Identify the frequency of these polymorphisms in patients with hepatitis C and the relationship with therapy response. **Material and Methods:** 199 blood donors' samples from HEMOSC (Joinville/SC) and 145 treated patients with chronic hepatitis C, genotype 1, from six reference centres were evaluated. In 277 (198-controls/79-HCVpos) samples genotyping consisted in segment amplification by conventional polymerase chain reaction (PCR), followed by (- RFLP (Polymorphism of Restriction Fragment Length). The amplicons obtained were separated by electrophoresis agarose gel and visualized under ultraviolet light. In 66 HCV samples the analysis of polymorphisms was done by sequencing, DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing for MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech®). **Results:** Genotype and allele distribution of *rs12979860* and *rs8099917* showed significant difference between controls and HCV patients, with higher favorable *CC* and *TT* genotypes in control group ($p=0.037$ and $p=0.046$, respectively) and higher *TT* and *GG* genotype on HCV group ($p=0.0009$ and $p=0.0001$). The *rs12979860* genotype *CC* and *C* allele was a significant predictor of therapy response (45% *vs.* 21%, $p = 0.02$). No significance was found for *rs8099917* and treatment response, but carriers of favorable *T* allele showed higher rates of SVR ($p=0.024$) **Conclusions:** Higher frequency of *C* and *T* alleles was observed in the control group. This fact could possibly grant a protective effect on HCV infection. The *rs12979860* genotype *CC* was related to therapy response.

Keywords: Hepatitis C, *IL28B*, Single Nucleotide Polymorphisms Sustained Virological Response (SVR)

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AA	Africanos-Americanos
BLAT	<i>Basic Local Alignment Tool</i> //Ferramenta de alinhamento
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> // Ferramenta de alinhamento
pb	Pares de bases
C	Citosina
CA	Caucasianos-Americanos
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	Carcinoma Hepatocelular
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> /Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> /Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G	Guanina
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i> /Estudo de Associação Ampla do Genoma
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> /Vírus da Hepatite C
HEMOSC	Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HOMA	<i>Homeostatic Model Assessment</i> /Modelo de Avaliação da Homeostase

HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> /Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN	Interferon
<i>IL28B</i>	Interleucina 28B
IRF	<i>Interferon-Regulatory fator</i> /Fator Regulatório de Interferon
ISDR	<i>Interferon Sensitivity Determining Region</i> /Região Determinante de Sensibilidade ao interferon
ISG	<i>Interferon-Stimulated Gene/Genes</i> Estimulados por Interferon
ISGF	<i>Interferon-Stimulated Gene Factor</i> /Fator de Gene Estimulado por Interferon
JAK	<i>Janus kinase</i> /Janus cinase
Log	Logaritmo
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase
PEG-IFN- α	<i>Pegylated Interferon alfa</i> /Interferon-alfa Peguilado
pmol	Picomoles
R	Receptor
RBV	<i>Ribavirin</i> /Ribavirina
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> /Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> /Ácido Ribonucleico
RVN	Resposta Viroológica Nula

RVR	Resposta Viroológica Rápida
RVS	Resposta Viroológica Sustentada
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> /Polimorfismo de Base Única
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> /Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição
T	Timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
U	Unidade
UNIVILLE	Universidade da Região de Joinville
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
λ	Lambda
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Microgramas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Código Genético Hepatite C	18
Figura 2 - Taxa de RVS por genótipo referente ao SNP rs12979860 e por grupo populacional	28
Figura 3 - Cromossomo 19	33
Figura 4 - Gene <i>IL28B</i>	33
Figura 5 - Via de sinalização Jak-STAT	35
Figura 6 - Amostras de sangue dos portadores de hepatite C em <i>FDA Elute Card</i>	38
Figura 7– Extração de DNA	40
Figura 8 - Representação esquemática da discriminação alélica (rs12979860) analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel	43
Figura 9- Representação esquemática da discriminação alélica (rs8099917) analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel	44

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2.OBJETIVOS	16
2.1.Objetivo geral.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. INTRODUÇÃO.....	17
3.1.1. HEPATITE C.....	17
3.1.2. Tratamento	19
3.1.3. Fatores que influenciam na resposta ao tratamento	22
3.2. O gene IL28B.....	25
3.3. O gene IL28B e o Mecanismo Patogênico.....	31
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 – Amostras.....	36
4.1.1. Amostras populacionais (grupo controle).....	36
4.1.2. Amostras de pacientes	36
4.2. Extração do DNA	39
4.2.1 Amostras de DNA procedentes do HEMOSC-SC.....	39
4.2.2 .Amostras de DNA dos pacientes portadores de hepatite C.....	39
4.3. Genotipagem dos SNPs rs12979860 e rs8099917.....	40
4.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	44
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6. RESULTADOS	46
<i>IL28B</i> -related polymorphisms: a pathway for understanding HCV infection ?	47
7.CONCLUSÕES	63
8. REFERÊNCIAS.....	65
Apêndice A.....	78

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO83

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO83

Anexo A..... 88

Second Edition - November 2007 QIAamp® DNA Mini

1.Introdução

O vírus da hepatite C é um RNA-vírus *flavivirus*, família que inclui os vírus da dengue, febre amarela e Nilo ocidental. Possui um genoma de RNA simples com forte tropismo pela célula do fígado reproduzindo-se no citoplasma e retículo endoplasmático do hepatócito. (BARTENSCHLAGER e BÜHLER, 2010, web)

A hepatite C é um problema de saúde pública mundial acometendo cerca de 170 milhões de indivíduos. (WHO,2011). Cerca de 80% dos portadores evoluem para forma crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular, sendo a principal indicação de transplante de fígado no mundo (WHO,1999). O vírus C possui vários genótipos (variações), sendo os 1, 2 e 3 os mais importantes chegando a apresentar 30 a 50% de diferença no seu RNA, sendo esta divisão importante pois cada subtipo tem características próprias de agressividade e resposta ao tratamento.

O tratamento para hepatite C, genótipo 1, consiste na administração de interferon peguilado alfa 2a ou 2b (PEG-INF 2a ou 2b) associado à ribavirina por 48 a 72 semanas, porém apenas 50 % dos pacientes tratados atingem a resposta virológica sustentada (RVS), ou seja, negatização do vírus 6 meses após o término do tratamento. (BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções – 2011). Além da eficácia limitada e elevado custo, o tratamento está associado a efeitos colaterais implicando em frequentes ajustes de doses ou abandono do tratamento.

Fatores relacionados ao vírus (carga viral e genotipagem) e ao hospedeiro (idade, gênero, etnia, síndrome metabólica e extensão da fibrose hepática) são descritos como preditores tanto na obtenção da resposta virológica sustentada (RVS) quanto na falha ao tratamento. (TAI, 2009)

Em 2009, estudos identificam polimorfismos de nucleotídeo único, próximos ao gene *IL28B* fortemente relacionados à resposta ao tratamento da hepatite C. Polimorfismos são variações naturais na sequência de nucleotídeos presentes no genoma humano, podendo ocorrer em regiões capazes de provocar consequências como predisposição a doenças ou diferentes respostas a tratamentos.

Ge *et al* (2009) através de estudo de associação ampla do genoma humano (*Genome-Wide Association Study* – GWAS) avaliaram mais de 600.000 polimorfismos em 1137 pacientes de diferentes etnias, submetidos a tratamento com interferon peguilado e ribavirina, identificando no cromossomo 19, o SNP rs12979860 (C/T), cujo alelo C apresentou maior possibilidade em alcançar RVS do que o alelo T. (GE,2009) Thomas e colaboradores relataram que o mesmo polimorfismo descrito por Ge foi também associado com a eliminação espontânea do HCV. (THOMAS,2009) Demonstrou-se que o genótipo *CC* (rs12979860/*CC*) aumenta fortemente a resolução da infecção, com maiores chances do indivíduo infectado eliminar o vírus espontaneamente do que os genótipos *CT* e *TT*.

Seguiram-se novos estudos genômicos (GWAS) realizados por Tanaka (2009), Supphiah, (2009) e Rauch (2010) e colaboradores identificaram o polimorfismo *rs* 8099917(T/G), 8kb a frente do gene *IL-28B*, relacionados tanto a RVS (alelo *T*) quanto a falha a terapia (alelo *G*).

Os genes *IL29* e *IL28* codificam a família de interferon- λ , formada pelos Interferon-I (*IL-29*), Interferon-II (*IL -28A*) e Interferon-III (*IL-28B*), os quais são potentes citocinas endógenas antivirais que inibem ou controlam a replicação do vírus C. O exato mecanismo biológico entre o Interferon-3 produzido pelo gene *IL28B* e o Interferon- α (peguilado) administrado durante o tratamento permanece desconhecido, porém o

conhecimento do perfil genômico destes pacientes poderá contribuir como ferramenta para decisão terapêutica nos portadores de hepatite C.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos relacionados ao gene *IL-28B* (*rs12979860* e *rs 8099917*) na população de Joinville-SC e nos portadores de hepatite C crônica.

2.2. Objetivos Específicos

Identificar a prevalência dos polimorfismos *rs12979860* e *rs 8099917* na população de Joinville(SC),

Demonstrar a frequência dos polimorfismos *rs12979860* e *rs 8099917* em pacientes portadores de hepatite C crônica, genótipo 1, submetidos a tratamento (interferon peguilado alfa 2a ou 2b e ribavirina)

Correlacionar a frequência dos polimorfismos *rs12979860* e *rs 8099917* com a resposta ao tratamento.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Introdução

3.1.1. HEPATITE C

Nas décadas de 70 e 80 casos de hepatite aguda pós- transfusional eram conhecidas com hepatite não-A e não-B até 1989 quando, Choo e colaboradores publicaram a descoberta do vírus da hepatite C (HVC). (CHOO,1989)

Trata-se de um vírus membro da família *Flaviviridae* pertencente ao gênero *Hepacivirus*, possui RNA fita simples composta por cerca de 9600 nucleotídeos, contendo uma única fase de leitura aberta codificando uma poliproteína com cerca de 3010 aminoácidos. Esta poliproteína, pela ação das proteases virais e celulares, é clivada em proteínas estruturais, que formam a partícula viral (core, envelope 1 e envelope 2) e não estruturais envolvidas na replicação viral (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (MAJOR, 1997)

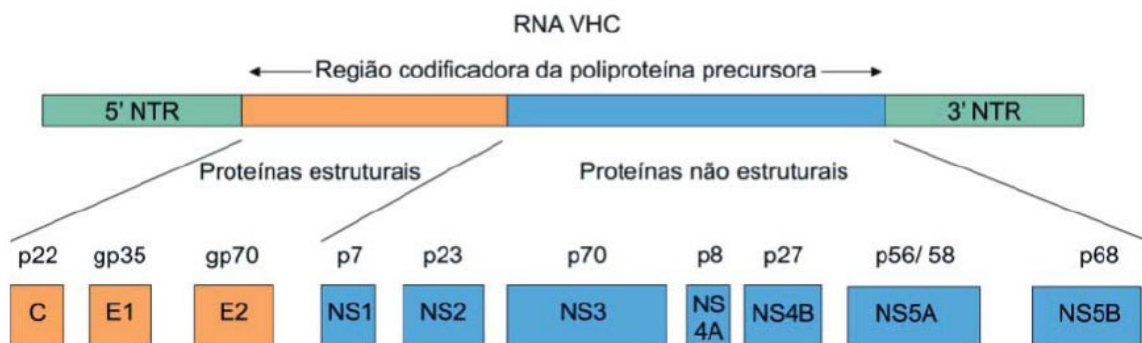


Figura 1: Estrutura Genética do Vírus C

FONTE: Modificada de Anzola e Burgos (2003)

Setenta e cinco por cento dos pacientes infectados pelo VHC têm como principal fonte de contaminação a via parenteral. Outros importantes fatores de risco independentemente associado com o VHC são o comportamento sexual de alto risco, baixo nível de escolaridade, presença de tatuagem, piercing e antecedente de internamento hospitalar (DOMÍNGUEZ, 2001). Fatores relacionados a variações na taxa de transmissão incluem a fase da doença, presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), assim como duração do período de exposição (ROONEY, 1998; DORE, 2003; GÉRARD, 2005) . A taxa de transmissão perinatal varia de 3,8% a 7% por gestação, quando a mãe apresenta viremia, aumentando para 25% se houver associação com HIV.

Há aproximadamente 170 milhões de portadores crônicos de hepatite C no mundo, 3% da população mundial, estimando-se 2,7 milhões somente no Brasil. WHO, 2010. Dados referentes ao boletim epidemiológico 2011 confirmam apenas 69.952 casos de hepatite C no período de 1999 a 2010, refletindo subdiagnósticos e subnotificações desta epidemia silenciosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Uma importante característica do VHC é sua heterogeneidade genética determinando diversos genótipos e diferentes subtipos. Um genótipo pode ser definido quando se encontra variabilidade de no máximo 30 a 35% na sequência de bases (BUKH, 1995). A variabilidade responsável pela diversidade genética do vírus predomina na região do envelope E2. Classifica-se em seis grandes grupos representados por números e divididos em subtipos a, b e c, de acordo com a ordem de seus respectivos relatos publicados (SIMMONDS, 2004). Os genótipos 1, 2 e 3 têm distribuição mundial: entre eles, os genótipos 1a e 1b são os mais comuns representando 60% das infecções no mundo. (WHO,2011) No Brasil, são encontrados os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b e 3, com predominância do genótipo 1

sobre genótipos não-1, com distribuição de 60% e 40%, respectivamente 31,32. (CAMPIOTTO, 2005). A genotipagem do VHC é fundamental na definição de estratégias de tratamento, uma vez que indivíduos com genótipos mais favoráveis (2 e 3) a terapêutica podem ser tratados por seis meses, enquanto portadores do genótipo 1 e 4 deverão ser tratados por 48 a 72 semanas (POYNARD, 2003)

A hepatite C é, na maioria das vezes, assintomática, dificultando o seu controle e facilitando sua disseminação. O diagnóstico geralmente é acidental, durante realização de pesquisa do anti-HCV em doadores de sangue, ou quando é feita avaliação de pacientes com elevação das enzimas hepáticas. Frequentemente, diagnósticos tardios são realizados já em fases de descompensação da doença hepática. Menos de 20% dos pacientes apresentam sinais e sintomas, e esses normalmente são intermitentes e inespecíficos sendo a queixa mais comum a fadiga, e menos frequentemente náuseas, dores musculares, artralgia, alterações de pele como liquen plano, vitiligo ou crioglobulinemia (FERRAZ, 1999).

