ALEXANDRE LA LUNA

**BUSCA DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À RESPOSTA AO
TRATAMENTO DO HCV GENÓTIPO 3**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo

2012

ALEXANDRE LA LUNA

**BUSCA DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À RESPOSTA AO
TRATAMENTO DO HCV GENÓTIPO 3**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger

Versão Original

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

La Luna, Alexandre.

Busca de fatores genéticos associados à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3 / Alexandre La Luna. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Krieger.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Epidemiologia genética.

Versão do título para o inglês: Search for genetic factors associated with treatment response in HCV genotype 3.

1. Epidemiologia (Genética) 2. Hepatite C 3. GWAS 4. SNP
5. Interferons 6. Ribavirina I. Krieger, Prof. Dr. Henrique II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB063/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alexandre La Luna.

Título da Tese: Busca de fatores genéticos associados à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3.

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Krieger.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 18 de novembro de 2010.

PARECER 974/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em 26.10.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: "Busca de fatores genéticos associados à falha/sucesso no tratamento do HCV genótipo 3" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. **HENRIQUE KRIEGER** e o aluno **ALEXANDRE LA LUNA**.

Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.10.2011**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **PAOLO M. A. ZANOTTO**
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

À memória da minha amada avó Terezinha Isse Latorre por tudo
o que me ensinou.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Dr. Henrique Krieger pela orientação, paciência, amizade e todos os ensinamentos a mim oferecidos.

Aos pacientes que concordaram em participar deste trabalho, fornecendo material para que esta tese pudesse ser realizada.

Ao Dr. Leandro Maza Garrido pelo constante acompanhamento e auxílio em todas as etapas deste trabalho.

À equipe da Casa de Hepatite de Santos, em especial ao Dr Élson, Simone e Maísa.

Aos médicos do Hospital Israelita Albert Einstein, em especial os Drs João Renato Pinho, Bianca Della Guardia, Marcio de Almeida e Roberta Sitnik pelo auxílio no delineamento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Antonio Malheiros, Carlos Kawamata, Fernando Azenha, Julia Pescarini, Lucas Pereira e Ricardo Ferreira, pela convivência durante todos esses anos.

Ao departamento de parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Instituto Nacional de Genética Médica e Populacional – INaGeMP.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pela ajuda financeira.

E a minha família.

RESUMO

La Luna, A. Busca de fatores genéticos associados à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Dentre os vários vírus causadores de hepatites, destaca-se o HCV, causador da forma C da doença. Pertence ao gênero Hepacivirus da família Flaviridae, com genoma constituído por uma fita simples de RNA. Apresenta grande variedade na sequência genômica, podendo ser classificado em seis genótipos e vários subtipos, variando em distribuição geográfica, rota de transmissão e resposta ao tratamento, sendo no Brasil os mais frequentes: 1, 3 e 2, respectivamente. Estima-se que haja entre 120 e 180 milhões de pessoas infectadas com o HCV no mundo, sendo que um percentual significativo - 30% a 40% - pode desenvolver doenças hepáticas como cirrose e câncer. No Brasil, calcula-se que de 0,8 e 3,5% da população esteja infectada pelo HCV. Dentre os infectados, cerca de 40% apresentam cura após o tratamento padrão. Recentemente, estudos demonstraram que os SNPs (polimorfismos de base única) rs8099917 e rs12979860 localizados próximos ao gene da IL28B indicam a variação de resposta à infecção e tratamento por pacientes contra o genótipo 1 do HCV, porém não para o genótipo 3 deste vírus. Este trabalho encontrou associação significativa entre resposta à infecção devida ao genótipo 3 pelo tratamento (PEG-INF e RBV) e o polimorfismo rs8099917 em uma amostra da população de Santos – SP. Para o polimorfismo rs12979860, esta associação somente foi encontrada ao se parear indivíduos para sexo, idade e grau de fibrose hepática, demonstrando a importância da retirada de efeitos de estratificação neste tipo de análise. Estes resultados se confirmaram em uma análise conjunta dos presentes dados com os de uma população da Bahia (Cavalcante et al., 2011). Além disso, fez-se um estudo GWAS a fim de se conhecer outras variações genéticas envolvidas nessa resposta que indicou a existência de alguns genes candidatos com sugestão de associação, dentre eles o da tiroglobulina.

Palavras-chave: HCV. Epidemiologia genética. SNPs. GWAS.

ABSTRACT

La Luna, A. Search for genetic factors associated with treatment response in HCV genotype 3. [Ph.D. thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Among the various viruses that cause hepatitis, there is HCV, which causes the C form of the disease. Belongs to the genus Hepacivirus of the family Flaviridae, with a genome consisting of single-stranded RNA. It presents a great variety in its sequence and they can be classified into six genotypes and several subtypes, varying in geographical distribution, route of transmission and response to treatment. In Brazil the most common genotypes are: 1, 3 and 2, respectively. It is estimated that there are between 120 and 180 million people infected with HCV worldwide, and that a significant percentage - 30% to 40% - can develop diseases such as cirrhosis and liver cancer. In Brazil, an estimated 0.8 and 3.5% of the population is infected with HCV. Of those infected, about 40% were cured after standard treatment. Recent studies have shown that SNPs (single nucleotide polymorphisms) rs8099917 and rs12979860, located near the gene IL28B, indicated that changes in the response to infection and treatment against the HCV genotype 1, but not for the genotype 3 of the virus. The study showed a significant association between response to infection due to treatment of genotype 3 (PEG-INF and RBV) and the rs8099917 polymorphism in a population sample from Santos - SP. The rs12979860 polymorphism association was only found when individuals are paired for sex, age and degree of hepatic fibrosis, demonstrating the importance of the withdrawal effects of stratification in this type of analysis. These results are confirmed by the joint analysis of this data and those from a population of Bahia (Cavalcante et al., 2011) in a meta-analysis. In addition, a GWAS was made in order to search for other genetic variations involved in this response. These analyses indicated the existence of some candidate genes, including thyroglobulin.

Keywords: HCV. Genetic epidemiology. SNPs. GWAS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação estrutural do HCV.....	19
Figura 2 - Esquema do ciclo de replicação do HCV	20
Figura 3 - Distribuição genotípica do HCV no mundo.....	23
Figura 4 - Evolução após exposição ao HCV.....	29
Figura 5 - Esquema da região do gene da IL28 no cromossomo 19.....	32
Figura 6 - Tela parcial gerada pelo programa PLINK apresentando a tabela com dados dos 220.442 SNPs encontrados, em ordem decrescente de significância....	54
Figura 7 - <i>Manhattan plot</i> – apresentação dos SNPs encontrados de acordo com valor de significância (p) calculado para cada um.....	55
Quadro 1 - Genótipos e principais subtipos do HCV.....	22
Quadro 2 - Classificação METAVIR do grau de atividade necroinflamatória	25
Quadro 3 - Classificação METAVIR do estágio de fibrose hepática	25
Quadro 4 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs12979860, no total de indivíduos da amostra.....	45
Quadro 5 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs12979860, para indivíduos pareados nos grupos caso e controle.....	45
Quadro 6 - Genótipos encontrados para o SNP rs12979860 nos grupos caso e controle (amostra total).....	46
Quadro 7 - Genótipos encontrados para o SNP rs12979860 nos grupos caso e controle para os indivíduos pareados.....	46
Quadro 8 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs8099917, no total de indivíduos da amostra.....	47
Quadro 9 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs8099917, para indivíduos pareados nos grupos caso e controle.....	47
Quadro 10 - Genótipos encontrados para o SNP rs8099917 nos grupos caso e controle (amostra total).....	48
Quadro 11 - Genótipos encontrados para o SNP rs8099917 nos grupos caso e controle para os indivíduos pareados.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Total pacientes HCV genótipo 3.....	43
Tabela 2 - Pacientes HCV genótipo 3 pareados por sexo, idade e grau de fibrose	44
Tabela 3 - Alelos presentes no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs12979860.....	49
Tabela 4 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia.....	50
Tabela 5 - Comparação dos indivíduos CC versus CT/TT no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs12979860.....	50
Tabela 6 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia.....	50
Tabela 7 - Alelos presentes no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs8099917.....	51
Tabela 8 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e Bahia.....	51
Tabela 9 - Comparação dos indivíduos TT versus GT/GG no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs8099917.....	52
Tabela 10 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia.....	52
Tabela 11 - SNPs com sugestão de associação à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3.....	57
Tabela 12 - SNPs com sugestão de associação à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3 em indivíduos genótipo TT para rs8099917.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FDA – “Food and Drug Administration”

GWAS – “Genome Wide Association Studies”

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IL28 – Interleucina 28

INF - Interferon

IRES – “Internal Ribosomal Entry Site”

JAK – “Janus Kinase”

MS – Ministério da Saúde

OR – “Odds Ratio”

ORF – “Open Reading Frame”

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PEG-INF- Interferon Peguilado

RBV – Ribavirina

RNA – Ácido Ribonucléico

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa

RVNS – Resposta Viral Não Sustentada

RVS – Resposta Viral Sustentada

SNP – “Single Nucleotide Polimorphisms”

UI – Unidade Internacional

WHO – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epidemiologia Genética	15
1.1.1 <i>SNP - Polimorfismos de Base Única</i>	15
1.1.2 <i>Estudos de Associação e GWAS</i>	17
1.2 O HCV	18
1.3 Genótipos do HCV	21
1.4 Epidemiologia do HCV	23
1.5 Classificação METAVIR	25
1.6 Tratamento	26
1.7 Fatores que interferem na evolução do HCV	29
1.7.1 <i>Variações genéticas do hospedeiro</i>	30
1.8 O interferon λ (INF-λ) e Hepatite C	32
1.9 SNP rs12979860	33
1.10 SNP rs8099917	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 <i>Casuística</i>	38
4.2 <i>Coleta e extração de DNA</i>	39
4.3 <i>Genotipagem por PCR – Real Time</i>	40
4.4 <i>Genotipagem de larga escala com microarranjos de DNA</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 <i>Seleção dos grupos caso e controle</i>	43
5.2 <i>Estudo de Associação por Varredura Genômica (GWAS)</i>	44

5.2.1 Marcador rs12979860.....	45
5.2.2 Marcador rs8099917.....	47
5.3 Meta-análise.....	49
5.3.1 Meta-análise - marcador rs12979860.....	49
5.3.2 Meta-análise - marcador rs8099917.....	51
5.4 Estudo de Associação por varredura genômica (GWAS).....	54
5.5 GWAS e IL28B.....	59
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

As Hepatites são doenças que acometem o fígado e podem ter diversas causas como uso abusivo de álcool, drogas e certos medicamentos, doenças hereditárias e auto-imunes, infecções virais, etc. Apesar da variação de causas, sabe-se que a forma mais comum de adquirir a doença é por meio de infecções virais.

Dentre as hepatites, destaca-se a forma C da doença, atingindo cerca de 180 milhões de pessoas em todo o mundo e sendo a principal causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. Seu agente etiológico é o HCV, que apresenta 6 genótipos distintos e varia conforme rota de transmissão e região geográfica.

Muito se tem avançado nos últimos anos no que se refere ao tratamento do doente, porém diversos fatores podem ainda estar por trás da resposta à infecção pelo vírus e que ainda não são totalmente claros (Honda et al., 2010). Um destes fatores que vêm sendo muito estudado ultimamente relaciona-se à busca de variações genéticas do hospedeiro associadas a tal resposta.

Seguindo esta abordagem, os estudos de associação por varredura genômica (GWAS) vêm sendo muito utilizados na busca de mecanismos genéticos por trás de características que vão, desde tumores (Onay et al., 2006) às infecções (Chapman e Hill, 2012). Para isso, procuram-se variações nas frequências de marcadores genéticos do tipo SNPs (polimorfismos de base única), comparando-se indivíduos afetados e controles não afetados e, assim, localizar possíveis genes candidatos associados à doença estudada.

Um gene candidato para o estudo da Hepatite C foi apontado em trabalhos recentes desenvolvidos por Ge et al. (2009), Rauch et al. (2010), McCarthy et al. (2010), Mangia et al. (2010), Montes-Cano et al. (2010), Thomas et al. (2010), dentre outros, que relacionaram polimorfismos na região do gene IL28B e sucesso ou falha na eliminação do vírus causador da hepatite C, seja por tratamento ou de forma espontânea, principalmente quando da infecção pelo genótipo 1 do HCV.

Esse gene - IL28B - está localizado no cromossomo 19q13 e é responsável por codificar uma proteína conhecida como interferon lambda tipo III (INF - λ 3) quando estimulado por infecções virais, como é o caso do HCV (Marcello et al., 2006) .

Diante do exposto, este trabalho utiliza ferramentas da epidemiologia genética a fim de tentar verificar se os achados na literatura para o genótipo 1 do HCV podem ser confirmados na infecção pelo genótipo 3, o segundo maior causador de infecções no Brasil e cujos estudos são menos frequentes. E, por outro lado, verificar se há evidências de outros polimorfismos genéticos envolvidos no fenótipo estudado, porém desconhecidos.

1.1 Epidemiologia Genética

A epidemiologia genética é uma ciência pautada na etiologia, na distribuição e no controle de doenças em grupos de indivíduos aparentados e procura conhecer as causas herdadas de doenças nas famílias e nas populações (Morton, 1982).

Baseando-se em fatos como: ocorrência de indivíduos com resistência ao contágio de uma doença infecciosa, variação étnica da prevalência/incidência, associação familiar e, entre polimorfismos e tais moléstias, pode-se inferir que certos genes proporcionam resistência a determinadas doenças infecciosas (Beiguelman, 1994; Krieger e Feitosa, 1999).

Desde a década de 1930, vários estudos indicam e confirmam a existência de mecanismos genéticos responsáveis pela resistência/suscetibilidade a doenças infecciosas (Beiguelman, 1994; Krieger e Feitosa, 1999). Dentre elas, a tuberculose (Bellamy et al., 2000; Comstock, 1978; Kallmann e Resner, 1942; Tosh et al., 2006), hanseníase (Beiguelman, 1965, 1968; Chakravarti e Vogel, 1973; Feitosa et al., 1995; Fitness et al., 2004), malária (Feitosa et al., 2002; Flori et al., 2003; Hill, 1996; James et al., 1932; La Luna, 2007), HIV (Carrington et al., 1999; Liu et al., 2006), hepatite B (Hill, 2006; Jiang et al., 2003; Lin et al., 1989), hepatite C (Mangia et al., 2010; McCarthy et al., 2008; Rauch et al., 2010) entre outras. Além disso, diversos estudos têm mostrado forte associação entre polimorfismos genéticos e a suscetibilidade a diversas doenças, não somente infecciosas (Onay et al., 2006).

1.1.1 SNP - Polimorfismos de Base Única

Dentre os conceitos presentes nos fundamentos da genética atual, os polimorfismos são variações de ocorrência natural e que em sua maioria não

causam efeito algum. Porém, alguns polimorfismos afetam a expressão e função de proteínas, resultando em fenótipos suscetíveis a doenças e/ou respostas diferenciadas a medicamentos (Walker e Rapley, 1999).

Destes polimorfismos, os SNPs, do inglês - *Single Nucleotide Polymorphisms* – podem ser traduzidos como variações de base única do DNA genômico que apresentem formas alternativas por substituição ou por inserção/deleção de um nucleotídeo, tendo o alelo menos presente uma frequência igual ou superior a 1% (Brokkes, 1999).

O Genoma humano é composto por mais de 3 bilhões de pares de bases de nucleotídeos, sendo que são estimados cerca de 12 a 16 milhões de SNPs, fazendo com que esse tipo de variação genética esteja entre as mais comuns nos seres humanos (Regateiro, 2007).

Essas variações são encontradas tanto nas regiões do genoma codificantes de proteínas (éxons – genes) quanto nas não codificantes (íntrons). Ocorrem a cada 1.000 a 1.200 pares de bases, aproximadamente (Altshuler et al., 2008; Venter et al., 2001) e estima-se que cerca de 2% dos SNPs apresentem certa importância (Orr e Chanock, 2008).

Essas pequenas diferenças fazem parte da variação herdada entre os indivíduos, podendo ser causa de resistência/suscetibilidade para determinadas doenças, bem como de resposta a medicamentos (Trotta et al., 2004).

Estudos de associação em larga escala (GWAS) utilizando SNPs são uma estratégia recentemente desenvolvida que tem apresentado resultados bastante significativos na identificação de fatores genéticos atuando em doenças como diabetes, obesidade, doença coronariana e o enfarte agudo do miocárdio, entre outras (Shen et al., 2008). Além disso, esta abordagem vem sendo utilizada no estudo de doenças infecciosas como é o caso da hepatite C (Ge et al., 2009; Rauch et al., 2010; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009).