Cerca de 80% dos casos de hepatite C evoluem para a cronicidade (DI BISCEGLIE, 2000). A progressão para cirrose é insidiosa e ocorre em 30% dos portadores crônicos, geralmente após 2 a 3 década de infecção. (POYNARD,2003). A incidência de carcinoma hepatocelular em cirróticos varia em 1 a 3% ao ano, constituindo a principal indicação para transplante hepático. (SHIFFMAN,2006)

3.1.2. Tratamento

O atual tratamento para a hepatite c genótipo 1, baseia-se numa combinação de interferon alfa peguilado (PEG-IFN- α 2a ou 2b) e ribavirina (RBV) por 24 a 72 semanas. (Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e

Coinfecções – 2011). O tratamento visa diminuir a progressão da doença hepática por inibição da replicação viral resultando numa redução da atividade inflamatória, impedindo a evolução para cirrose e suas complicações, além de determinar melhora na qualidade de vida dos pacientes. Objetiva-se com o tratamento a resposta virológica sustentada (RVS) ou seja a negatificação do vírus 6 meses após o término do tratamento.

Os interferons são proteínas imunomoduladoras sintetizadas por linfócitos *T*, macrófagos, fibroblastos e outros tipos de célula através da estimulação de vírus, antígenos, mitógenos, DNA de dupla fita ou lectinas (CARPENTIER, 2009). São classificados como alfa, beta e gama. Seus efeitos são complexos na imunidade e na função celular e ainda não totalmente esclarecido. (SHEPHERD, 2007).

A peguilação do interferon é uma técnica que consiste em unir uma molécula de polietilenoglicol à molécula de interferon. Tornando-se maior, o interferon é mais dificilmente metabolizado, o que permite que seus níveis sanguíneos permaneçam elevadas por um tempo maior. A atividade biológica do interferon permanece qualitativamente inalterada e a sua administração, ao invés de três vezes por semana, passou a ser semanal.(ZEUZEN,2000)

A RBV é um análogo sintético da guanosina que tem ação direta contra vírus RNA e DNA, por provável mecanismo de inibição da DNA polimerase vírus-dependente. Ela parece apresentar um efeito sinérgico, potencializando a ação do interferon alfa. (ESCOBAR,2006) Apesar de seu mecanismo de ação não ser totalmente elucidado, estudos indicam que a RBV apresenta um efeito mutagênico sobre o genoma do vírus da hepatite C, provavelmente ocasionando mutações letais (HOFMANN, 2007).

Para portadores de genótipo 1, 4 e 5 e coinfetados com HIV/HCV (independentemente do genótipo do HCV) o tratamento consiste na administração de Peg-INF alfa 2a ou 2b associado a RBV (15 mg/kg/dose) por 48 a 72 semanas. Nos portadores de genótipo 2 e 3 o tratamento consiste em Peg-INF (alfa 2a ou 2b) associado a RBV por 24 a 48 semanas na presença de fatores desfavoráveis a resposta ao tratamento como fibrose hepática avançada (escore METAVIR \geq F3), manifestações clínicas de cirrose hepática ou carga viral superior a 600.000UI/mL. Na ausência destes critérios deve ser considerada a utilização de interferon alfa 3000000 UI associado a RBV (15 mg/kg) por 24 semanas.

Uma série de efeitos adversos é associada ao uso de PEG-INF e RBV incluindo efeitos colaterais agudos como febre, calafrios, mialgia, artralgia, cefaléia e efeitos crônicos, onde prevalece a fadiga. Toxicidade ao sistema nervoso central, sistema hematopoiético, gastrointestinal, renal, cutâneo, músculo-esquelético, cardiovascular e endócrino também são descritos (FERNANDES,2008)

Sabe-se que apenas 50% dos pacientes portadores do genótipo 1 alcançarão RVS (MANNS, 2001). Altas taxas de falência do tratamento dos portadores deste grupo devem-se tanto a fatores relacionados ao vírus quanto ao hospedeiro além da redução da eficácia devido ao abandono da terapêutica antes de completarem o esquema preconizado. (GE, 2009).

Em maio de 2011, dois novos medicamentos foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration/EUA*) para o tratamento da hepatite C. Boceprevir (Victrelis®, Merck Sharp Dohme) foi a primeira nova droga para o tratamento da infecção por HCV em 20 anos, seguido pelo Telaprevir (Incivo®, Janssen-Cilag). Esses novos

medicamentos são considerados um grande avanço na terapia e uma mudança no paradigma do tratamento da hepatite C (MAGGON, 2011).

Boceprevir e Telaprevir são inibidores da protease do HCV, capazes de formar um complexo covalente, mas reversível com a proteína NS3/4A do vírus (HOFFMAN, 2011). A eficácia e a segurança da combinação de boceprevir e telaprevir com PegINF mais RBV foram comprovadas em estudos com pacientes infectados com o genótipo 1. As taxas de RVS foram superiores em pacientes tratados com a adição de boceprevir ao PEGINF- α -2b e RBV, cerca de 70% dos pacientes com tripla terapia por 44 semanas alcançaram a RVS, enquanto apenas 37% alcançaram RVS com terapia padrão por 48 semanas. (POODARD, 2010; BRONOWICKI, 2010). Os estudos com telaprevir também obtiveram resultados semelhantes. Cerca de 75% dos pacientes que receberam telaprevir em adição à PegINF- α -2a e RBV alcançaram a RVS, enquanto 44% dos pacientes que receberam apenas a terapia padrão. (HOOFMAN, 2011; JACOBSON, 2010).

Esses novos medicamentos já foram aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização no Brasil, porém ainda não são fornecidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Prevê-se que as duas novas drogas sejam incorporadas ao protocolo terapêutico de tratamento da hepatite C e ofertadas na rede pública de saúde apenas no segundo semestre de 2012 (SBH, 2011, web).

3.1.3. Fatores que influenciam na resposta ao tratamento

Fatores relacionados ao vírus são considerados preditores de resposta à terapia da hepatite c. Pacientes infectados com genótipo 1 do HCV são menos prováveis a alcançar a RVS ao final do tratamento do que os pacientes infectados com genótipos 2 e 3. (KAU, 2008). PEG-INF α e RBV determinam taxa de RVS de 42 – 52% para o genótipo 1, 66 – 72% para o genótipo 4, e 76 – 80% para os genótipos 2 e 3 (HADZIYANNIS, 2002), demonstrando que o genótipo do vírus atua como preditor de resposta. A carga viral (unidades de vírus em cada mililitro de soro) pré-tratamento também é considerada como fator prognóstico de resposta à terapia para hepatite C (FERNANDES, 2008; KAU, 2008). Segundo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (Ministério da Saúde, 2011), uma das características associadas ao sucesso do tratamento é a presença de carga viral abaixo de 600.000 UI/mL.

Estudos realizados por Zeuzem, Ferenci e colaboradores demonstram que a cinética viral, ou seja o comportamento da carga viral durante o tratamento, com PCR do vírus não detectável à 4^a semana possui um elevado valor preditivo positivo da obtenção de RVS; por outro lado a incapacidade de atingir uma resposta virológica precoce (RVP) ou seja ausência de carga viral na 12^a semana do tratamento representa o melhor valor preditivo negativo para RVS. (7,8) (ZEUZEN,2006; FERENCI, 2005;GEORGEL,2009)

Fatores do hospedeiro também estão associados à resposta ao tratamento, podendo ser classificados como fatores modificáveis e não modificáveis (ENOMOTO,2010) A etnia e idade são fatores não modificáveis importantes do hospedeiro (TAI, 2009). Estudos comparando o efeito do PegINF e RBV em africanos-americanos (AA) versus caucasianos-americanos (CA) demonstrou que os AA, infectados com o genótipo 1 do HCV, alcançaram taxas de resposta virológica sustentada de 28 %

comparados com 52% nos CA ($p < 0.001$). (COONJEEVARAM,2006; MUIR, 2004). Em relação à idade, Huang e colaboradores descrevem que indivíduos com idade igual ou superior a 65 anos apresentam altas taxas de abandono de tratamento devido efeitos colaterais freqüentes (21.4% x 6.4%; $p =0.001$) influenciando diretamente nos índices de RVS neste grupo de indivíduos (HUANG, 2010)

Fatores de risco modificáveis tais como obesidade, consumo alcoólico, resistência periférica à insulina, esteatose e grau avançado de fibrose hepática podem adversamente afetar o resultado do tratamento (TAI, 2009). O índice HOMA (*Homeostatic Model Assessment*), uma medida de resistência à insulina, foi associada com resposta virológica sustentada. Pacientes com um índice normal de HOMA ($<2,0$) tiveram 60,5% de RVS comparado a 39.5% em pacientes com moderada resistência à insulina (HOMA 2,0 – 4,0) e somente 20% em pacientes com resistência alta à insulina (HOMA $>4,0$) (ROMERO-GÓMEZ, 2005).

Vários grupos investigam a associação de padrões genéticos do hospedeiro com a resposta virológica à terapia. (KAU, 2008). Pesquisas sugerem que a expressão de genes estimulados por interferon (*Interferon-Stimulated Gene- ISG*), como parte da sua via de regulação, estão relacionados à resposta ao tratamento (FELD,2007, HONDA e SAKAI., 2010). Além disso, dados sobre um possível efeito dos *genes* que codificam o tipo de receptor de interferon 1 (IFNAR1) e proteína quinase 3 (MAPKAPK3) sobre a resposta ao tratamento são descritos. (MATSUYAMA, 2003;TSUKADA, 2009).

Em 2009, através de ampla investigação do genoma humano (*Genome-Wide Association Study – GWAS*) vários autores identificaram polimorfismos genéticos relacionados à resposta ao tratamento para hepatite C.

O GWAS utiliza mapas de marcadores genéticos no genoma humano para procurar diferenças na frequência alélica entre casos e controles. Quando uma diferença na frequência é significativa, supõe-se que a região correspondente do genoma contém variantes que podem influenciar na característica de interesse analisada (ASSELAH, 2010).

3.2. O gene IL28B

O GWAS realizado por GE e colaboradores identificou polimorfismos próximo ao gene *IL28B*, estando fortemente associado com a resposta ao tratamento da hepatite C (GE, 2009). Este estudo utilizou um total de 1137 amostras provenientes de pacientes portadores de hepatite c submetidos a tratamento com PegINF (alfa 2a e 2b) associado a RBV (MCHUTCHISON,2009). As amostras foram genotipados através da técnica de microarray utilizando a plataforma Illumina Humans610-quad BeadChip identificando vários polimorfismos de base única (*Single-Nucleotide Polymorphism – SNP*), no cromossomo 19, relacionados à resposta ao tratamento da hepatite C. O polimorfismo batizado como rs12979860, localizado 3kb à frente do gene *IL28B*, foi o principal polimorfismo fortemente associado com RVS no grupo de pacientes estudados. A presença do genótipo C/C (substituição da citosina -C pela timina -T) nesta localização estava associado a resposta virológica sustentada ($p=1,37 \times 10^{-28}$) em aproximadamente 80% dos casos, 40% para genótipo T/C e 30% para genótipo TT.

A identificação do polimorfismo próximo do gene da interleucina *IL-28B*, gene este codificador do interferon- $\lambda 3$, sugere que níveis de interferon alfa administrados

como forma de tratamento, em associação com interferon gama seriam responsáveis pela ativação de mecanismos que em conjunto induziriam a eliminação do vírus.

Outra importante observação deste estudo, devido ao grande número de pacientes, foi a análise da resposta terapêutica relacionada à apresentação genotípica entre os diferentes grupos raciais. Os pacientes Europeus-Americanos (EA) mostraram uma associação do genótipo *CC* (rs12979860/*CC*) com taxa de RVS duas vezes maior (1,8 – 2,3; 95% IC) que o genótipo *TT* (rs12979860/*TT*). Resultados similares foram encontrados em Afro-Americanos (com taxa de RVS três vezes maior, 1,9 – 4,7; 95% IC) e em Hispânicos com taxa de RVS duas vezes maior (1,4 – 3,2; 95% IC). A frequência do genótipo *CC* em Europeu-Americanos, Hispânicos e Africano-Americanos e foi de 39 %, 35% e 16%, respectivamente. Isso pode explicar as taxas de respostas distintas ao tratamento entre esses grupos (GE, 2009).

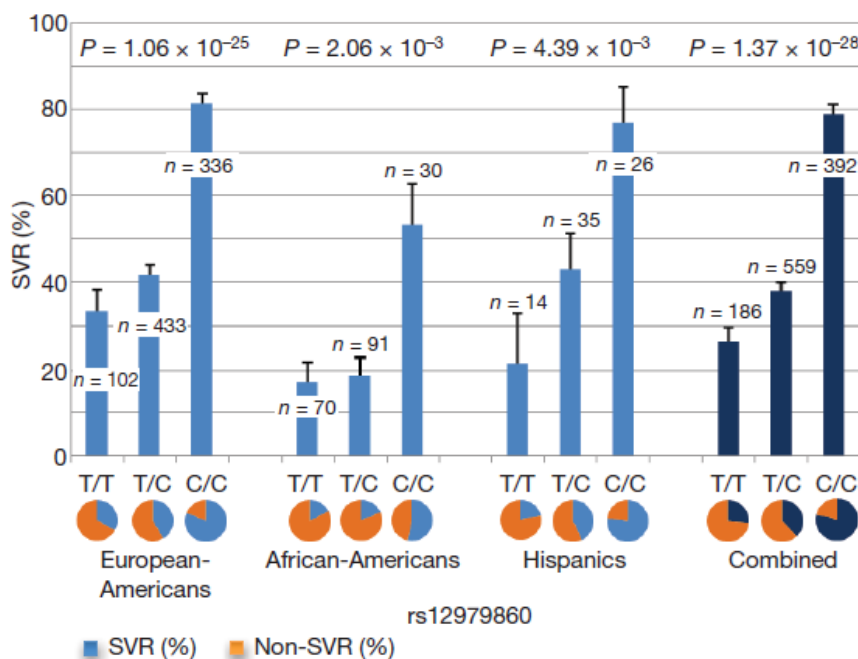


Figura 2- Porcentagem de RVS para rs12979860

Fonte: Ge *et al*, 2009

A prevalência do alelo *C* foi analisada globalmente por genotipagem de 2371 indivíduos de 51 populações do mundo. Foi encontrado um padrão onde a mais alta frequência ocorre no leste da Ásia e Oceania (>90%); a mais baixa frequência na África (<50%), e a intermediária na Europa. (THOMAS, 2009) Isso explica, novamente, a diferença na frequência de eliminação viral e resposta ao tratamento entre essas populações.

Resultados semelhantes foram obtidos em uma pesquisa posterior, conduzida por Thompson e colaboradores, avaliando-se mais de 1.500 indivíduos infectados com o genótipo 1.(THOMPSON,2010) Nesse estudo, o genótipo *CC* do SNP rs12979860 também foi determinante para o aumento na resposta ao tratamento. A taxa de RVS ocorreu 2x mais frequentemente em pacientes com genótipo *CC* do que apresentavam *CT* ou *TT* em todas as populações estudadas (Caucasianos: 69% *CC*, 33% *CT* e 27% *TT* – *CC vs CT*, $P < 0,0001$ e *CC vs TT*, $P < 0,0001$; Africanos-Americanos: 48% *CC*, 15% *CT* e 13% *TT* – *CC vs CT*, $P < 0,0001$ e *CC vs TT*, $P < 0,0001$; e Hispânicos: 56% *CC*, 38% *CT* e 27% *TT* – *CC vs CT*, $P = 0,0888$ e *CC vs TT*, $P = 0,0249$).

McCarthy e colaboradores estenderam as observações de Ge e autores, indicando que, entre caucasianos, o polimorfismo rs12979860 tem uma alta especificidade à resposta ao tratamento, similar a um dos melhores indicadores basais como o genótipo do HCV, utilizado para identificar pacientes que provavelmente responderão à terapia antiviral. (MCCARTHY, 2010) Em 231 indivíduos infectados por diferentes genótipos do HCV, o polimorfismo rs12979860 genótipo *CC* conferia

um risco relativo de quase 6 vezes maior probabilidade em alcançar RVS em comparação com os outros genótipos (*CT/TT*). (62% *CC* e 23% *CT/TT*; $P = 9 \times 10^{-6}$).

Thomas e colaboradores relataram que o mesmo polimorfismo descrito por Ge também está associado com a eliminação espontânea do vírus da hepatite C. (THOMAS, 2009; GE, 2009) Em 1.008 pacientes avaliados, com ou sem co-infecção com vírus da imunodeficiência humana ou vírus da hepatite B (HIV/HBV) a variante rs12979860 foi avaliada em dois grupos distintos de indivíduos: aqueles que eliminaram espontaneamente o HCV e os que persistiram com a infecção. Foi demonstrado que a presença do genótipo *CC* (rs12979860 C/T) aumenta a probabilidade em três vezes de eliminar o vírus espontaneamente quando comparada aos genótipos *CT* e *TT*, tanto em pacientes com ancestralidade europeia como em ancestrais africanos. A eliminação viral ocorreu em 53% dos que apresentavam o genótipo *CC* e 28% daqueles com genótipos *CT/TT*, e a persistência da infecção ocorreu em 47% daqueles com genótipo *CC* e 72% dos que apresentavam *CT/TT* (*CC vs CT/TT*, $P = 3 \times 10^{-13}$).

Estudo realizado por Montes-Cano e colaboradores em uma população espanhola também conclui que o polimorfismo rs12979860 genótipo *CC* está associado com resolução espontânea da infecção. (MONTES-CANO, 2010) Eles analisaram 731 indivíduos (69 com resolução espontânea do vírus; 283 com infecção crônica por HCV de diferentes genótipos e 378 não infectados). Assim, 72,5% dos indivíduos que eliminaram espontaneamente o vírus apresentavam genótipo *CC versus* 27,5% dos que tinham genótipo *CT/TT* ($p=6,2 \times 10^{-5}$). No grupo de indivíduos com hepatite C crônica, 45,6% apresentavam genótipo *CC* e 54,4% genótipo *CT/TT*. Além disso, o efeito do polimorfismo em resposta ao tratamento foi também evidenciado nesse estudo espanhol. No grupo que recebeu terapia combinada de IFN- α mais RBV ($n =$

107), dentre os que apresentavam falha na resposta virológica (não respondedores), 73,1% apresentavam genótipos *CT* ou *TT* do SNP rs12979860 enquanto 26,9% apresentavam o genótipo *CC*. Por outro lado, 60% dos portadores do genótipo *CC* atingiram resposta sustentada, o que foi observado em apenas 40% daqueles dispendo dos genótipos *CT* ou *TT* ($P = 5,6 \times 10^{-4}$). No grupo controle (sem infecção viral), constatou-se que cerca de 40% dos indivíduos apresentavam o genótipo *CC* rs12979860.

Estudos subsequentes identificaram outro polimorfismo também associado com a resposta à terapia da hepatite C.

Tanaka, Suppiah, Rauch respectivos colaboradores encontraram um polimorfismo, denominado rs8099917, localizado aproximadamente 8kb à frente do gene *IL28B*, em desequilíbrio de ligação com o rs12979860 e relacionado tanto resposta virológica sustentada (RVS) quanto a resposta virológica nula (RVN). O desequilíbrio de ligação consiste em qualquer associação não aleatória encontrada entre as frequências gênicas em *loci* diferentes. (JORDE ,2000,; TANAKA e SUPPIAH,2009; RAUCH,2010)

Suppiah e associados através de um estudo GWAS, utilizando a plataforma Illumina Infinium HumanHap300 ou o CNV370-Quad BeadChip, avaliou inicialmente 293 indivíduos australianos infectados com HCV genótipo 1 (162 não respondedores e 131 respondedores) e constataram que o polimorfismo rs8099917 e seu alelo *T*, é um preditor independente de resposta à terapia. Numa segunda etapa, em uma coorte europeia compreendendo mais de 555 indivíduos, a RVS foi alcançada em 55,9% de 442 pacientes com o genótipo *TT* (rs8099917/*TT*), em 36,4% de 357 com o genótipo *GT* (rs8099917/*GT*) e 30,6% de 49 com o genótipo *GG* (rs8099917/*GG*).

Observou-se uma forte associação do alelo G com RVS, atingindo significância na análise geral do estudo (GWAS) e na coorte de replicação ($p = 9,25 \times 10^{-9}$).

Tanaka e colaboradores utilizando a plataforma Affymetrix SNP 6.0 Array, incluiu 154 pacientes japoneses com HCV genótipo 1 (82 com RVN e 72 RVS). Foram detectados sete SNPs relacionados à resposta ao tratamento da hepatite C, dos quais o rs8099917 foi o que melhor correlacionou com a resposta à terapia. (RVN vs RV, $P = 3,11 \times 10^{-15}$) Na coorte asiática estudada (314 pacientes), a RVS foi alcançada em 63,8% de 196 pacientes com o genótipo *TT*, em 13,3% de 113 com genótipo *GT* e em nenhum dos cinco pacientes com o genótipo *GG* (RVN vs RVS, $P = 1,11 \times 10^{-27}$). (TANAKA, 2009)

Estudo realizado por Rauch e associados analisou 1362 pacientes com infecção aguda por HCV (347 apresentaram eliminação espontânea e 1015 progrediram para a infecção crônica). Do total, 914 eram mono-infectados por HCV e 448 co-infectados por HCV/HIV. (RAUCH, 2010) Entre os pacientes que eliminaram espontaneamente o vírus (com ou sem HIV associado) as frequências dos genótipos *TT*, *TG* e *GG* do polimorfismo rs8099917 foram de 78% ($p = 3,37 \times 10^{-3}$), 21% ($p = 1,23 \times 10^{-8}$) e 1% ($p = 6,07 \times 10^{-9}$), respectivamente. Dos pacientes com infecção crônica por HCV (sem HIV), 465 receberam o tratamento padrão com Peg-INF e RBV. A frequência do genótipo *TT*, *TG* e *GG* para os pacientes infectados cronicamente que atingiram RVS foram 68% 29% e 3% respectivamente e entre aqueles que falharam na resposta ao tratamento a frequência dos genótipos foi de 42% ($P = 3,62 \times 10^{-1}$), 51% ($p = 3,11 \times 10^{-8}$) e 7% ($p = 6,30 \times 10^{-7}$), respectivamente. Esses dados sugerem que o menor alelo G do polimorfismo rs8099917 está associado tanto à persistência da infecção como à falha no tratamento.

Muitos estudos demonstraram que o genótipo favorável *CC* da *rs12979860* foi o mais frequente entre os pacientes infectados com genótipos 2 e 3 do HCV em relação aos pacientes com genótipo 1. Assim, algumas das diferenças na RVS entre os diferentes genótipos virais poderiam ser explicadas pelo polimorfismo do *IL28B* (MONTES-CANO e MCCARTHY, 2010; SARRAZIN, 2011).

Ge e colaboradores relata que a presença do alelo C foi significativamente menos frequente em um grupo de infectados com HVC do que em uma coorte de indivíduos pareados etnicamente semelhantes e sem hepatite C (0.63×0.73 , $p < 2.5 \times 10^{-6}$) sugerindo uma ação protetora natural do alelo C na aquisição do vírus da hepatite C. (GE, 2009)

3.3. O gene IL28B e o Mecanismo Patogênico

O gene *IL28B* localiza-se no cromossomo 19 (19q13). A identificação em vermelho determina a posição do *gene* no cromossomo.

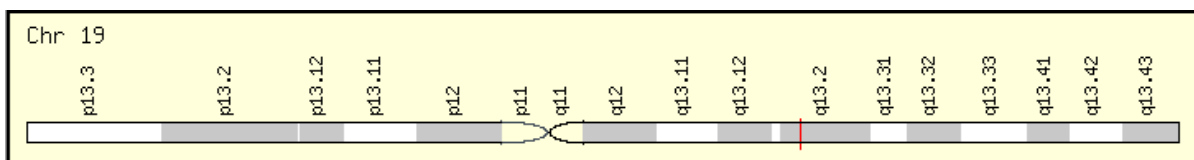


Figura 3 : Cromossomo 19

Fonte: GeneCards (2010, web)

Esse gene é composto de 5 éxons e 4 íntrons.

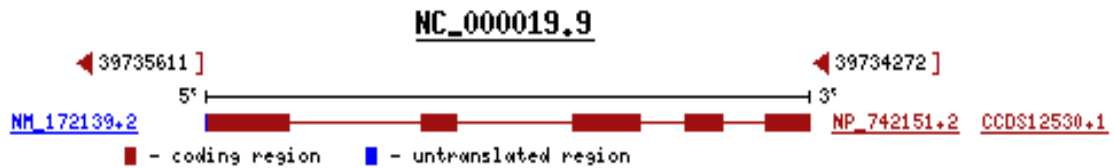


Figura 4 .Gene *IL28B*

Fonte: GeneCards (2010, web)

Os mecanismos através dos quais os polimorfismos próximos ao gene *IL28B* influenciam na resposta antiviral ao tratamento permanecem desconhecidos (THOMPSON e MCHUTCHINSON, 2009). Vários relatos demonstram que os interferons- λ exibem atividade antiviral contra diversos vírus, entre eles o vírus da hepatite C (THOMPSON e MUIR, 2010). Falhas genéticas na produção desses interferons poderiam influenciar na resposta, porém o mecanismo pelo qual essa falha influenciaria, direta ou indiretamente, na eliminação ou persistência do vírus através do tratamento à base de interferon- α ainda não está esclarecido.(LI,2009)

Recentemente, Shi e colaboradores descrevem que indivíduos que apresentaram clareamento espontâneo do vírus e indivíduos saudáveis apresentam maior nível de expressão proteica (*RNA_m*) e de *IL28B* sérico, quando comparados com os cronicamente infectados.(SHI,2010)

O gene *IL28B* codifica o interferon lambda 3 (IFN- λ -3), componente do tipo III de interferon (GE , 2009), descoberto em 2003. (SHEPPARD, 2003; KANDA, 2010)

Os interferons são citocinas de classe II, caracterizados por seus efeitos antivirais celulares e classificados de acordo com seus receptores utilizados. Os interferons

tipo I incluem interferon alfa (IFN- α), interferon beta (IFN- β) e vários outros subtipos, todos com via de sinalização através de receptores IFN- α/β . Os interferons tipo I induzem atividade antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória. O tipo II de interferon inclui somente o interferon gama (IFN- γ) e a via de sinalização é de receptores de IFN- γ (PESTKA, 2004), induz primordialmente atividades imunomodulatórias (YOUNG, 2007). O tipo III de interferon inclui IFN- λ -1, λ -2 e λ -3, também conhecidos como *IL29*, *IL28A* e *IL28B*. (DELLGREN, 2009) Esse tipo de interferon utiliza um receptor complexo composto de uma cadeia chamada *IL-10R2* e outra chamada *IL- λ R1* (KOTENKO, 2003).