Diversos estudos demonstraram que a presença de SNPs pode influenciar na resistência/suscetibilidade ao desenvolvimento ou prognóstico de doenças imunológicas, infecciosas e neoplásicas. Já foi descrita associação entre lúpus eritematoso sistêmico (Criswell et al., 2008), lepra (Mira et al., 2004; Zhang et al., 2009), malária (Jallow et al., 2009;), tuberculose (Thye et al., 2009), dengue (Hoang et al., 2010; Khor et al., 2011), alguns cânceres (Onay et al., 2006).

Há grandes esperanças, apesar da polêmica, de que o conhecimento do genótipo individual de cada paciente e dos seus SNPs forneça uma base para avaliar a suscetibilidade às doenças e permitir a melhor escolha de terapias para cada indivíduo (Wang et al., 2001).

1.1.2 Estudos de Associação e GWAS

Um tipo de estudo de associação relativamente novo e que vem sendo muito utilizado na última década na área da genética é o chamado GWAS. O termo vem do inglês, *Genome-Wide Association Study*, que pode ser traduzido como estudo de associação em genoma completo (Altshuler et al., 2008).

Esse tipo de estudo faz uma busca no genoma por variações de SNPs para comparar as frequências alélicas de marcadores polimórficos disponíveis em indivíduos (não relacionados) que possuam um determinado fenótipo (chamados casos) e em indivíduos que não apresentam o fenótipo estudado (chamados controles), a fim de identificar marcadores associados com tal característica.

Cada estudo do tipo GWAS pode localizar de centenas a milhares de SNPs ao mesmo tempo. A partir de diferenças significativas estatisticamente nas frequências apresentadas pelos SNPs nos grupos caso e controle, pode-se sugerir que estejam relacionados com uma determinada característica.

O primeiro estudo do tipo GWAS foi publicado em 2005 por Klein et al. e investigou pacientes com degeneração macular relacionada à idade. Foram encontrados dois SNPs que apresentavam alteração significativa de frequência alélica quando comparados com controles saudáveis.

A partir de então, muitos SNPs foram associados a doenças complexas tais como diabetes, aterosclerose, vários tipos de câncer, Parkinson além de doenças infecciosas, como a hepatite C (Feero et al., 2010; Goldstein, 2009; McCarthy et al., 2010). Em muitos casos, os SNPs podem não estar localizados em genes, mas sim em regiões regulatórias de proteínas com importância no fenótipo de interesse (Chen et al., 2010; Manolio, 2009).

Para o estudo GWAS utiliza-se o HapMap, que é um catálogo de variantes genéticas comuns que ocorrem nos seres humanos. Nesse catálogo podem ser encontradas as descrições das variantes, o local onde ocorrem e como estão

distribuídas nos indivíduos dentro das populações e entre as populações (a partir de quatro populações étnicas distintas) em diferentes partes do mundo (InternationalHapMapConsortium, 2005).

O Projeto HapMap tem como objetivo fornecer informações a respeito da relação de genes com o possível risco a algumas doenças para que outros pesquisadores possam concluir novas descobertas e, assim, proporcionar novos métodos de tratamento, diagnóstico e prevenção de doenças. Esse projeto foi apresentado a partir de um mapa detalhado do genoma humano com a organização de SNPs em blocos - chamados haplótipos (InternationalHapMapConsortium, 2005).

Haplótipos são séries de SNPs que tendem a ser transmitidos em conjunto e, seu conhecimento levou a seleção de alguns destes que podem ser utilizados como marcadores em todo o genoma para o estudo do tipo GWAS (Feero et al., 2010; Goldstein, 2009; McCarthy et al., 2008).

Até o final de 2011, centenas de milhares de indivíduos foram testados, em mais de 1.200 estudos do tipo GWAS realizados para mais de 200 doenças e características e, quase 4 mil associações com SNPs foram encontradas.

1.2 O HCV

O HCV - vírus causador da hepatite C - foi caracterizado em 1989, como sendo o agente etiológico responsável pela maior parte das hepatites virais não-A e não-B (Choo et al., 1989). Possui cerca de 50 nm, é constituído de uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA) de polaridade positiva que contém aproximadamente 9.600 nucleotídeos que codificam as informações para a replicação viral (McGarvey et al., 1998, Suzuki et al., 2007). Está envolvido por um nucleocapsídeo (core) que, por sua vez, é envolvido por um envelope protéico (Major e Feistone, 1997).

Este vírus é classificado como pertencente ao gênero *Hepacivirus* que, juntamente com os gêneros *Pestivirus* e *Flavivirus*, compreendem a família *Flaviviridae* (Murphy et al., 1995).

A cadeia de seu RNA é composta por duas regiões terminais altamente conservadas e não codificadoras (UTR) 5' e 3' e entre estas, uma única fase de leitura aberta (ORF do inglês *open reading frame*) que codifica uma poliproteína com cerca de 3.000 aminoácidos, dependendo do genótipo do HCV (Suzuki et al.,

2007). Esta poliproteína é clivada, no pólo N-terminal, em três proteínas estruturais, o nucleocapsídeo (C), envelope um (E1) e envelope dois (E2) envolvidas na organização arquitetural do HCV. No pólo carboxi-terminal a poliproteína é clivada em seis proteínas não-estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B, responsáveis pelo ciclo biológico do vírus (Figura 1) (McGarvey et al., 1998).

Figura 1 - Representação estrutural do HCV

FONTE: Adaptado de Cangussu (2008)

O HCV se replica preferencialmente nos hepatócitos e as mutações frequentes, em razão da heretogeneidade de seu genoma, podem explicar o escape do sistema imunológico do hospedeiro (Terrault e Wright, 1998).

O ciclo de replicação viral (figura 2) começa com a entrada do vírus na célula, através da interação das proteínas E1 e E2 do HCV com receptores CD81 ou LDL na membrana celular. Uma vez dentro do citoplasma, o RNA genômico do vírus é liberado e traduzido. A tradução é mediada pela interação entre a subunidade ribossomal 40S e o sítio de entrada ribossomal, ou IRES (*internal ribosomal entry site*) presente na região 5' UTR do RNA viral. A tradução do RNA do HCV gera uma poliproteína que é posteriormente processada e clivada em diversas proteínas funcionais pela ação de proteinases do hospedeiro e virais. A maioria das proteínas virais NS forma um complexo de replicação que, associado às membranas intracelulares, é responsável pela síntese do RNA viral. A proteína NS5B, que apresenta atividade de RNA polimerase RNA dependente, tem um papel fundamental neste processo. A síntese começa pela produção de uma cadeia de RNA intermediária de sentido negativo, que serve como fita molde para a síntese de grande quantidade de RNAs de sentido positivo. Estas cadeias de RNA de sentido

positivo são também traduzidas ou eventualmente empacotadas em novas partículas virais junto com proteínas estruturais do vírus. Este empacotamento ocorre provavelmente no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi. As partículas virais se acumulam no citoplasma em vesículas, que são posteriormente exportadas pela via secretora da célula hospedeira (Bartenschlanger et al., 2000; Shi et al., 2001).

A região 5'UTR (região 5' não traduzida) do HCV, medindo 341 nucleotídeos na maioria dos isolados virais, possui estrutura secundária complexa que inclui um sítio de entrada ribossomal (IRES), que regula a tradução do ORF nos ribossomos. Esta região 5'UTR mostra alto grau de conservação entre os diferentes isolados, apresentando geralmente mais de 90% de similaridade entre as diferentes seqüências (Bukh et al., 1992). A variabilidade da região 5'UTR foi analisada em detalhe por diversos autores, sendo descrita a relação entre diversos polimorfismos que ocorrem na mesma e os genótipos e subtipos virais (Smith et al., 1995; Stuyver et al., 1995).

Figura 2 - Esquema do ciclo de replicação do HCV

FONTE: Shi et al. (2001)

As principais vias de transmissão do HCV são: transfusão de sangue e hemoderivados (principalmente antes de 1992); transplantes de órgãos e tecidos; agulhas, seringas e ferimentos; uso de drogas injetáveis ou aspiradas; hemodiálise; tatuagens e *piercings*; e outras menos frequentes.