As classes de interferon tipo I (α) e tipo III (λ) apresentam determinadas atividades similares, induzindo proteção antiviral *in vitro* (KOTENKO, 2003) bem como *in vivo* (ANK, 2006). Apesar de suas ativações serem através de receptores complexos diferentes, suas sinalizações baseiam-se em processos intermediários idênticos através da via JAK-STAT (enzimas chamadas Janus-cinases – Jak1 e Tyk2; e transdutores de sinal e ativadores da transcrição – STAT1 e STAT2). (O'BRIEN, 2009) Dessa forma, ativam fatores de transcrição (IRF9, ISGF3), que, por sua vez, conduzem à expressão de um conjunto de *genes estimulados por interferon* (*Interferon-Stimulated Genes* – ISGs) os quais, então, atuam mediando a atividade antiviral do interferon. (KOTENKO, 2003; SOMMEREYNS, 2008). Sabe-se que o interferon- λ induz um aumento estacionário na expressão do subconjunto de *genes estimulados por interferon* (ISGs), enquanto o interferon- α induz os mesmos *genes* com cinética mais rápida e transitória (MARCELLO, 2006). Por isso, é possível que interferon- λ induza uma resposta mais baixa, porém mais sustentada de proteção antiviral. Essa pode ser uma das explicações pela qual a variação genética

influencia a expressão regular de *IL28B* em resposta ao tratamento com PegIFN- α /Ribavirina (TANAKA, 2009).

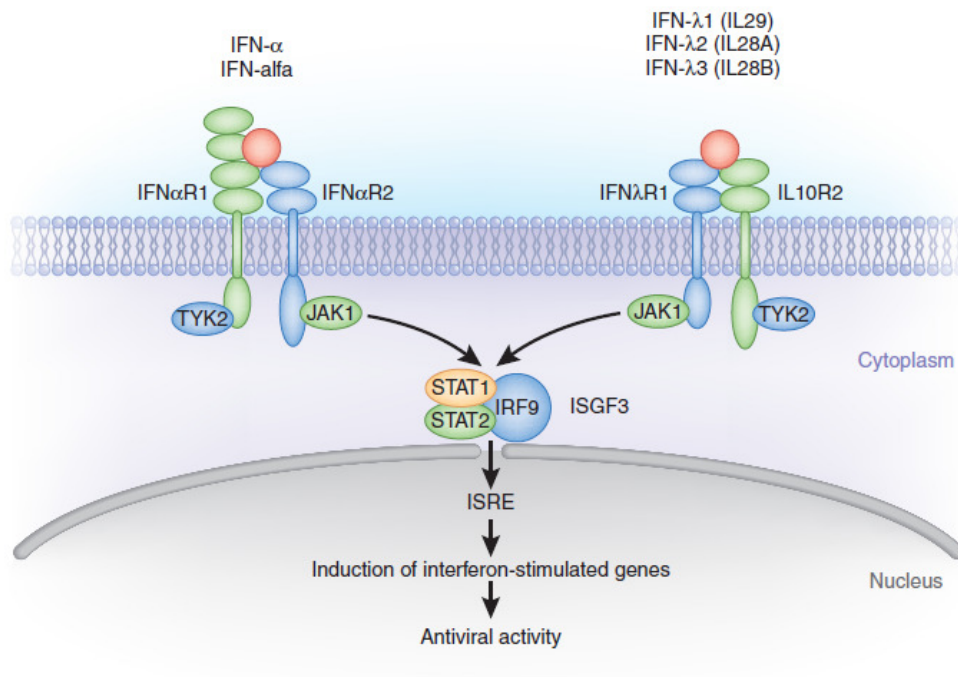


Figura 5 - Via de sinalização JAK-STAT [IFN, interferon; IRF: interferon-regulatory factor – fator regulatório de interferon; ISGF: interferon-stimulated *gene* factor – fator de *gene* estimulado por interferon; ISRE: interferon-stimulated response element – elemento de resposta estimulado por interferon; JAK: janus kinase – janus cinase; R: receptor; STAT: signal transducer and activator of transcription - transdutor de sinal e ativador de transcrição; TYK: tyrosina kinase – tirosina cinase.

Fonte: O'BRIEN¹, 2009

4. Metodologia

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, descritiva de caráter multicentrico.

4.1 – Amostras

Foi analisado no presente estudo um total de 344 amostras de sangue, distribuídas da seguinte forma:

4.1.1. Amostras populacionais (grupo controle)

Para análise da prevalência populacional foram utilizadas amostras sanguíneas de 199 voluntários procedentes de estudos previamente realizados pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE. Estas amostras encontravam-se armazenadas a -20°C e foram analisadas após contato para assinatura de novo termo de consentimento informado livre e esclarecido (Apêndice A). O único critério de exclusão utilizado para este grupo foi doadores de sangue da mesma família. As coletas foram realizadas no Hemocentro da cidade de Joinville/Santa Catarina (Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina - HEMOSC).

4.1.2. Amostras de pacientes

Foram utilizadas amostras de sangue coletadas de 145 pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C atendidos em seis centros participantes do estudo, conforme mencionado abaixo:

Hospital Municipal São José de Joinville (SC) (n = 25)

Hospital Santa Casa de Misericórdia/ISCOMPA, Porto Alegre (RS) (n = 2)

Hospital Universitário Gaffrée Guinle/HUGG/UNIRIO, Rio de Janeiro (RJ) (n = 26)

Hospital da Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Pelotas (RS) (n = 12)

Hospital Universitário de São Luis do Maranhão (MA) (n = 14)

Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (RJ) (n = 66)

Todos os pacientes apresentavam genótipo 1 e todos foram submetidos ao tratamento com Peg-IFN α 2a ou 2b associado a RBV por um período de 48 semanas. Pacientes que apresentaram carga viral negativa seis meses após o término do tratamento atingiram a resposta virológica sustentada (RVS), os que permaneciam positivos foram considerados não respondedores. (NR)

Os critérios de inclusão utilizados foram:

- Pacientes na faixa etária de 18 a 65 anos,
- Pacientes portadores de hepatite C submetidos a tratamento (como descrito) e que realizaram dosagem da carga viral na vigésima quarta semana após o término do tratamento, tendo completado 80 % do tratamento instituído.
- Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

Os critérios de exclusão foram:

- Tratamento prévio para hepatite C com outro tipo de medicamento,

- Portadores de HIV/AIDS e/ou hepatite B associado à hepatite C.

As amostras foram coletadas através de punção digital, após assepsia local, com lanceta estéril. Gotas de sangue foram armazenadas em FTA CARDS (FTA Elute Micro Card – Whatman®).

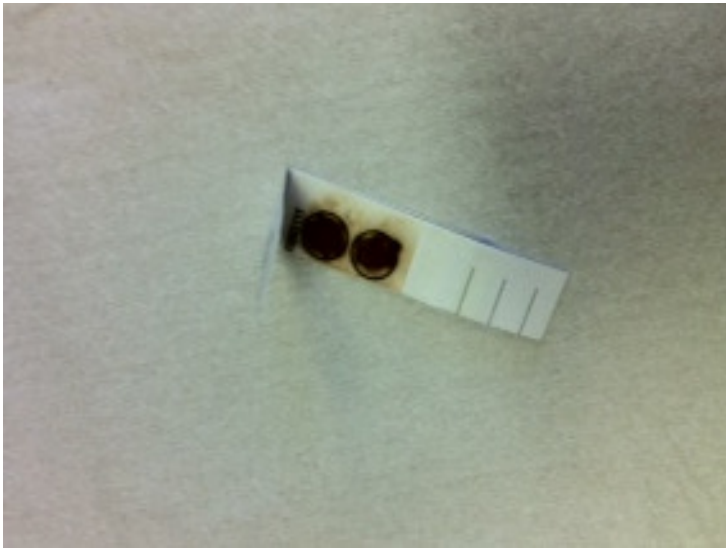


Figura 6 - Amostras de sangue dos portadores de hepatite C em *FDA Elute Card.*, Whatan[®])

Fonte: Acervo Autor

4.2. Extração do DNA

4.2.1 Amostras de DNA procedentes do HEMOSC-SC

As amostras de DNA já se encontravam extraídas, prontas para o uso em PCR, oriundas de estudos anteriores. A extração do DNA genômico foi aplicada às amostras de sangue periférico, coletadas e armazenadas a -20°C , empregando-se o kit "Qiamp DNA Mini Kit" (Qiagen), conforme instruções do fabricante (Anexo C).

4.2.2 .Amostras de DNA dos pacientes portadores de hepatite C

As amostras de DNA foram extraídas de acordo com as orientações de FTA CARDS (FTA Elute Micro Card – Whatman[®]).

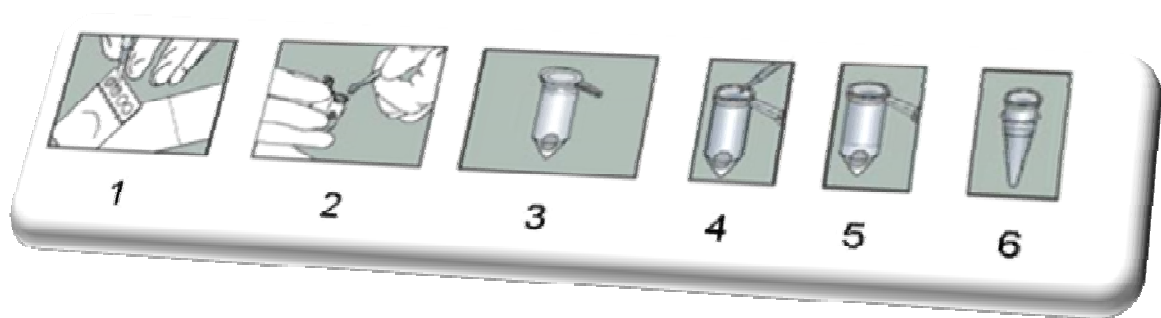


Figura 7- Extração de DNA a partir de amostras de sangue seco, de acordo com Whatman. 1. Coleta de amostra de sangue seguido de secagem completa, 2. Remoção de uma amostra (3 mm) circular com um perfurador estéril e transferência para um tubo de microcentrifuga, 3. A lavagem em 500 uL de dH₂O em vórtice 3X durante 5 segundos 4. A remoção de água seguido por centrifugação e descarte excesso 5. Adição de 50 uL de água estéril, seguido por aquecimento (95 ° C) durante 30 min 6. Adição de 5-10 uL de mistura de reação para PCR.

4.3. Genotipagem dos SNPs *rs12979860* e *rs8099917*

A metodologia empregada para genotipagem dos SNPs *rs12979860* e *rs8099917* foi desenvolvida pela aluna do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente Simone Moreira (MOREIRA, 2012). Em 278 amostras (199 controles/79 HCV) empregou-se a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Em 66 amostras procedentes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (RJ), a genotipagem foi realizada pela técnica de sequenciamento bidirecional, com emprego do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Sequencing.

As sequências foram analisadas através do software MegaBACE (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Esta análise foi realizada no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho-Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Para identificação dos oligonucleotídeos envolvidos na construção dos primers utilizou-se o banco de dados genômico virtual (Entrez SNP, NCBI, 2010, web) seguida do mapeamento da região de interesse na região *IL 28B* (cromossomo 19) no *Genbank* (NCBI, 2010, web). Para identificação das endonucleases utilizadas, as sequências nucleotídicas foram submetidas à ferramenta *online* NEBcutter (VINCZE; POSFAI; ROBERTS, 2010, web) identificando o local de clivagem do sítio de interesse.

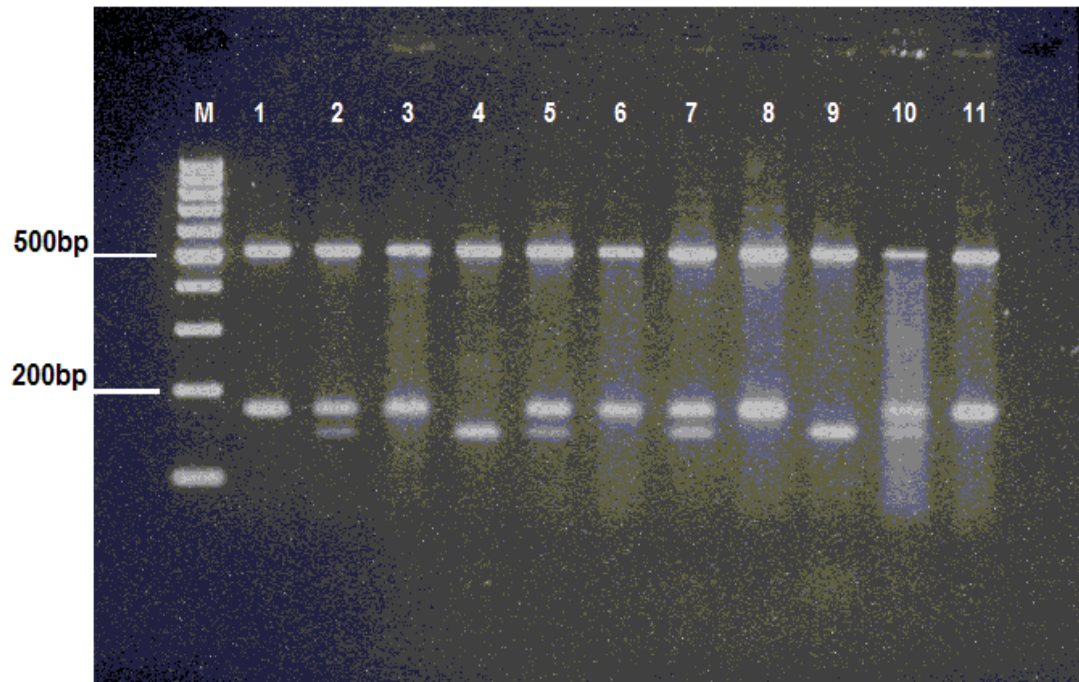
Os primers utilizados para SNP rs12979860 foram: 5´ - AGCAGGACAGATTGGCAAAG - 3´ (senso), e 5´ - CACAATTCCCACCACGAGAC - 3´ (antisenso) e para rs8099917 foram: 5´- CTGGAACAAATCGTCCCAAT - 3´(senso), e 5´- TTCCTTTAGGCCTGTGGATG - 3´ (antisenso).