O risco de transmissão peri-natal do HCV por mães infectadas é de 5% ou menos (Ohto, 1994). Partos por cesárea parecem não diminuir este número, assim como não há relação entre o aleitamento materno e o risco de infecção para o bebê (Thaler et al., 1991).

Atualmente, o maior fator de risco à infecção em países industrializados se deve ao uso compartilhado de seringas entre usuários de drogas (Alter, 2007), sendo que a prevalência de infectados pelo HCV neste grupo pode chegar a 90% (Mathei et al., 2008).

Apesar da detecção da hepatite C aguda ser difícil, visto ser na maioria dos casos assintomática, 15 a 20% do total das hepatites agudas diagnosticadas são devidas ao HCV (Armstrong et al., 2000; Gerlach et al., 2003). O quadro de hepatite aguda ocorre, em geral, de 2 a 12 semanas após a exposição (média 7 semanas) e perdura de 2 a 12 semanas (Marcellin, 1999).

1.3 Genótipos do HCV

O HCV foi classificado em grandes grupos genéticos, denominados genótipos, que são numerados com algarismos arábicos na ordem de sua descoberta, e possuem divergência de 31% a 33% em sua sequência nucleotídica. As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da sequência de nucleotídeos entre 75% e 80%) são denominadas subtipos e são indicadas por letras (Simmonds et al., 1995, 2005).

Assim, são seis genótipos principais do HCV com diversos subtipos, sendo os principais apresentados no quadro 1 (1 a-c, 2 a-c, 2k, 3 a, 3b, 3k, 4a, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k), podendo chegar a mais de 50 subtipos (Simmonds et al., 2005). Além disso, há as chamadas quasispécies que são HCV geneticamente relacionados que ocorrem no mesmo paciente infectado resultante de mutações decorrentes da replicação viral.

Quadro 1 - Genótipos e principais subtipos do HCV

Genótipos	Subtipos					
1	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>			
2	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>k</i>		
3	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>k</i>			
4	<i>a</i>					
5	<i>a</i>					
6	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>d</i>	<i>g</i>	<i>h</i>	<i>k</i>

FONTE: Adaptado de Simmonds et al. (2005)

A distribuição dos vários genótipos e subtipos descritos do HCV apresenta variação geográfica significativa na frequência com que são encontrados.

Assim, os genótipos 1, 2 e 3 são predominantemente encontrados na Europa, no Brasil, no Japão e nos Estados Unidos; o genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire; o 5 na África do Sul e, finalmente o 6, na Ásia (Mcomish et al., 1994; Mellor et al., 1995; Nainan et al., 2006; Nguyen et al., 2005;) (Figura 3). Foram também caracterizados diversos subtipos pouco frequentes em locais específicos, como é o caso do subtipo 2k na Moldávia (Samokhvalov et al., 2000), dos subtipos 1c e 3k na Indonésia (Okamoto et al., 1990; Tokita et al., 1996) e do subtipo 3b no Japão (Chayama et al., 1994).

Figura 3 - Distribuição genotípica do HCV no mundo.

FONTE: Adaptado de World Health Organization (2009)

No Brasil, os genótipos mais frequentes são 1, 2 e 3 (Alvariz, 2004), sendo o 3 o segundo mais frequente entre os pacientes infectados (cerca de 30 %) – ficando atrás apenas do genótipo 1 (cerca de 65%) (Ministério da Saúde, 2008).

1.4 Epidemiologia do HCV

Estima-se que haja entre 120 e 180 milhões de pessoas infectadas com o HCV no mundo (Shepard et al., 2005; Thomas e Seef, 2005;), sendo que um percentual significativo - 30% a 40% - pode desenvolver doenças hepáticas como cirrose e câncer (Blackard, 2008).

A prevalência varia de 0,1 a mais de 22%, dependendo do país. A taxa estimada de incidência é de 1 a 3 casos por 100.000 indivíduos por ano (Shepard et

al., 2005), apesar desses valores serem provavelmente maiores pelo fato da infecção aguda ser assintomática na maioria dos casos.

Nações com as maiores taxas de prevalência estão na África e Ásia; regiões de menor prevalência incluem a América do Norte, oeste e norte da Europa e Austrália (Shepard et al., 2005).

Os índices de mais baixa prevalência indicam Alemanha (0,6%) (Palitzsch et al., 1999), Canadá (0,8%) (Zou et al., 2000), França (1,1%) (Desenclos, 2000), e Austrália (1,1%) (Law et al., 2003). Países com prevalência um pouco mais elevada são os Estados Unidos (1,8%) (Alter et al., 1999), Japão (1,5 a 3,3%) (Hayashi et al., 1994; Ito et al., 1991; Ohshima et al., 2000) e Itália (2,2%) (Puro et al., 1995). A China, cuja população contabiliza 20% da população mundial, possui prevalência de 3,2% (Xia et al., 1996) e a Índia, que também possui 20% da população do planeta, tem prevalência de 0,9% (Chowdhury et al., 2003). Os dados existentes para a Indonésia indicam uma prevalência de 2,1% (Sulaiman et al., 1995). No Paquistão, a maioria dos relatos indica que as taxas variam de 2,4 a 6,5 % (Khattak et al., 2002; Luby et al., 1997; Mujeeb et al., 2000; Sultana et al., 2000). No Egito, com população de 73 milhões de indivíduos, constatou-se soro-prevalência de 22%, a mais elevada do mundo (Frank et al., 2000).

Essas diferentes taxas de prevalência apresentadas pelos países se devem há diversos fatores, como evolução do vírus, eficiência na vigilância em bancos de sangue, em transplantes de órgãos e tecidos, diferenças em número de usuários de drogas intravenosas, além de maior ou menor exposição ocupacional dos trabalhadores da saúde, dentre outras.

No Brasil, calcula-se que de 0,8 e 3,5% da população, o que significa de 1,44 a 6,3 milhões de indivíduos, estejam infectados com o vírus da hepatite C (Reiche et al., 2008). Muitos destes indivíduos são positivos para HCV e não sabem, uma vez que esta infecção é assintomática na maior parte dos casos. De acordo com o DATASUS, em 2011 foram notificados 8.920 novas infecções pelo HCV no Brasil. Esse número é bastante preocupante quando comparado com a incidência de 2010, 2.617 casos.

1.5 Classificação METAVIR

A fim de se mensurar o grau de comprometimento hepático do fígado dos indivíduos infectados pelo HCV utiliza-se a chamada classificação METAVIR, onde se verifica o grau de atividade necroinflamatória (quadro 2) e o estágio de fibrose hepática (quadro 3). Esse dado é de grande importância no delineamento do tratamento do indivíduo portador da infecção, pois é um indicador de evolução da doença.

Quadro 2 - Classificação METAVIR do grau de atividade necroinflamatória

A0	Ausência de atividade inflamatória
A1	Atividade inflamatória discreta
A2	Atividade inflamatória moderada
A3	Atividade inflamatória acentuada

FONTE: Bedossa e Poynard (1996)

Quadro 3 - Classificação METAVIR do estágio de fibrose hepática

F0	Ausência de fibrose
F1	Fibrose portal sem septos
F2	Fibrose portal com raros septos
F3	Septos numerosos sem cirrose
F4	Cirrose

FONTE: Bedossa e Poynard (1996)

1.6 Tratamento

Desde a descoberta do HCV, o interferon foi o primeiro antiviral usado na terapia em pacientes portadores da infecção crônica (Zein e Zein, 2002), sendo posteriormente acrescentado um antiviral oral – ribavirina, com melhoria das taxas de resposta sustentada (Lauer e Walker, 2001).

O tratamento do doente se faz com aplicação três vezes por semana da combinação de Interferon alfa e Ribavirina (RBV), com duração que varia entre seis meses e um ano, conforme o genótipo do vírus e carga viral (McHutchison e Poynard, 1999).

Como alternativa mais eficaz, utiliza-se o Interferon-Peguilado (PEG-INF), com farmacocinética aperfeiçoada e administração única semanal, oferecendo maior tolerância e percentual de cura aos pacientes (Bailon e Berthold, 1998).

Com o advento da terapia combinada de PEG-INF e RBV as taxas de erradicação do vírus foram aumentadas, sendo que a taxa de resposta à terapia combinada é dependente também do genótipo viral como foi observado por diversos autores em diferentes regiões do planeta (Ghany et al., 2009; Yu e Chuang, 2009; Zeuzem et al., 2009).

Desde 2002, o esquema terapêutico adotado pelo Ministério da Saúde (MS) inclui o uso de PEG-INF e RBV durante 24 semanas nos pacientes portadores de HCV genótipos 2 e 3 e, durante 48 semanas nos portadores do genótipo 1 (Davis et al., 2003).

Segundo o MS, através da Portaria 863 de 4 de novembro de 2002, o tratamento é indicado para pacientes com: a) idade entre 12 e 70 anos para uso do INF e entre 18 e 70 anos para uso do PEG-INF; b) transaminases elevadas (pelo menos uma vez e meia acima do limite da normalidade em, no mínimo, três medidas nos últimos seis meses); c) RNA-HCV detectado no soro por técnica de PCR (qualitativo); d) biópsia hepática demonstrando fibrose pelo menos estágio 1 pela classificação de METAVIR (quadros 2 e 3) ou da Sociedade Brasileira de Patologia; e) ter contagem de plaquetas acima de $50.000/\text{mm}^3$ e de neutrófilos acima de $1.500/\text{mm}^3$ para o uso de INF; para o PEG-INF é necessário que haja plaquetas acima de $75.000/\text{mm}^3$ para cirróticos e de $90.000/\text{mm}^3$ para não cirróticos, além de neutrófilos acima de $1.500/\text{mm}^3$.

Ainda segundo a Portaria 863, o esquema terapêutico consiste em dose de INF com 3 milhões UI por via sub-cutânea três vezes por semana, e dose de 1.000 mg/dia de RBV por via oral para pacientes com menos de 75 kg e 1.250 mg/dia para aqueles com mais de 75 kg, para os genótipos 2 e 3. Para o genótipo 1, o protocolo preconiza PEG-INF-alfa2b na dose de 1,5 mcg/kg/semana ou PEG-INF-alfa2a na dose fixa de 180 mcg/semana e RBV nas doses acima citadas.

Considera-se o tratamento como eficaz quando há resposta virológica sustentada, ou seja, negativação do RT-PCR para HCV mantida por seis meses após o término do tratamento. Tal resposta ocorre em aproximadamente 40% de todos os pacientes tratados com associação de INF e RBV (e 10 a 20% com monoterapia), podendo chegar a até 70% quando se considera somente genótipos 2 e 3, e sendo mais baixa no genótipo 1 (Bacon e McHutchison, 2007).

Os pacientes que têm resposta sustentada geralmente se mantêm sem replicação viral por tempo indefinido e apresentam melhora bioquímica e histológica. Acredita-se, porém, que mesmo os pacientes que não apresentam resposta sustentada podem ter benefícios com o tratamento, já que estudos mostram melhora do padrão histológico (em até 60%) e redução na incidência de hepatocarcinoma nos pacientes tratados (MS, 2002).

Os critérios de exclusão do tratamento com PEG-INF são: a) tratamento prévio com INF associado à RBV; tratamento prévio com PEG-INF (associado ou não à RBV); b) tratamento prévio com monoterapia com INF, não obtendo resposta bioquímica ou virológica; c) pacientes em uso habitual de álcool nos últimos seis meses; d) uso de drogas ilícitas nos últimos seis meses; e) hepatopatia descompensada; f) pacientes transplantados (exceto fígado, em protocolos de pesquisa); g) cardiopatia grave; h) doença da tireóide descompensada; i) neoplasias; j) diabetes tipo I de difícil controle ou descompensada; k) convulsões não controladas; l) imunodeficiências primárias; m) homens e mulheres sem adequado controle contraceptivo; n) gravidez (Portaria 863).

O principal fator para perda de aderência ao tratamento é ocorrência de efeitos colaterais, tais como: anemia hemolítica, neutro e trombocitopenia, fadiga, prurido e erupção cutânea (McHutchison et al., 2002). Por outro lado, fatores que podem aumentar aderência incluem educação e motivação dos pacientes,

experiência do médico quanto à assistência dos efeitos colaterais dos medicamentos e encorajamento do paciente por parte de seu médico (Sangik e Afdhal, 2004).

Recentemente, novas drogas foram desenvolvidas com ação antiviral (Boceprevir e Telaprevir) e receberam aprovação da FDA (*Food and Drug Administration*) (Zeuzem et al., 2011). São inibidores de proteases virais destinados ao tratamento da infecção pelo genotipo 1 principalmente (que apresenta menores taxas de resposta viral sustentada), e devem ser administrados em conjunto com a terapia padrão (PEG-INF e RBV), o que torna o tratamento ainda mais caro.

A cura também pode ocorrer de maneira espontânea, isto é, sem a necessidade de tratamento. Diz-se cura espontânea – ou *clearance* espontâneo – quando há soropositividade para HCV, porém RNA-HCV negativo por mais de 12 meses após o teste inicial. Enquanto, considera-se hepatite crônica quando o indivíduo apresenta soropositividade para o RNA-HCV por mais de 12 meses após diagnóstico inicial (Di Iulio et al., 2011).

De 10 - 15% dos indivíduos com hepatite C aguda apresentam cura espontânea (Albert et al., 2002), sendo esta probabilidade maior nos casos sintomáticos comparativamente com as formas subclínicas ou assintomáticas (Gerlach et al., 2003; Hofer et al., 2003; Licata et al., 2003; Maheshwari et al., 2008). Nas formas sintomáticas, o *clearance* viral ocorre em quase metade dos casos, tendo lugar por volta da 10^a - 12^a semana após o início dos sintomas (Fig. 4).

Figura 4 - Evolução após exposição ao HCV

FONTE: Valente et al. (2010)

1.7 Fatores que interferem na evolução da Hepatite C

Vários fatores podem interferir na evolução do quadro da hepatite C. Dentre eles, destacam-se os seguintes:

- O genótipo viral é um preditor de resposta ao tratamento: pacientes infectados com genótipo 1 do vírus que são tratados por 48 semanas com PEG-INF e RBV têm uma taxa de RVS de 40 a 50%, enquanto pacientes com genótipo 2 ou 3 do vírus têm uma taxa de RVS de 70 a 80% após somente 24 semanas de terapia combinada (MS, 2002). Além do genótipo, níveis de RNA-HCV, presença de quasispecies e a co-infecção com diferentes genótipos do HCV podem piorar a evolução da doença em comparação com a monoinfecção (Forns et al., 1999). A biópsia hepática é o melhor preditor de progressão da doença (Gebo et al., 2002).

- A co-infecção com outros vírus causadores de hepatites e da imunodeficiência humana também pode influenciar na progressão da hepatite C, sendo mais rápida em indivíduos co-infectados pelo HIV (Benhamou et al., 1999; Strader et al., 2004). O dano hepático também é geralmente mais grave com

progressão mais rápida em indivíduos co-infectados por HBV/HCV (Tsai et al., 1997; Wong et al., 2000).

- Fatores ambientais e comportamentais como alcoolismo, uso de drogas e obesidade são de grande importância no desenvolvimento da hepatite C. Mesmo o consumo moderado de álcool aumenta a replicação do HCV, levando a progressão para a forma crônica da doença e acelerando o dano hepático (Gitto et al., 2009). Já a obesidade e o uso de drogas estão relacionados à falha no tratamento (Wong et al., 2000).

- Além dos fatores citados, aqueles relacionados ao hospedeiro têm sido muito estudados ultimamente, merecendo destaque para explicar algumas variações apresentadas pelo paciente como resposta à infecção viral e ao tratamento, como será visto a seguir.

1.7.1 Variações genéticas do hospedeiro

Alguns fatores individuais são considerados preditores do sucesso ao tratamento e de sua duração baseado na variedade de parâmetros do paciente e do vírus, como grau de fibrose hepático, genótipo do HCV, e cinética viral (Berg et al., 2003; Zeuzem et al., 2009).

Além disso, a idade e o sexo do paciente são de grande importância. A progressão mais rápida é observada em indivíduos do sexo masculino e com idades entre 40 e 55 anos (Svirlilh et al., 2007), enquanto a progressão mais lenta é vista em crianças (Child e Turcotte, 1964).

A ancestralidade genética do paciente também é um fator importante no desenvolvimento do tratamento. Pacientes afro-americanos com hepatite C crônica têm uma redução de quase 50% na taxa de RVS ao tratamento de PEG-INF e RBV em comparação com indivíduos de origem europeia (Conjeevaram et al., 2006; Muir et al., 2004).