Os componentes da reação foram os seguintes: 50 – 500 ng de DNA, uma unidade (1 U) de Platinum[®] Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen), tampão para PCR (20 mM Tris-HCl, pH 8,4; 50 mM KCl) e 10 pmol de cada primer descrito (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA) em um volume total de 50 µL. Para a amplificação do segmento relacionado com a rs12979860, adicionou-se à reação 5% de dimetil sulfóxido (DMSO) (Amresco, Ohio, USA).

As amplificações foram obtidas nas seguintes condições de PCR: desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida por 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg,

anelamento a 60°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min, e uma extensão final a 72°C por 7 min.

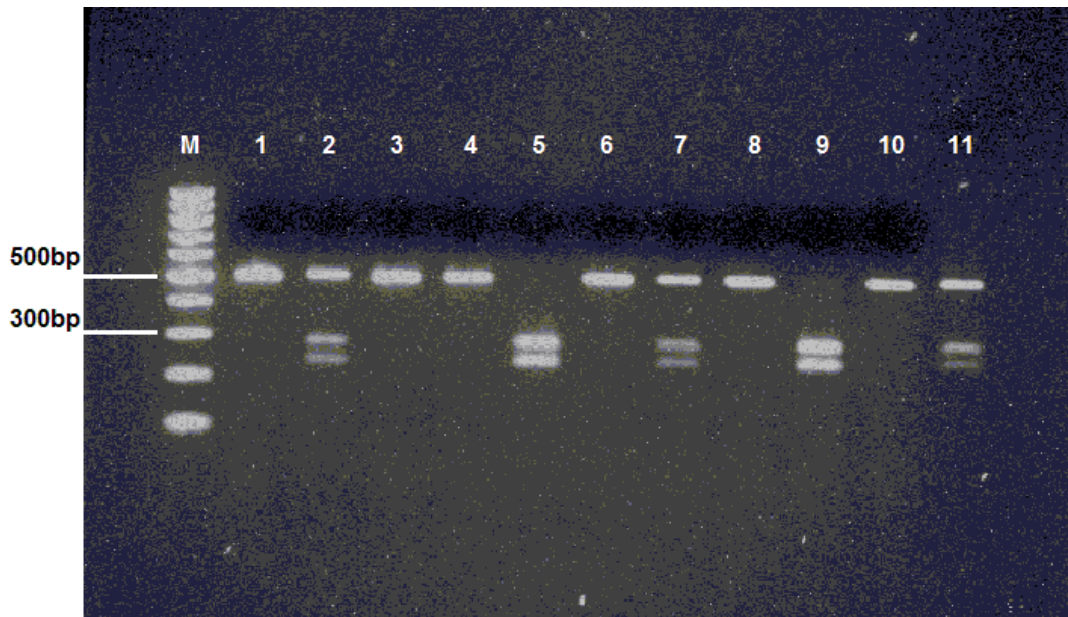
Após a amplificação pela PCR, realizou-se o ensaio de RFLP para a discriminação alélica. As digestões foram realizadas separadamente em um volume total de 20 µL. Para o reconhecimento de uma das formas variantes do polimorfismo rs12979860 (C/T), os *amplicons* foram submetidos à digestão enzimática pela endonuclease *Hpy166II* (New England Biolabs, Beverly, EUA). Para 10 µL de *amplicon* utilizou-se 1U da endonuclease *Hpy166II* e quantidade de tampão recomendada pelo fabricante. A incubação foi realizada à 37°C, durante 2h. Para o reconhecimento de uma das formas variantes do outro polimorfismo, rs8099917 (T/G), os *amplicons* foram submetidos à digestão enzimática pela endonuclease *BsrDI* (New England Biolabs, Beverly, EUA). Para 10 µL de *amplicon* utilizou-se 1U da endonuclease *BsrDI* e quantidade de tampão e albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin* – BSA) (10 mg/mL) recomendada pelo fabricante. A incubação foi realizada à 65°C, durante 2h. Os produtos da digestão com *Hpy166II* foram separados por eletroforese em gel de agarose 3% durante 2 horas, e aqueles digeridos com a enzima *BsrDI*, foram separados em eletroforese em gel de agarose 1,5% por 1 hora e meia. Seguiu-se então a fotodocumentação para visualização dos fragmentos e identificação dos genótipos (homozigoto ou heterozigoto).



	CC	CT	TT
509bp	■	■	■
185bp	■	■	
155bp		■	■
30bp		■	■

Figuras 8. Representação esquemática da discriminação alélica (rs12979860) analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel.

Fonte: acervo pessoal do autor



	CC	CT	TT
509bp	■	■	■
185bp	■	■	
155bp		■	■
30bp		■	■

Figura 9. Representação esquemática da discriminação alélica (rs rs8099917) analisada via clivagem enzimática seguida de eletroforese em gel.

Fonte: acervo pessoal do autor

4.4 Aspectos Éticos

Este projeto, protocolado sob o número 139/2010 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE.

5. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada com a versão do software SPSS 13.0. Para variáveis paramétricas o teste *t* de Student foi utilizado e o teste de Mann-Whitney para as distribuições não paramétricas. Todos os valores de *p* apresentados são bicaudais e valores menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. O teste Chi-quadrado “Goodness of Fit” foi utilizado para verificar a distribuição dos polimorfismos entre os controles e pacientes, de acordo com Equação de Hardy-Weinberg. A existência de diferenças nas freqüências alélicas e genotípicas entre os diferentes grupos foi avaliada por meio do teste de Pearson Chi-quadrado (Chi-quadrado de tendência linear quando apropriado).

O cálculo da amostra para determinação da prevalência do *IL28B* na população de Joinville foi realizado através de :

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Obtendo-se um valor de 196 amostras (IC=95%, Erro Amostral=7%).

6. Resultados

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação em periódicos.

***IL28B*-related polymorphisms: a pathway for understanding HCV infection?**

R.F.L. Garcia ^{1,2}, S. Moreira¹, A.L. Ramos ³, L.E. Ferreira¹, A.A. Mattos⁴, C.V. Tovo⁴, L. Nader⁵, J.A. Ramos⁶, E. Rondinelli⁶, A.J. Dominici⁷, C.E.Garcia^{1,2}M.S.L. Pinho^{1,2}, C.E. Brandão-Mello⁸, C.A.Villela-Nogueira³, P.H.C. França¹

¹Universidade da Região de Joinville/Univille, ²Hospital Municipal São José, Joinville(SC); ³Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ UFRJ (RJ), ⁴Santa Casa de Misericórdia/ISCMPA, Porto Alegre(RS); ⁵Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Pelotas(RS); ⁶Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ(RJ), ⁷Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão(MA),⁸Hospital Universitário Gaffrée Guinle/HUGG/UNIRIO(RJ), Brasil

^{1,2} Department of Medicine of Universidade da Região de Joinville

Address: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. Zip Code: 89219-710. Joinville, Santa Catarina, Brazil.

* Corresponding author

Department of Medicine.

Universidade da Região de Joinville.

Address: Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. Zip Code: 89219-710. Joinville, Santa Catarina, Brazil.

Tel.: +55 47 34619197

Fax: +55 47 34730131

e-mail:drargarcia@terra.com.br

Abstract

Hepatitis C represents a severe public health problem in Brazil. It is known that only 50% of HCV genotype 1 patients will achieve sustained virological response to treatment (SVR). Host and viral factors contribute to this unsatisfactory response. Genome wide studies have detected single nucleotide polymorphisms (SNPs), located near the *IL28B* gene which have shown to be in strong association with therapy response. Aim: To analyze the role of *IL28B* SNPs (*rs12979860* and *rs8099917*) in a cohort of HCV genotype 1 Brazilian patients and controls. Methods: 199 control subjects and 145 treated patients were evaluated. Genotyping consisted in amplification of segments encompassing SNPs *rs12979860* (C/T) and *rs8099917* (T/G) by PCR, followed by RFLP (Polymorphism of Restriction Fragment Length) or bidirectional sequencing. Results: Genotype and allele distribution of *rs12979860* and *rs8099917* showed significant difference between controls and HCV-infected patients with higher favorable *CC* and *TT* genotypes in control group ($p=0.037$ and $p=0.046$) and higher *TT* and *GG* genotypes on patients ($p=0.0009$ and $p=0.0001$, respectively). The *rs12979860* C allele and *CC* genotype were predictors of higher SVR rates ($p=0.02$). No significance was found for *rs8099917* and treatment outcome, but carriers of T allele showed higher rates of SVR ($p=0.02$) Conclusions: Higher frequency of C (*rs12979860*) and T (*rs8099917*) alleles were observed in control group. This fact could possibly grant a protective effect on HCV infection. The *rs12979860* genotype *CC* was related to therapy response and no significant was found for *rs8099917*.

Keywords: Hepatitis C, *IL28B*, Single Nucleotide Polymorphisms, Sustained Virological Respond (SVR)

Hepatitis C virus (HCV) infection may result in a variety of clinical outcomes, ranging from spontaneous viral elimination to an end-stage liver disease. Despite the release of new drugs based on viral protease inhibition, most countries still use standard therapies based on combination of pegylated interferon alfa-2a or -2b (PegIFN- α -2a/2b) and ribavirin (RBV), which is associated with high failure.⁽¹⁾ Host and viral factors, like age, gender, ethnicity, liver fibrosis, metabolic abnormalities, viral load and genotype are associated to different outcomes, suggesting that interaction between virus and host genetics is an important factor for determining the natural history of HCV infection and prediction of therapy outcome⁽²⁻³⁾.

In 2009, after a Genome-Wide Association Study (GWAS) including more than 600,000 polymorphisms, Ge *et al*⁽⁴⁾ suggested that a single nucleotide polymorphism (SNP) on chromosome 19 could be associated to therapy response among HCV-infected individuals. Subsequent GWAS studies also associated the *rs8099917* (T/G) polymorphism to HCV spontaneous clearance and treatment results⁽⁵⁻⁶⁾. Since then, several studies have confirmed these two polymorphisms as strong predictors of therapy response, and further information was also obtained regarding their epidemiological and ethnical distribution.⁽⁷⁻⁹⁾

Despite the main focus on therapy response, it has been also reported significant differences regarding prevalence of these SNPs when HCV infected patients and healthy control groups were compared.⁽⁴⁾

Considering the few data available about this issue in Brazilian population, the aim of this study was to analyze the distribution of *IL28B*-related SNPs (*rs12979860* and *rs8099917*) in a cohort of HCV genotype 1 Brazilian patients and controls, and to assess the association of these polymorphisms to treatment outcome.

Methods

Patients

A multicentric study was undertaken between January 2010 and January 2012 including 145 adults chronically infected patients with HCV genotype 1 treated previously for 48 weeks with a combination of PegIFN- α -2a/2b and RBV (15 mg/Kg). Patients with HBV or HIV co-infection or other concomitant chronic liver disease were not included. Sustained Virological Response (SVR) was defined by a negative result

for serum HCV RNA sixth month post treatment, while the others (including relapsers) were categorized as non-responders (NR).

Samples were referred from six Brazilian reference centers for hepatitis C treatment, including Hospital Municipal São José, Joinville/SC (n=25), Hospital Universitário Gaffrée Guinle (n=26) and Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (n=66), Rio de Janeiro/RJ, Hospital da Universidade Federal de Pelotas (n=12), Pelotas/RS, Santa Casa de Misericórdia (n=2), Porto Alegre/RS, and Hospital da Universidade Federal do Maranhão (n=14), São Luis/MA.

Controls

Blood samples were obtained from 199 blood donors at HEMOSC Joinville/SC, in 2010. Control subjects showed no clinical or laboratorial evidence of liver disease or other major pathological conditions. All were older than 18 years and did not present familial relationship.

Genotyping methods

Blood samples from HCV patients were collected by finger puncture and stored in FTA Elute Micro Card[®] (Whatman, Kent, UK). Genomic DNA extraction was performed following manufacturer's specifications. Analysis for SNPs *rs12979860* and *rs8099917* were performed at Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) and Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (UFRJ).

DNA extraction from control blood samples was performed employing Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen[®], Chatsworth, CA) under the manufacturer's instructions.

Genotyping at UNIVILLE (199 controls and 79 HCV-infected samples) was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by Restriction Fragment Length Polymorphism analysis (RFLP) as described by Moreira *et al.*⁽¹⁰⁾ Amplifications were undertaken using LGC XP apparatus (BIOER Technology Co., Tokyo, Japan) and results were documented under UV light exposure (DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalem, Israel).

Remaining HCV-infected samples (n=66) were genotyped at UFRJ by DNA sequencing using DYEnamic[™] ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE 1000[®] (GE Healthcare, Pittsburgh, PA), according to the manufacturer's instructions.

Ethical issues

For phenotypic classification of ancestry we employed the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) criteria, which has pre-established skin color categories based on self-declaration: white, brown, black, yellow, and Indian.⁽¹¹⁾

The study was approved by Institutional Committees in accordance with Brazilian normative for ethics on research. Informed consent was obtained from each individual before blood sampling.

Statistical analysis

Data analysis was performed using SPSS software version 13.0. Continuous variables were compared by Student's t-test for parametric variables or Mann-Whitney test for non parametric distributions. P-values presented are two-tailed and values lesser than 0.05 were considered statistically significant. The chi-square G test for "Goodness of Fit" was employed to verify whether the proportions of the polymorphisms were unequally distributed between controls and patients, in accordance with the Hardy-Weinberg equation. Differences in allelic and genotypic frequencies between different groups were assessed by Pearson Chi-square test (chi-square test for linear trend when appropriate).

Results

Demographic characteristics of controls and HCV infected groups are summarized in Table 1. Genotyping of SNP *rs12979860* was possible for 198 (99.5%) controls and 141 (97.2%) patients, whereas 190 (95.5%) controls and 145 (100%) patients had SNP *rs8099917* genotyped.