No final de 2009, evidências que confirmam a existência de componentes genéticos do hospedeiro que contribuem para a resposta à infecção pelo HCV foram identificadas através do uso de GWAS.

Esses recentes estudos identificaram 9 marcadores do tipo SNPs (Figura 5.) que foram associados ao aumento de resposta viral sustentada ao tratamento ou à

falha na resposta viral. Além disso, alguns destes SNPs estão associados com *clearance* viral espontâneo (Thomas et al., 2009).

Verificou-se que esses SNPs estão localizados na região próxima ao gene da IL28B (codificador do INF - $\lambda 3$), sendo que os dois SNPs preditores mais fortes para a eliminação do HCV são rs12979860 na variante do alelo C e, rs8099917 no alelo T, localizados a 3 e 8 kb *upstream* do gene IL-28B, respectivamente (Rauch et al., 2010).

Os SNPs rs8099917 na variante T e rs12979860 na C apresentam frequência alélica alta em populações asiáticas e europeias quando comparados com populações africanas, sendo que este último SNP apresenta resposta relativamente desfavorável ao tratamento quando comparados com populações étnicas de origens diferentes. O SNP rs12979860 é relatado também como associado à resposta viral espontânea do HCV (Thomas et al., 2009). Já o alelo T do SNP rs8099917 está associado com resposta favorável ao tratamento combinado de PEG-INF e RBV (Akuta et al., 2006; 2007; Ge et al., 2009; Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009).

O teste genotípico da IL28B se mostrou de grande importância para determinar as chances de resposta viral sustentada, sendo um preditor mais importante do que, por exemplo, o nível de RNA viral, o estágio de fibrose, a idade e o sexo dos indivíduos, com maior relevância para a infecção pelo HCV genótipo 1 em comparação com as causadas pelos genótipos 2 e 3 (Mangia et al., 2010).

Verificou-se que pacientes infectados pelo HCV genótipo 1 que apresentavam SNPs do IL28B (preditores de boa resposta ao tratamento), alcançavam taxas de RVS comparáveis aos de “fácil tratamento” dos pacientes infectados pelo HCV genótipos 2 e 3 (Ge et al., 2009).

Esses achados levaram ao desenvolvimento comercial do teste para o genótipo rs1297860 da IL28B como prognóstico de resposta viral, fazendo com que o genótipo do paciente passasse a ser incluído no algoritmo do tratamento (Afdhal et al., 2010; Clark et al., 2011).

Figura 5 - Esquema da região do gene da IL28 no cromossomo 19

FONTE: Reynolds et al. (2011)

1.8 O interferon λ (INF- λ) e Hepatite C

O gene da IL28B codifica a Interleucina 28, que também é conhecida como o interferon lambda tipo III (INF- λ 3), que constitui a família dos INF - λ juntamente com o INF- λ 1 (codificado pelo IL29) e o INF- λ 2 (codificado pelo IL28A).

Os genes da IL28A, IL28B e IL29 estão localizados no cromossomo 19 em regiões muito próximas um do outro (Ank e Paludan, 2009). Os interferons (INFs) são classificados em três diferentes famílias: INFs tipo I (principalmente INF- α e β), INF tipo II (somente INF- γ) e INFs tipo III (INF- λ 1, 2 e 3) (Kawai e Akira, 2006). Devido a sua estrutura molecular, o INF-3 pertence à superfamília da interleucina-10 (IL-10), porém funcionalmente está mais relacionado ao INF tipo I, que apresenta um papel fundamental na resposta imune antiviral (Gad et al., 2009).

Deve-se destacar que variações encontradas próximas ao gene da IL28B associadas com resposta espontânea e ao tratamento não estão localizadas dentro de regiões codificadoras e sim, em regiões próximas ao gene da IL28B.

Dados de níveis de expressão de INF- λ 3 em pacientes com diferentes genótipos para IL28B permanecem conflitantes e, apenas alguns estudos encontraram maiores níveis de mRNA INF- λ 3 ou de proteína, no fígado ou no sangue, de pacientes com as formas dos alelos da IL28B para bons respondedores (Fukuhara et al., 2010; Honda et al., 2010; Langhans et al., 2011; Suppiah et al., 2009; Urban et al., 2010).

Os mecanismos biológicos por trás da associação entre polimorfismos de IL28B e o *clearance* ou resposta ao tratamento contra o HCV permanecem desconhecidos. A expressão de INF- λ 3 é induzida por infecção viral e ativa o gene Janus Kinase (JAK) – transdutor de sinal ativador de transcrição (STAT) de via antiviral, assim como INF- α por ligação a um complexo receptor diferente. Além disso, há evidência de que as isoformas de INF- α e INF- λ 3 possam exercer atividade anti-HCV *in vitro* por mecanismos distintos, porém complementares (Marcello et al., 2006).

Por outro lado, enquanto a associação da IL28B com resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo genótipo 1 do HCV se mostra confirmada em diversos estudos independentes, pouco é conhecido sobre a importância desses polimorfismos para a infecção pelos genótipos 2 e 3 (Rauch et al, 2010; McCarthy et al, 2010).

1.9 SNP rs12979860

O SNP conhecido como rs12979860, localizado 3 mil bases a montante do gene IL28B, mostrou associação com uma chance maior de *clearance* viral espontâneo e de resposta ao tratamento contra o HCV (Thomas et al., 2009). O *clearance* espontâneo do HCV ocorre em cerca de 15 a 50% de todos os indivíduos infectados, enquanto a maioria dos pacientes desenvolve infecção crônica. Thomas et al. (2009) demonstraram que o polimorfismo rs12979860 do IL28B está fortemente associado com a chance de *clearance* espontâneo em populações de ancestralidade africana ou europeia, com taxas de *clearance* aproximadamente três vezes maiores nos alelos CC quando comparados com os alelos CT ou TT.

Este mesmo genótipo CC também está relacionado a uma chance aproximadamente duas vezes maior de resposta ao tratamento da infecção pelo HCV com INF e RBV. Como o genótipo CC é mais frequente entre os indivíduos de ancestralidade europeia, este achado explica em parte, porque os índices de resposta são melhores entre as populações de origem europeia quando comparadas às populações de origem africana (Ge et al., 2009).

Thomas et al. (2009) também caracterizaram a frequência do polimorfismo rs12979860 na forma do alelo C versus o alelo T em diversas populações do mundo.

Frequências mais elevadas da forma protetora do alelo C foram observadas no Leste da Ásia, frequências intermediárias na Europa, e as mais baixas na África.

Diversos estudos (Lindh et al., 2010; McCarthy et al., 2010; Montes-Cano, 2010; Rauch et al., 2010; Sarrazin et al., 2011) relataram menores taxas do polimorfismo rs12979860 na forma C versus a forma T em pacientes infectados com o HCV genótipo 1 quando comparados com 2 ou 3. Por exemplo, em um grande estudo tipo coorte, o polimorfismo rs12979860 na forma CC foi encontrado em 42,7% dos pacientes infectados pelo HCV genótipos 2 e 3, em 33,9% dos pacientes genótipo 1 e em 49% dos indivíduos controle (não infectados) (Sarrazin et al., 2011). A frequência do alelo protetor C em pacientes HCV genótipo 2/3 próxima da dos indivíduos não infectados permite sugerir que as variações protetoras do IL28B promovem uma substancial vantagem em infectados HCV genótipo 1 em comparação com os genótipos 2 ou 3, ou que taxas de *clearance* espontâneo são maiores em infecções pelo HCV genótipo 1 (Lange e Zeuzem, 2011).

Há outros polimorfismos próximos ao gene da IL28B que também são preditores de resposta viral sustentada, é o caso do rs8099917 que quando na forma do alelo T é considerado genótipo favorável à eliminação do HCV (Suppiah et al., 2009; Tanaka et al., 2009).

1.10 SNP rs8099917

O polimorfismo rs8099917 ficou conhecido como alelo indicador de risco, pois a presença de pelo menos um alelo G está fortemente associada a não resposta ao tratamento do HCV na população japonesa (Tanaka et al., 2009). O alelo G deste polimorfismo é mais encontrado em populações asiáticas, sendo provavelmente por esta razão que a frequência deste alelo em estudos japoneses apareça mais elevada quando comparada com estudos de africanos, europeus e americanos (Abbas, 2011).

A frequência dos alelos varia entre os trabalhos de acordo com a população estudada, porém todos sugerem um risco significativo de os portadores de pelo menos um alelo G nesta posição do genoma, tornarem-se não respondedores à terapia contra o HCV.