HCV patients versus healthy control groups

Genotypic and allelic distributions in both groups are shown in Table 2. Distribution of SNP *rs12979860* showed a significantly higher prevalence of *CC* genotype in control group compared to HCV patients (47.4% vs 30.3%; $p=0.037$). Conversely, *TT* genotype was found to occur more often in HCV group (8.9% vs 24.6%; $p=0.0009$). Allele *C* distribution was also higher in control group (0.69 vs 0.53, $p=0.0073$).

When distribution of SNP *rs8099917* was analyzed, a significant higher prevalence of *TT* genotype in controls (67.4% vs 46.2%; $p=0.043$) and *GG* genotype in HCV group

(1.5% vs 20%; $p=0.0001$) was observed. Allele *T* distribution was also higher in control group (0.83 vs 0.63, $p=0.0009$) and allele *G* in HCV group (0.17 vs 0.37, $p=0.0008$).

Both *IL28B* SNPs were in Hardy-Weinberg equilibrium among individuals belonging to control group (*rs12979860*, $p=0.7$; *rs8099917*, $p=0.1$), which was also observed for *rs12979860* in HCV group ($p=0.21$). The distribution of *rs8099917* variants was not in Hardy-Weinberg equilibrium for HCV group ($p=0.001$).

The analysis of linkage disequilibrium between *rs12979860* and *rs8099917* showed that they were associated both in control as in HCV infected patients. ($p=0.0001$)

Polymorphisms and treatment outcomes

Sustained virological response occurred in 39% of patients and was less frequently seen in self declared black individuals ($p=0.009$). No clinical parameters showed statistical difference between SVR and NR groups (Table 3). SVR group had significant higher prevalence of *C* allele and *CC* genotype of SNP *rs12979860* compared to non responders (45.5% vs 21%, $p=0.02$). Conversely, *T* allele and *TT* genotype were more often detected on NR group (18.2% vs 30%, $p=0.03$). Genotypic and allelic distributions in both groups are shown in Table 4.

Analysis of SNP *rs8099917* genotypic distribution showed no significant difference between SVR and NR groups, but alleles *T* (0.74 vs 0.5, $p=0.024$) and *G* (0.43 vs 0.2, $p=0.024$) showed higher frequency in SVR and NR patients, respectively.

The analysis of linkage disequilibrium between *rs12979860* and *rs8099917* showed that they were associated on SVR group ($p=0.07$) but not on NR.

Discussion

Polymorphisms near *IL28B* gene have revealed the contribution of host genome to the natural history of HCV infection and the ability to predict the therapy response ⁽¹²⁻¹⁵⁾

The *CC* genotype of the SNP known as *rs12979860* (*C/T*) was associated to twofold difference in response to HCV treatment, both in Caucasian or African-Americans

patients. Thomas *et al*⁽¹⁶⁾, verifying allele frequencies related to *rs12979860* in 2371 individuals from 51 populations worldwide, showed a higher *C* allele frequency in east Asia, intermediate in Europe and America, and smaller in Africa. Fabris *et al*⁽¹⁷⁾ genotyped *rs12979860* polymorphism in 412 patients with end-stage liver disease due to hepatitis B, C, alcohol or other causes along with 344 controls. Patients with viral cirrhosis had a higher frequency of the *T* allele and *TT/CT* genotypes in comparison to control subjects ($p=0.002$), suggesting that *TT* genotype may be associated to severe liver disease whilst *CC* genotype may exert a protective effect.

In an Australian-European cohort study, sustained virological response (SVR) was achieved in 55.9% of 442 patients with *TT* genotype, 36.4% of *TG* and 30.6% of *GG* genotypes.⁷ Similar results were reported by Rauch *et al*⁽⁶⁾ in a cohort of 1015 HCV treated patients where lower allele *G* frequency was associated to persistent infection and failure to respond to therapy.

Few studies have assessed the role of *IL28B* polymorphisms in Brazilian population. Cavalcante *et al*⁽¹⁸⁾ analyzed *rs12979860* in 222 HCV genotype 1, 2 and 3 treated patients with standard therapy from a admixed population. Genotypes *CC* (*rs12979860*) and *TT* (*rs8099917*) were strongly associated to SVR, while *CT/TT* and *TG/GG* were associated to treatment failure, respectively. Lunge *et al*⁽¹⁹⁾ studied the association between the SNP *rs12979860* (*C/T*) and spontaneous clearance of HCV infection in HIV-co-infected group. The genotypes *CT/TT* conferred nearly 3-fold higher rates for developing chronic HCV infection relatively to genotype *CC*.

Our present results regarding therapy response have confirmed the predictive value of *C* allele and *CC* genotype (*rs12979860*) ($p=0.02$), as reported by Cavalcante *et al*.⁽¹⁸⁾ Despite lack of demonstration of *rs8099917* SNP significance to therapy response in our cohort, *T* allele distribution was shown to be related to treatment outcome ($p=0.024$). We argued whether the absence of Hardy-Weinberg equilibrium on the sample could be related to this finding.

We would like also to emphasize the significant differences observed on alleles and genotypes distribution between controls and HCV-infected population for both SNPs (*rs12979860* and *rs8099917*), with higher *C* and *T* alleles as well as *CC* and *TT* genotypes in control group. These data is in accordance with Ge *et al*⁽⁴⁾ who described that the allele *C* along with genotype *CC* frequencies were significantly reduced in the cohort of chronically infected patients compared with ethnically

matched controls (0.63 vs. 0.73, $p < 2.5 \times 10^{-26}$), which suggests a strong association between the *C* allele and higher rates of natural clearance of HCV and eventually a protective factor to HCV infection.

The exact biological pathways influenced by *IL28B* gene product and its polymorphisms remain unknown. One possibility is that this gene variant may affect the rates of protein production. In fact, Xiaodong *et al.*⁽²⁰⁾ demonstrated that patients with chronic HCV infection had significantly lower *mRNA* and serum *IL-28B* levels than healthy controls or subjects who spontaneously cleared the virus, whereas individuals carrying *rs12979860 CC* genotype tended to have higher levels compared to those carrying *CT* or *TT* genotypes.

The SNPs *rs12979860* and *rs8099917* are located 3 and 8 kb upstream from the *IL28B* locus, which encodes interferon- λ , a type 3 interferon with antiviral activity mediated through the JAK-STAT pathway by inducing interferon-stimulated genes. *IL28A* (interferon- $\lambda 2$) and *IL29* (interferon- $\lambda 1$) are found adjacent to *IL28B* and it is likely that those SNPs could also affect the function of these genes. Langhans *et al.*⁽²¹⁾ described that *IL29* levels were substantially lower in patients with chronic hepatitis C than in healthy controls ($p = 0.005$) and in patients that spontaneously resolved hepatitis ($p = 0.001$). Levels of *IL29* and *IL28A/B* were significantly higher in carriers of the *rs12979860 C* allele than in *TT* homozygous individuals ($p < 0.02$).

We concluded that analysis of the role of *IL28B* SNPs in therapy response in HCV-infected Brazilian patients has shown similar patterns to international literature. Furthermore, differences of distribution of polymorphisms between HCV patients and healthy population may contribute to a better understanding of natural history of this complex disease.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq and FAP-UNIVILLE (Research Fund from University of Region of Joinville).

References

1. Tsubota, A., Fujise, K., Namiki, Y., Tada, N., Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection, *World Journal of Gastroenterology*, 2011, 17, 419–432.

2. Shirakawa H, Matsumoto A, Joshita S, Komatsu M, Tanaka N, Umemura T, et al. Pretreatment prediction of virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients using viral and host factors. *Hepatology*, 2008, 48, 1753–1760.
3. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *Journal of Clinical Investigation*, 2009, 1, 1745–1754.
4. Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 2009, 462, 399–401
5. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M *et al.* Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009, 41, 1105–9.
6. Rauch, A., Kutalik, Z., Descombes, P., Cai, T., Di Lulio, J., Mueller, T., *et al.* Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*, 2010,138, 1338–1345.
7. Suppiah, V., Moldovan, M., Ahlenstiel, G., Berg, T., Weltman, M., Abate, M.L. *et al.* IL28B associated with response to chronic hepatitis C response to interferon- α and ribavirin therapy. *Nature Genetics*, 2009, 41, 1100–1104.
8. McCarthy, J.J., Li, J.H., Thompson, A., Suchindran, S., Lao, X.Q., Patel, K., *et al.* Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*, 2010 138, 2307–2314.
9. Montes-cano, M.A., García-Lozano, J.R., Abad-Molina, C., Romero-Gómez, M., Barroso, N., *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, 2010, 52, 33–37.

10. Moreira M., Garcia R.F.L., Gutberlet A. *et al.* A straightforward genotyping of the relevant *IL28B* SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome. *Journal of Virological Methods*, 2012, 184, 93-97
11. Osorio R.G., O sistema classificatório de “cor ou raça” do IBGE. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2003, 50.
12. Garcia, S.L., Coto-Llerena, M., Gallart, S.P.P., Bernhardt, X.F. Genética y tratamiento de la hepatitis C: hacia un tratamiento personalizado? *Gastroenterologia y Hepatologia*, 2011, 34, 352–360.
13. Georgel, P., Schuster, C., Zeisel, M.B., Stoll-Keller, F., Berg, T., *et al.* Virus–host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. *Trends in Molecular Medicine*, 2010, 16, 277–286.
14. McHutchison, J.G., Goldstein, D.B., Carrington, M., Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 2009, 461, 798–801.
15. Lindh, M., Lagging, M., Arnholm, B., Eilard, A., Nilsson, S., Norkrans, J., *et al.* *IL28B* polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. *Journal of Viral Hepatitis*, 2011 18, 325–331.
16. Thomas D.L., Thio, C.L., Martin, M.P., Qi, Y., Ge, D., O’Huin, C., *et al.* Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 2009, 461, 798–801.
17. Fabris C., Falletti E., Cussigh A., Bitetto D., Fontanini E., Bignulin S., *et al.* *IL-28B* rs12979860 C/T allele distribution in patients with liver cirrhosis: Role in the course of chronic viral hepatitis and the development of HCC. *Journal of Hepatology*, 2011, 54, 716 –722.
18. Cavalcante L N., Abe-Sandes K., Angelo A D., Machado T. M. B., Lemaire D. C., Mendes C. M. C., *et al.* *IL28B* polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver International*, 2011, 478-486.
19. Lunge V.R., Rocha D. B., Beria J. U., Tietzmann D. C., Stein A. T., Simon D. *IL28B* Polymorphism Associated with Spontaneous Clearance of

- Hepatitis C Infection in a Southern Brazilian HIV Type 1 Population. *Aids Research and Human Retrovirus*, 2011, 27,1-5.
20. Xiaodong S., Yu P., Moli W., Dongsheng W., Wanyu L., Tao J. *et al.* Genetic Variation of Chinese HCV Patients. *PLoS ONE*, 2012,7,
21. Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol* , 2011,54, 859–865.

	CONTROL GROUP (n=198)	HCV GROUP (n=145)
Age (year \pm SD)	32.2 \pm 10	55.5 \pm 10
Gender (M/F) (%)	66/34	52/48
Skin Color (%)		
White	88	66.9
Black	5	17.2
Brown	7	2.1

Table 1. Demographic Aspects (Control x HCV infected patients)

	CONTROL GROUP	HCV GROUP	<i>p</i>
rs 1297860	(n=198)	(n=142)	
<i>C/C</i>	47,4%	30,2%	0.037
<i>C/T</i>	43,7%	45%	NS
<i>T/T</i>	8,9%	24,8%	0.0009
Allele <i>C</i>	0,69	0,53	0,0073
Allele <i>T</i>	0,31	0,47	0,0073
rs 8099917	(n=190)	(n=145)	
<i>T/T</i>	67.4%	46.2%	0,043
<i>T/G</i>	46.2%	33.8%	NS
<i>G/G</i>	1.5%	20%	0.0001
Allele <i>T</i>	0,83	0,63	0.0009
Allele <i>G</i>	0,17	0,37	0.0008

Table 2. Genotypic and allelic distribution (Controls and HCV infected group)

	SVR GROUP	NR GROUP	<i>p</i>
<i>rs 1297860</i>	n=55	n=86	
<i>C/C</i>	45,5%	21%	0,02
<i>C/T</i>	36,4%	50%	NS
<i>T/T</i>	18,2%	30%	0,03
Allele <i>C</i>	0,64	0,46	0,019
Allele <i>T</i>	0,36	0,54	0,019
<i>rs 8099917</i>	n=55	n=89	
<i>T/T</i>	60%	38,3%	NS
<i>T/G</i>	27,3%	37%	NS
<i>G/G</i>	12,7%	24,7%	NS
Allele <i>T</i>	0.74	0.57	0.024
Allele <i>G</i>	0.26	0.43	0.024

Table 3. Genotypic and allelic distribution (Sustained Virological Response and Non Responders Patients)

	SVR (n=55)	NR (n=89)	<i>p</i>
Gender (M/F) (%)	54/46	51/49	0,072
Skin Color (%)			
White	89	70	0,032
Black	11	26	0,009
Brown	0	4	NS
ALT (<i>UI/ml</i> ± SD)	97 (IQR=54)	77 (IQR=64)	0,1
Baseline Viral Load (%) (n=115)			
< 600 000 <i>UI/ml</i>	47,8%	49,3%	0,76
> 600 000 <i>UI/ml</i>	52,2%	50,7%	0,89
Liver Biopsy (n=128)			
F 0-2	63,3%	49,4%	0,125
F 2-4	36,7%	50,6%	0,126

Tabela 4. Demographics and Clinical Parameters HCV infected group x treatment outcomes

ALT=Alanine Aminotrasferase, F=fibrosis

7. Conclusões

1. Prevalência dos polimorfismos na população de Joinville (grupo controle)

1.1. *rs12979860 (C/T)* : maior prevalência do alelo *C* (0,69) e seus genótipos *CC* (47%) foram encontrados na população de Joinville,

1.2. *rs 8099917 (T/G)*: o alelo *T* (0,83) e seus genótipos *TT* (67,2%) foram os de maior prevalência na população de Joinville.