Rauch et al. (2010) verificaram que há forte associação entre a presença do alelo G e progressão para forma crônica da hepatite C e/ou falha no tratamento em pacientes infectados pelos genótipos 1 e 4 do HCV.

Em pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 do HCV, o papel do polimorfismo rs8099917 ainda é incerto. A frequência de seus alelos em populações miscigenadas de diferentes regiões geográficas também não é totalmente conhecida. Não há dados demonstrando que polimorfismos do gene IL28B possam ser aplicados como preditores de resposta terapêutica do HCV em populações altamente miscigenadas por europeus, africanos e ameríndios (Cavalcante et al., 2011).

Cavalcante et al. (2011), estudando uma população miscigenada brasileira, encontraram alta frequência do alelo T e baixa do G em toda a população estudada. Observou-se uma frequência genotípica de indivíduos TT, TG e GG em portadores do genótipo 1 do HCV similar aos de portadores dos genótipos 2 e 3.

2 JUSTIFICATIVA

A hepatite C é um importante problema de saúde pública para o Brasil e o mundo, principalmente devido ao seu quadro assintomático que pode perdurar por anos, levando a graves danos hepáticos com necessidade de transplante em grande parcela dos pacientes.

O custo do tratamento convencional é bastante elevado (cerca de R\$23 mil/paciente), com diversos efeitos colaterais e sem garantia de cura para todos os infectados gerando, além disso, grande ônus ao Sistema de Saúde.

Estudos recentes demonstraram a importância de polimorfismos do gene da IL28B dos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 como preditor de sucesso ao tratamento com PEG-INF e RBV, porém, para a infecção devida ao genótipo 3 este poder de predição ainda não é claro.

3 OBJETIVOS

Verificar a existência de associações genéticas dos SNPs próximos ao gene da IL28B do hospedeiro atuando no desenvolvimento da infecção pelo HCV genótipo 3.

Procurar outros mecanismos genéticos do hospedeiro associados à resposta viral sustentada (RVS), ou não (RVNS), ao tratamento do HCV genótipo 3 com PEG-INF e RBV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este trabalho é fruto da colaboração entre o Laboratório de Epidemiologia Genética do Departamento de Parasitologia da Universidade de São Paulo – ICB - USP, o Instituto Nacional de Genética Médica Populacional - INaGeMP, o Hospital Israelita Albert Einstein e a Casa de Hepatite de Santos (Universidade Metropolitana de Santos – UNIMES).

A Casa da Hepatite, localizada na cidade de Santos – SP, é mantida pela UNIMES e coordenada pelos Drs. Elson Vidal Martins Júnior e Ricardo Leite Hayden.

Possui registro de cerca de 800 pacientes da Baixada Santista que passaram ou passam por tratamento, totalmente gratuito. Dentre estes, incluem-se àqueles infectados por todos os genótipos do HCV, bem como os co-infectados com HIV e HBV.

Estes registros fornecem uma série de informações como dados pessoais, clínicos, de tratamento, genotipagem e carga viral do HCV, dentre outras. Durante cerca de um ano, estes prontuários que estavam em papel, foram selecionados e digitados em planilha Excel e, com isso, foram relacionados 170 indivíduos infectados por HCV genótipo 3 aptos a fazerem parte na casuística.

Dos 170 indivíduos pré-selecionados, alguns foram excluídos deste estudo por não apresentarem informações completas sobre o tratamento, por não terem sido localizados, por recusa na participação do estudo, ou ainda por terem falecido.

Dessa maneira, a casuística completa foi composta de 76 indivíduos portadores do genótipo 3 do HCV e que apresentavam informações completas de carga viral e de tratamento, além do resultado do teste de PCR qualitativo após seis meses do término do tratamento. Esse resultado é o que determina a condição de respondedor (RVS) ou não respondedor (RVNS) ao tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde (2011).

Estes indivíduos foram convocados para coleta de cerca de 5 mL de sangue total para se realizar a extração de DNA que permitiu a genotipagem pela tecnologia de PCR em tempo real.

Em seguida, um estudo caso controle de associação do tipo GWAS foi realizado com essa amostra. Os indivíduos foram pareados de acordo com algumas informações levadas em consideração, uma vez que sabidamente interferem no sucesso ou falha do tratamento: o sexo, idade e o grau de fibrose hepática.

Destes indivíduos, 28 puderam fazer parte de um grupo **caso**, composto por pacientes que não apresentam resposta sustentada ao tratamento com Interferon Peguilado e Ribavirina e outro grupo, **controle**, composto por 28 pacientes que apresentavam resposta sustentada ao mesmo tratamento.

De posse destas informações e do DNA dos indivíduos, fez-se então a análise de varredura genômica segundo a técnica de microarranjos de DNA.

Deve-se destacar que todos os indivíduos que fizeram parte deste trabalho foram assistidos por uma equipe composta por enfermeira e médicos. Além disso, todos aceitaram espontaneamente participar do estudo tendo assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos sob Parecer nº 974 do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

4.2 Coleta e extração de DNA

Para a coleta do material dos pacientes selecionados utilizou-se tubo para coleta a vácuo com EDTA, que foi centrifugado a fim de se fazer a retirada da camada dos leucócitos para posterior extração do DNA.

A extração de DNA genômico foi realizada com Kit GE Healthcare (Illustra blood genomicPrep Mini Spin Kit), segundo as orientações do fornecedor, com utilização de 200µL do material extraído.

Feita a extração, o DNA foi eluído em água e teve a concentração ajustada para 50µg/µL, após determinação de concentração inicial com auxílio do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

4.3 Genotipagem por PCR - Real Time

Para esta etapa de genotipagem utilizou-se a tecnologia PCR tempo real, onde foram empregadas sondas do tipo TaqMan SNP Genotyping (*Life Technologies*) para determinação dos genótipos.

Esta metodologia tem por base a atividade exonucleotídica 5' da Taq DNA polimerase que promove a degradação da ligação da sonda que hibrida com a cadeia complementar, criando um sinal de fluorescência. Para este efeito são necessárias duas sondas TaqMan que irão diferir no local polimórfico, uma será complementar do alelo ancestral e a outra da sua variante. Estas duas sondas são marcadas com dois fluoróforos diferentes, um na extremidade 5', o "*reporter*", e outro na extremidade 3', o "*quencher*". Enquanto as sondas se mantêm intactas o "*quencher*" absorve a fluorescência emitida pela sonda "*reporter*". Durante a PCR e na fase de emparelhamento, as sondas TaqMan hibridam com a sua cadeia complementar. Durante a fase de extensão a sonda "*reporter*" é clivada pela atividade 5' da Taq DNA polimerase, e o fluoróforo é libertado, ocorrendo assim um aumento do sinal de fluorescência. Com o acúmulo do número de ciclos de PCR há o incremento da intensidade da fluorescência, sendo esta proporcional ao aumento do número de cópias amplificadas.

A genotipagem de cada amostra foi efetuada através da determinação da intensidade da fluorescência emitida. Um aumento do sinal de fluorescência de apenas um dos fluoróforos indica homozigose para um dos alelos, conforme a cor da fluorescência utilizada na marcação do respectivo alelo. Já o aumento das duas fluorescências é um indicativo da presença de heterozigose.

A determinação se fez em triplicata com equipamento Realplex Mastercycler (Eppendorf AG) com configuração para uso em placas de 96 poços. O volume final da reação foi otimizado para 12µL com quantidade de DNA individual de 2ng.

Para a desnaturação o programa inicia com temperatura de 95 °C a 10 minutos, seguida por 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos e 1 minuto a 60 °C para anelamento, extensão e detecção de fluorescência. Para a análise da imagem foi utilizado o programa 7500 System SDS versão 1.2.3 (*Life Technologies*).

4.4 Genotipagem de larga escala com microarranjos de DNA

O processo de genotipagem de SNPs é baseado em microarranjos de DNA (Genechip Mapping 250K Nsp I) com alta densidade de sondas compostas por oligonucleotídeos com cerca de 25 mer, sintetizados diretamente em sílica e capazes de fornecer genótipos de cerca de 260.000 SNPs humanos. Para tal, esse sistema utiliza a plataforma Genechip System (Affymetrix).