2. Frequência dos polimorfismos nos pacientes portadores de hepatite C:

2.1. *rs12979860 (C/T)*: maior frequência do alelo *T* (0,47, $p=0,0073$) e genótipo *TT* (24,8%, $p= 0,009$) foram encontradas nos portadores de hepatite C em relação ao grupo controle.

2.2. *rs 8099917(T/G)*: maior frequência do alelo *G* (0,37, $p=0,0008$) e seus genótipo *GG* (20%, $p=0,0001$)

3. Frequência dos polimorfismos e sua relação com a resposta ao tratamento (RVS *vrs* NR)

3.1. *rs12979860* : alelo *C* (0,64 *vrs.* 0,46, $p=0,019$) e o genótipo *CC* (45,5% *vrs.*21%, $p=0,02$) e apresentou relação significativa com a RVS, e o alelo *T*(0,36 *vrs.*0,54, $p=0,019$) e genótipo *TT* (18,2% *vrs.* 30%, $p=0,03$) com falha ao tratamento(NR)

3.2. *rs 8099917* : este polimorfismo e seus respectivos genótipos não apresentou relação com a resposta ao tratamento. Maior frequência do alelo *T* (0,74 *vrs.* 0,57,

$p=0,024$) ocorreu no grupo RVS assim como maior frequência do alelo *G* foi observado em relação a falha a terapia (0,26 vs. 0,43, $p= 0,024$)

8. Referências

ANK, N. *et al.* Lambda interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. **J Virol.** v. 80, n. 9, p. 4501-4509, 2006.

.

ASSELAH, T. Genetic polymorphism and response to treatment in chronic hepatitis: the future of personalized medicine. **J Hepatol.** v. 52, p. 452-454, 2010.

.

BARTENSCHLAGER, R.; BÜHLER, S. *Hepatitis C virus*. Encyclopedia of Virology. 3 ed, p. 367-374, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science>>. Acesso em: 8 jul. 2010.

..

BRASIL. Portal da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21920>. Acesso em: 19 jul. 2011.

YOUNG H.A, BREAM J.H. IFN- γ : Recent Advances in Understanding Regulation of Expression, Biological Functions, and Clinical Applications **Current Topics in Microbiology and Immunology**,v 316,p 97-117, 2007

BRONOWICKI, J.P. *et al.* Response-guided therapy (RGT) with boceprevir (BOC) + peginterferon alfa-2b/ribavirina (P/R) for treatment-naïve patients with hepatitis C virus (HCV) genotype (G) 1 was similar to a 48-wk fixed-duration regimen with BOC + P/R in SPRINT-2 (abstract LB-15). **Hepatology**. v. 52 (suppl. 1), 881A, 2010.

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

CAMPIOTTO, S. *et al.* Geografic distribution of hepatites C vírus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res**. v. 38, p. 41-49, 2005.

.

CARPENTIER, A. *et al.* Analysis of gene transcription in sera during chronic hepatitis C infection. **Journal of Medical Virology**, v81(3),p.473-480,2009

CAVALCANTE, L.N. *et al.* IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver International**,v3,p476-485,2011

.

CHARLTON, M.R. *et al.* Interleukin-28B polymorphisms are associated with histological recurrence and treatment response following liver transplantation in patients with hepatitis C virus infection. **Hepatology**. v. 53, p. 317-324, 2011.

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

CONJEEVARAN, H.S. *et al.* Peginterferon and ribavirin treatment in African American and Caucasian American patients with hepatitis C genotype 1. **Gastroenterology**. v. 131, p. 470-477, 2006.

DELGREEN, C. *et al.* Human interferon- λ 3 is a potent member of the type III interferon family. **Genes and Immun**. v. 10, p. 125-131, 2009.

DI BISCEGLIE, A. M. *Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management.* **Hepatology**, v.31, p.1014-1018, 2000.

DOMÍNGUEZ, A.; BRUGUERA, M.; VIDAL, J.; PLANS, P.; SALLERAS, L. Communitybased seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. **J Med Virol**,v.65, p.688-693, 2001

DORE, G.J.; LAW, M.; MacDONALD, M.; KALDOR, J. M. *Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia.* **J Clin Virol**, v.26, p.171-184, 2003.

ENOMOTO, N.; MAEKAWA, S. *HCV genetic elements determining the early response to peginterferon and ribavirin therapy. **Intervirology.*** v. 53, p. 66-69, 2010.

ESCOBAR, J.S. *Ribavirina y análogos. **J Gastroenterol Hepatol.*** v. 29, p. 129-134, 2006.

FELD, J.J. *et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: Identifying molecular pathways for treatment response. **Hepatology.*** 46, 1548-1563, 2007.

FERRAZ, M.L. *et al. Glomerulonefrite associada à infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,***v.2(1),p.1-6, 1999.

FERNANDES, F.F. *Fatores Prognósticos e de Efetividade do Tratamento da Hepatite C Crônica..* 50p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008

GARCIA, S.L. *et al. Genética y tratamiento de la hepatitis C: hacia un tratamiento personalizado? **Gastroenterol Hepatol.*** v. 34, n. 5, p. 352-360, 2011.

GE, D. *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**. v. 462, n. 17, 2009.

GEORGEL, P. *et al.* *Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies.* **Trends Mol Med**. v. 16, n. 6, p. 277-286, 2010.

GERARD, C.; DELWAIDE, J.; VAIRA, D.; BASTENS, B.; SERVAIS, B.; WAIN, E.; BATAILLE, C.; DAENEN, G.; BELAÏCHE, J.; GLEVHE. Evolution over a 10 year period of the epidemiological profile of 1726 newly diagnosed HCV patients in Belgium. **J Med Virol**, v.76, p.503-510, 2005.

HADZIYANNIS. S.J, *et al.* PEGASYS International Study Group: *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose.* **Ann Intern Med**. v.140, p.346–55, 2002

HOFFMANN, W.P.; ZEUZEM, S. *A new standard of care for the treatment of chronic HCV infection.* *Nature Reviews.* **Gastroenterol Hepatol**. p. 1-8, 2011.

HOWELL, C.D. *et al.* Peginterferon pharmacokinetics in African American and Caucasian American patients with hepatitis C virus genotype 1 infection. **Clin Gastroenterol Hepatol.** v. 6, p. 575-583, 2008.

HUANG, C.F. *et al.* Efficacy and safety of pegylated interferon combined with ribavirin for the treatment of older patients with chronic hepatitis C. **J Infect Dis.** v. 201, n. 5, p. 751-759, 2010.

JACOBSON, I.M. *et al.* Telaprevir substantially improved SVR rates across all IL28B genotypes in the ADVANCE trial. **J. Hepatol.** v. 54(S1):S542-S543, 2011.

JORDE, L.B. Desequilíbrio de ligação e a busca de genes de doenças complexas. **Genome Res.** v. 10, p. 1435-1444, 2000.

KAU, A.; VERMEHREN, J.; SARRAZIN, C. Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. **J. Hepatol.** v. 49, p. 634-651, 2008.

KANDA, T.; IMAZEKI, F.; YOKOSUKA, O. New antiviral therapies for chronic hepatitis C. **Hepatol Int.** v. 4, p. 548-561, 2010.

KOTENKO, S.V. *et al.* IFN- λ : mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol.** v. 4, n. 1, p. 69-77, 2003.

..

LI, M. *et al.* Interferons- λ : the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. **J. Leukoc Biol.** v. 86, p. 23-31, 2009.

.

LINDH, M. *et al.* IL28B polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. **J. Viral Hepat.** v. 18, n. 7, p. 325-331, 2011.

MAGGON, K. Boceprevir (Victrelis) & telaprevir (Incivek, Incivo) Hepatitis C: FDA/EMA review & approval. Disponível em: <<http://www.knol.google.com/k/krishan-maggon/boceprevir-victrelis-telaprevir-incivek/3fy5eowy8suq3/151#>>. Acesso em: 19 jul. 2011.

MAJOR M.E., *et al.* The molecular virology of hepatitis C. **Hepatology.** v.25, p.1527-38, 1997.

MANGIA, A. *et al.* An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response. **Gastroenterology.** v. 139, p. 821-827, 2010.

MANNING, M.P. *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 22, p.958-65.2001.

MARCELLO, T. *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. **Gastroenterology**. v. 131, p. 1887-1898, 2006.

MATSUYAMA, N., MISHIRO, S., SUGIMOTO, M., FURUICHI, Y., HASHIOTO, M., HIJIKATA, M., *et al.* The dinucleotide microsatellite polymorphism of the IFNAR1 gene promoter correlates with responsiveness of hepatitis C patients to interferon. **Hepatol Res**.v.25, p.221-225,2003.

MCCARTHY, J.J. *et al.* Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. **Gastroenterology**. v. 138, n. 4, p. 2307-2314, 2010.

MCHUTCHINSON, J.G., LAWITZ, E.J., SHIFFMAN, M.L., *et al.* Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. **N Engl J Med**,v.361,p.580–593, 2009.

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.

MOREIRA S., GARCIA R.F.L., GUTBERLET A. *et al.*, *A straightforward genotyping of the relevant IL28B SNPs for the prediction of hepatitis C treatment outcome.* **Journal of Virological Methods** v.184,p.93-97,2012

MUIR, A.J.,*et al.* *Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites, for the Atlantic Coast Hepatitis Treatment Group.* **N Engl J Med**,v.35, p.2265–227, 2004.

.

O'BRIEN, T.R. *Interferon-alfa, interferon- λ and hepatitis C.* **Nature Genetics.** v. 41, n. 10, p 1048-1050, 2010

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; WALTER, M.R. *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptor.* **Immunol Rev.** v. 202, p. 8-32, 2004.

POORDAD, F. *et al.* *Boceprevir (BOC) combined with peginterferon alf-2b/ribavirin (P/R) for treatment-naive patients with hepatitis C virus (HCV) genotype (G) 1: SPRINT-2 final results (abstract LB-4).* **Hepatology**, v. 52 (suppl. 1), p.402A, 2010.

POORDAD, F. *et al.* *IL28B polymorphism predicts virologic response in patients with hepatitis C genotype 1 treated with boceprevir (BOC) combination therapy.* **J. Hepatol.** v. 54(S1):S6, 2011.

POYNARD, T.; TORRES, M. Risk factors for liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. **Annals of Hepatology.** v.2(1),p. 5-11, 2003..

POYNARD, T. *et al.* *Effect of treatment with peginterferon or interferon alfa 2b and ribavirin on steatosis in patients infected with hepatitis C.* **Hepatology.** v. 38, n.1, p. 75-85, 2003.

RALLÓN N.I. *et al.* *Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients.* **AIDS.** v. 24, p. 23-29, 2010.

RAUCH, A. *et al.* *Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a Genome-Wide Association Study.* **Gastroenterology.** v. 138, p. 1338-1345, 2010.

REHERMANN, B. *Hepatitis C virus versus innate and adaptative immune responses: a tale of coevolution and coexistence.* **J. Clin Invest.** v. 119, n. 7, p. 1745-1754, 2009

ROONEY, G.; GILSON, R. J. C. Sexual transmission of hepatitis C virus infection.

Sex Transm Inf, v.74, p.399-404, 1998.

ROMERO-GÓMEZ, M. *et al.* Insulin resistance impairs sustained response rate to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C patients. ***Gastroenterology***. v.128, p.636-641, 2005.

SARRAZIN C. *et al.* Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. ***J. Hepatol.*** v. 54, p. 415-421, 2011.

SBH - Sociedade Brasileira de Hepatologia. Disponível em: <<http://www.sbhepatologia.org.br>>. Acesso em: 3 jan. 2012

SHEPHERD, J. *et al.* Interferon alfa (pegylated and non-pegylated) and ribavirin for the treatment of mild chronic hepatitis C: a systematic review and economic evaluation. ***Health Technol Assess.*** v. 11, n. 11, 2007

SHI; X. *et al.* IL28B Genetic Variation Is Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus, Treatment Response, Serum IL-28B Levels in Chinese Population. ***PLoS Pathog.*** v.7.n.5, 2012

SHIFFMAN, M. L., *et al.* Liver and intestine transplantation in the United States, 1995-2004. **Am J Transplant**, v.6, p.1170-1187, 2006.

SIMMONDS, P. *Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on.* **J Gen Virol**, v.85, p.3173-3188, 2004.

SOMMEREYNS, C. *et al.* IFN-lambda (IFN- λ) is expressed in a tissue-dependent fashion and primarily acts on epithelial cells in vivo. **PLoS Pathog.** v. 4, n. 3, p. 1-12, 2008.

SUPPIAH, V. *et al.* IL28B associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. **Nat Genet.** v. 41, n. 10, p. 1100-1104, 2009.

TAI, A.W.; CHUNG, R.T. *Treatment failure in hepatitis C: Mechanisms of non-response.* **J. Hepatol.** v. 50, p. 412-420, 2009.

TANAKA, Y. *et al.* Genome-Wide Association on IL28B with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet.** v. 41, n. 10, p. 1105-1109, 2009.

THOMAS, D.L. *et. al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**. v. 461, n. 6, p. 798-801, 2009.

THOMPSON, A.J. *et. al.* Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in hepatitis C virus-1 patients. **Gastroenterology**. v. 20, n. 10, p. 1-10, 2010.

TSUBOTA, A. *et. al.* Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**. v. 17, p. 419-432, 2011.

TSUKADA, .H, OCHI, H., MAKAEKAWA, T., ABE, H., FUJIMOTO, Y., TSUGE, M., *et al.* A polymorphism in MAPKAPK3 affects response to interferon therapy for chronic hepatitis C. **Gastroenterology**. v. 136,p.1796-805. 2009.

ZEUZEN S, *et al.* Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. **N Engl J Med**, v.343,p.1666-72, 2000

[p://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/)>. Acesso em: 7 jul. 2011.

WHO- Global report of surveillance and control of hepatitis C, organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium, 1999)

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

No mundo todo, estima-se que 170 milhões de pessoas estejam infectadas cronicamente com o vírus da hepatite C. A maioria (70-80%) das infecções pelo HCV persiste e cerca de 30% das infecções persistentes evoluem para cirrose e carcinoma hepatocelular (câncer de fígado). Hoje, o tratamento para hepatite C crônica é a combinação de interferon peguilado mais ribavirina. Sabe-se, porém, que muitos pacientes não apresentam bons resultados a essa terapia. Diversos fatores influenciam na resposta ao tratamento. Esses fatores estão relacionados ao vírus e ao indivíduo. Recentemente, vários grupos identificaram variações genéticas do indivíduo associados à resposta ao tratamento da hepatite C. O estudo sobre qualquer aspecto que influencie na resposta à terapia é muito importante. Com esta pesquisa, espera-se contribuir para que, em um futuro próximo, o tratamento para hepatite C dê maiores possibilidades de cura para aqueles que apresentarem a genética favorável, relacionada aos bons resultados.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa que será realizada na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, que se intitula “**Desenvolvimento de ferramenta molecular para a análise de polimorfismos genéticos relacionados ao gene *IL28B***”, mediante conhecimento da sua proposta, riscos e benefícios. Esta pesquisa será realizada pela aluna do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, Simone Moreira, orientada pelo Professor Dr. Mauro de

Souza Leite Pinho. Para a devida execução, o projeto será realizado a partir da aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Este estudo tem como objetivo desenvolver uma metodologia capaz de identificar a existência de pequenas diferenças, chamadas polimorfismos, na composição do material genético (DNA) de cada indivíduo. Essas variações poderão determinar, em parte, a resposta ao tratamento da hepatite C.

Para isso, será necessária sua autorização para utilizar sua amostra de DNA, estocada após obtenção para um estudo realizado anteriormente, denominado “Prevalência do polimorfismo do *gene* da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) na população de Joinville”, realizado pela pesquisadora Gabriela Ronconi Gastal, mestranda do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, no período de 2009 a 2010.

Na pesquisa atual somente serão investigadas as variações genéticas associadas ao tratamento da hepatite C, especificamente duas: rs12979860 e rs8099917, encontradas próximas ao *gene IL28B*, fortemente relacionadas com a resposta ao tratamento da hepatite C. As amostras continuarão estocadas conforme autorizados anteriormente, não sendo enviadas a outros centros. Nenhuma outra pesquisa, porém, será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, esse material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. Para se evitarem quaisquer

riscos não se permitirá o acesso de pessoas não autorizadas às amostras e aos resultados. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado da pesquisa, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide contatos ao final do documento) antes, durante ou após a conclusão do estudo.

Os resultados a serem gerados por esta pesquisa ainda são considerados insuficientes para potencial aplicação imediata em critérios de diagnóstico e tratamento. Justamente por essa razão, não será realizado aconselhamento genético.

Sua participação não acarretará custos para você. Não haverá, também, compensação financeira (pagamento) a seu favor.

Você não será prejudicado(a) de forma alguma, caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Será possibilitada a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar o seu consentimento no andamento das atividades.

Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

Atenção: Sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvidas quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Campus Universitário, s/n – Bairro Bom Retiro. Caixa Postal 246. CEP: 89219-905, Joinville, SC.

Declaração de Consentimento:

Eu, _____ (nome do paciente),
após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei cancelar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa **“Desenvolvimento de ferramenta molecular para a análise de polimorfismos genéticos relacionados ao gene *IL28B*”**.

Assinatura do Participante

Assinatura da Pesquisadora Responsável

Data: ___ / ___ / _____

Responsáveis pela pesquisa:

Aluna Mestranda (Pesquisadora Responsável): Simone Moreira

Professor Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho

Professor Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Contatos:

Telefones: Instituição (Laboratório de Pesquisa Saúde I): (47) 34619197

Simone Moreira: (47) 99614000

E-mail: Simone Moreira: simonebioq@hotmail.com

Apêndice B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A hepatite C é um problema de saúde pública mundial acometendo cerca de 170 milhões de pessoas. Cerca de 80% dos portadores evoluem para forma crônica, cirrose e câncer de fígado. O tratamento existente, baseado no interferon e ribavirina tem como objetivo reduzir a chance destas complicações e eliminar o vírus. Alguns fatores influenciam o tratamento como o tipo e quantidade do vírus, idade, sexo, enquanto outros são pouco conhecidos.

Você esta sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa que será realizada na UNIVILLE- Universidade da Região de Joinville – sobre **“PREVALÊNCIA DO POLIMORFISMO IL-28B NA POPULAÇÃO DE JOINVILLE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO NOS PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C”**, mediante conhecimento da sua proposta, riscos e benefícios. Este estudo objetiva verificar a possível existência de pequenas diferenças (chamadas “polimorfismos”) na composição do material genético (DNA) que pode estar relacionado a uma maior chance de resposta ao tratamento.

Portanto, será necessária sua autorização para:

Será necessária a consulta em seus registros médicos e coleta de dados como data de nascimento, sexo, esquema de terapia utilizada (dose, duração,etc), resultados

laboratoriais (pesquisa de RNA viral, níveis de transaminases, etc). Esta consulta aos registros somente será utilizada pelo seu médico, que desenvolve esta pesquisa.

Uma única coleta de amostra de sangue. Três a cinco gotas de sangue serão obtidas via leve perfuração da ponta de um dos dedos da sua mão (a escolher) e depositadas em papel filtro por profissional de enfermagem qualificado para esta atividade, somente utilizando materiais descartáveis.

Os riscos e a ocorrência de dor, inchaço ou infecção no local da coleta são considerados mínimos, não oferecendo risco adicional. Em caso de aparecimento de qualquer ocorrência local os pacientes deverão procurar o Ambulatório de Hepatologia para avaliação e orientações.

A amostra será encaminhada ao Laboratório de Pesquisa em Saúde I da UNIVILLE onde será arquivada e analisada.

Na pesquisa atual somente serão investigadas os polimorfismos da IL-28B. Adicionalmente, pedimos sua autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA por 5 anos, para a investigação de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) no futuro. De qualquer forma, nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso. O banco de dados gerado com informações e resultados pertinentes serão utilizados somente para a elaboração de produção científica e ficará sob responsabilidade do pesquisador com posterior incineração do material após um período de 5 anos. O banco de dados

genéticos permanecerá sob responsabilidade da instituição, Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado do exame, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide nome e formas de contato ao final deste documento) antes, durante ou após a conclusão da sua participação.

Não haverá compensação (pagamento) financeira pela sua participação ou ressarcimento de despesas, uma vez que a coleta de sangue será realizada durante uma visita de acompanhamento médico rotineiro. Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde.

A participação em qualquer pesquisa é voluntária. Você não será prejudicado^(a), de forma alguma, ao longo do seu acompanhamento médico periódico normal caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

Atenção: em caso de dúvidas, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Campus Universitário Bom Retiro, Caixa Postal 246, CEP: 89201-971, Joinville SC.

Eu, _____ (nome do paciente),
após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa **“Prevalência do Polimorfismo da IL-28B na População de Joinville e sua Relação com Resposta ao Tratamento nos Pacientes Portadores do Vírus da Hepatite C”**.

Este termo é impresso em duas vias, sendo que uma via assinada ficará com o pesquisador e outra ficará com você.

Assinatura do Participante

Data: ___ / ___ / _____

Assinatura do Pesquisador

Data : _____ / _____ / _____

Responsável pela pesquisa:

Raquel Francine Liermann Garcia

Instituição: Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Fones: (47) 34619197

Anexo A

Second Edition - November 2007

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook

For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes
dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs.
tissue (QIAamp DNA Mini Kit only)

Sample & Assay Technologies



Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®,
FlexiGene®, Gentra Puregene®, inhibitEX®,
MinElute®, TissueRuptor® (QIAGEN Group);

Amicon®, Centricon®, UltraFree® (Millipore Corporation); DACRON® (E. I. du Pont
de Nemours and Company); Puritan® (Hardwood

Products Company); Triton® (Rohm and Haas Company); Tween® (ICI Americas
Inc.). © 1999–2007 QIAGEN, all rights reserved.

Introduction

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits provide fast and easy methods for purification of total DNA for reliable PCR and Southern blotting. Total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) can be purified from whole blood, plasma, serum, buffy coat, bone marrow, other body fluids, lymphocytes, cultured cells, tissue, and forensic specimens. The simple QIAamp spin and vacuum procedures, which are ideal for simultaneous processing of multiple samples, yield pure DNA ready for direct amplification in just 20 minutes. The QIAamp spin procedures can be fully automated on the QIAcube® for increased standardization and ease of use (see page 15). The QIAamp procedure is suitable for use with fresh or frozen whole blood and blood which has been treated with citrate, heparin, or EDTA. Prior separation of leukocytes is not necessary. Purification requires no phenol/chloroform extraction or alcohol precipitation, and involves very little handling. DNA is eluted in Buffer AE or water, ready for direct addition to PCR or other enzymatic reactions. Alternatively, it can be safely stored at – 20°C for later use. The purified DNA is free of protein, nucleases, and other contaminants or inhibitors. DNA purified using QIAamp Kits is up to 50 kb in size, with fragments of approximately 20–30 kb predominating. DNA of this length denatures completely during thermal cycling and can be amplified with high efficiency. For purification of genomic DNA from blood for in vitro diagnostics in Europe, the QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit is CE-IVD-marked, compliant with EU Directive 98/79/EC. This kit is not available in the USA and Canada.

Principle and procedure

QIAamp DNA Mini and QIAamp DNA Blood Mini Kits are designed for rapid purification of an average of 6 µg of total DNA (e.g., genomic, viral, mitochondrial) from 200 µl of whole human blood, and up to 50 µg of DNA from 200 µl of buffy coat, 5×10^6 lymphocytes, or cultured cells that have a normal set of chromosomes. The

procedure is suitable for use with whole blood treated with citrate, heparin, or EDTA;* buffy coat; lymphocytes; plasma; serum; and body fluids. Samples may be either fresh or frozen. For larger volumes of whole blood or cultured cells, we recommend using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits. The QIAamp DNA Mini Kit performs all the functions of the QIAamp DNA Blood Mini Kit, and also allows rapid purification of DNA from solid tissue. On average, up to 30 µg of DNA can be purified from 25 mg of various human tissues.

Lysis with QIAGEN Protease or proteinase K

QIAamp DNA Blood Mini Kits contain QIAGEN Protease. Intensive research has shown that QIAGEN Protease is the optimal enzyme for use with the lysis buffer provided in the QIAamp DNA Blood Mini Kit. QIAGEN Protease is completely free of DNase and RNase activity. When using the QIAamp DNA Blood Mini Kit for a sample that requires a modified protocol, please contact our Technical Service Department for advice about whether your lysis conditions are compatible with QIAGEN Protease. When >8 mM EDTA is used in conjunction with >0.5% SDS,* QIAGEN Protease activity decreases. For samples that require an SDS-containing lysis buffer or that contain high levels of EDTA, the QIAamp DNA Mini Kit is recommended. The QIAamp DNA Mini Kit contains proteinase K, which is the enzyme of choice for SDS-containing lysis buffers used in the Tissue Protocol, but which performs equally well in the Blood and Body Fluid Protocol. The activity of the proteinase K solution is 600 mAU/ml solution (or 40 mAU/mg protein). This activity provides optimal results in QIAamp protocols.

Purification on QIAamp Mini spin columns

The QIAamp DNA purification procedure comprises 4 steps and is carried out using QIAamp Mini spin columns in a standard microcentrifuge, on a vacuum manifold, or fully automated on the QIAcube (see page 15). The procedures are designed to ensure that there is no sample-to-sample cross-contamination and allow safe handling of potentially infectious samples.

QIAamp Mini spin columns fit into most standard microcentrifuge tubes. In the spin protocol, due to the volume of filtrate, 2 ml collection tubes (provided) are required to support the QIAamp Mini spin column during loading and wash steps. For the vacuum protocol, a vacuum manifold (e.g., QIAvac 24 Plus manifold; see Ordering Information, page 68) and a vacuum pump capable of producing a vacuum of –800 to –900 mbar are required. Eluted DNA can be collected in standard 1.5 ml microcentrifuge tubes (not provided).

Adsorption to the QIAamp membrane

The lysate buffering conditions are adjusted to allow optimal binding of the DNA to the QIAamp membrane before the sample is loaded onto the QIAamp Mini spin column. DNA is adsorbed onto the QIAamp silica membrane during a brief centrifugation or vacuum step. Salt and pH conditions in the lysate ensure that protein and other contaminants, which can inhibit PCR and other downstream enzymatic reactions, are not retained on the QIAamp membrane. If the initial sample volume is larger than 200 µl, it will be necessary to load the lysate onto the QIAamp Mini spin column in several steps. If larger sample volumes are required, we suggest using QIAamp DNA Blood Midi or Maxi Kits (Midi: 1–2 ml; Maxi: 5–10 ml starting material).

Removal of residual contaminants

DNA bound to the QIAamp membrane is washed in 2 centrifugation or vacuum steps. The use of 2 different wash buffers, Buffer AW1 and Buffer AW2, significantly improves the purity of the eluted DNA. Wash conditions ensure complete removal of any residual contaminants without affecting DNA binding.

Elution of pure nucleic acids

Purified DNA is eluted from the QIAamp Mini spin column in a concentrated form in either Buffer AE or water. Elution buffer should be equilibrated to room temperature (15–25°C) before it is applied to the column. Yields will be increased if the QIAamp Mini spin column is incubated with the elution buffer at room temperature for 5 minutes before centrifugation. The eluted genomic DNA is up to 50 kb in length (predominantly 20–30 kb) and is suitable for direct use in PCR or Southern-blotting applications. If the purified DNA is to be stored, elution in Buffer AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0) and storage at –20°C is recommended. If high pH or EDTA affects sensitive downstream applications, use water for elution. However, ensure that the pH of the water is at least 7.0 (deionized water from certain sources can be acidic). DNA stored in water is subject to degradation by acid hydrolysis.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.