Seguiu-se o protocolo do fornecedor, cujo procedimento pode ser sumarizado a seguir:

- a) digestão de 250ng do DNA de cada amostra com a enzima NspI;
- b) ligação de adaptadores ao DNA digerido, que servirão como molde para iniciadores de reação de PCR;
- c) reação de PCR para amplificação do DNA digerido, favorecendo a amplificação de fragmentos entre 200 e 1200 pb;
- d) purificação do produto da reação de PCR;
- e) fragmentação do DNA com a enzima DNase I, de forma a se obter fragmentos menores que 180 pb;
- f) marcação do DNA fragmentado com um nucleotídeo biotinilado pela enzima TdT (Transferase de deoxinucleótidos terminal);
- g) hibridação do DNA marcado com o Genechip 250 K Nsp I a 50 °C por 16h;
 - a. lavagem e coloração do Genechip, usando o sistema biotina-streptavidina-ficoeritrina;
- h) leitura dos microarranjos no GeneChip Scanner 3000 7G;

Todas estas etapas foram realizadas segundo as recomendações contidas no manual do Genechip 500K Mapping Human.

Após a leitura dos microarranjos no GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix) um arquivo de dados brutos (de extensão '.dat') com dados da imagem lida é criado. Esse arquivo é processado pelo programa Affymetrix Gene Chip Command Console (AGCC) que gera um arquivo de texto (de extensão '.cel') onde são armazenadas informações acerca da intensidade do sinal em cada pixel dos arranjos. Entre os dados armazenados no arquivo '.cel' estão, para cada SNP, a intensidade do sinal, o desvio padrão da intensidade e o número de pixels utilizados no cálculo da intensidade. O arquivo armazena também informações a respeito do experimento

relacionado ao microarranjo, inclusive sobre a qualidade da leitura dos dados – chamado de “*call rate*”.

Os arquivos “.cel” são então analisados pelo programa Genotyping Console (GTC) da Affymetrix que utiliza o algoritmo BRLMM (Affymetrix, 2006) para obter os genótipos dos indivíduos a partir dos dados de intensidade dos pixels nos microarranjos. Os dados de varredura genômica foram então exportados para posterior análise de associação genética, com auxílio de ferramentas de análise do pacote de programas PLINK (Purcell, 2007).

Essa análise verifica, através de teste de independência, se as diferenças de frequências alélicas apresentadas entre os grupos caso e controle são significativas estatisticamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com intuito de facilitar a compreensão dos resultados que serão aqui apresentados, far-se-á a discussão pertinente a cada achado deste trabalho nesta mesma seção, conforme será descrito a seguir:

5.1 Seleção dos grupos caso e controle

Após levantamento prévio dos prontuários de 170 indivíduos com genótipo 3 do HCV, foram selecionados os que apresentavam informações completas de pelo menos um tratamento combinado com PEG-INF e RBV.

Além do tratamento incompleto, foram excluídos os indivíduos por óbito, perda de contato ou recusa na participação do estudo. Dessa maneira, restaram 76 indivíduos, os quais tiveram informações analisadas para sexo, idade e grau de fibrose hepática, uma vez que, conforme descrito anteriormente (Gebo et al., 2002; Svrtlih et al., 2007), estes são fatores primordiais na resposta ao tratamento.

Os dados obtidos desses 76 pacientes (tabela 1) confirmam, para essa amostra, o descrito na literatura, onde o grupo de pacientes não respondedores (RVNS) apresenta maior número de homens (82,5%), bem como graus mais avançados de fibrose hepática (41,7% $\geq$ F3), embora apenas em números absolutos, uma vez que o teste *t* para comparação destes grupos não tenha demonstrado significância, devido possivelmente ao pequeno número de indivíduos da amostra.

Tabela 1 - Total pacientes HCV genótipo 3

	RVNS	RVS	TOTAL	Teste <i>t</i> ou X^2
Feminino	17,5 %	28,2 %	22,8 %	1,414
Idade média	53,77 (DP 8,28)	51,18 (DP 6,84)	52,51 (DP 7,68)	0,223
F3 e F4*	41,7 %	15,8 %	28,4 %	1,377

*F3 e F4 referem-se a graus avançados de fibrose hepática na classificação METAVIR que vai de 0 a 4.

FONTE: La Luna (2012)

A par da importância desses fatores concomitantes, acima citados, os grupos caso e controle foram estabelecidos a partir da seleção dos indivíduos pareados por sexo, idade e graus de fibrose hepática. Com isso, retirou-se possível efeito de estratificação que pudesse surgir neste pareamento.

Dessa maneira, foi possível criar dois grupos com 28 indivíduos cada, conforme tabela a seguir:

Tabela 2 - Pacientes HCV genótipo 3 pareados por sexo, idade e grau de fibrose

	RVNS	RVS	TOTAL	Teste <i>t</i> ou X^2
Feminino	18 %	18 %	18 %	0,000
Idade média	53,46 (DP 9,68)	53,71 (DP 7,32)	53,59 (DP 8,50)	0,892
F3 e F4*	32%	29%	30%	0,084

*F3 e F4 referem-se a graus avançados de fibrose hepática na classificação METAVIR que vai de 0 a 4.

FONTE: La Luna (2012)

Para demonstrar a ausência de estratificação foram aplicados testes de independência apropriados para comparação das médias de idade dos grupos caso (RVNS) e controle (RVS) ($p > 0,37$) e de X^2 para as duas outras variáveis ($p = 1,0$ e $p > 0,77$), sexo e grau de fibrose, respectivamente.

Após o pareamento dos indivíduos para formação dos grupos caso e controle e da ausência de evidência de estratificação (tabela 2), pôde-se realizar o estudo de associação por varredura genômica, além da genotipagem por PCR – Real Time, demonstrados a seguir.

5.2 Genotipagem dos marcadores da IL28B

Para a genotipagem, pela metodologia TaqMan® - Life Technologies, foram utilizados dois marcadores distintos (rs12979860 e rs8099917). Ambos estão presentes no cromossomo 19 e são apresentados em alguns estudos (Ge et al., 2009; Rauch et al., 2010; Supiah et al. 2009; Tanaka et al., 2009;) como associados à resposta à infecção pelo HCV, principalmente para genótipo 1.

Apesar dos resultados não serem muito claros na indicação de associação entre IL28B e pacientes HCV genótipo 3, fez-se a genotipagem destes marcadores (rs1279860 e rs8099917) para os indivíduos desta amostra, uma vez que se trata de uma população de ancestralidade diferente das populações estudadas até o presente por Ge et al., 2009, Mangia et al., 2010; Rauch et al., 2010; McCarthy et al., 2010; Montes-Cano et al., 2010.

5.2.1 Marcador rs1279860

Os resultados de genotipagem de todos os indivíduos da amostra para o marcador rs1279860 (quadro 4), bem como para apenas os indivíduos pareados (quadro 5) estão apresentados a seguir:

Quadro 4 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs1279860, no total de indivíduos da amostra

	C	T
RVS	51	25
RVNS	43	33

N = 76

$\chi^2 = 1,78$; $p = 0,182$

FONTE: La Luna (2012)

Quadro 5 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs1279860, para indivíduos pareados nos grupos caso e controle

	C	T
RVS	41	15
RVNS	25	31

N = 56

$\chi^2 = 9,44$; $p = 0,002$

FONTE: La Luna (2012)

Pode-se verificar que não há significância estatística ($p = 0,182$) na comparação dos dados apresentados no quadro 4. Porém, quando se utilizam os

dados dos indivíduos após pareamento por sexo, idade e grau de fibrose (quadro 5), em que são retirados os possíveis efeitos de estratificação, evidencia-se a significância ($p=0,002$).

Vale ressaltar que, nos trabalhos existentes na literatura até o presente sobre este tema, os dados utilizados para estudo de associação contam com os indivíduos RVS versus RVNS como um todo, sem que se fizesse a retirada dos efeitos de estratificação, diferente deste trabalho em que se empregou o pareamento.

Quadro 6 - Genótipos encontrados para o SNP rs12979860 nos grupos caso e controle (amostra total)

	CC	CT/TT
RVS	19	19
RVNS	16	22

N = 76

$\chi^2 = 0,477$; $p = 0,489$

FONTE: La Luna (2012)

Quadro 7. Genótipos encontrados para o SNP rs12979860 nos grupos caso e controle para os indivíduos pareados

	CC	CT/TT
RVS	16	12
RVNS	8	20

N = 56

$\chi^2 = 4,667$; $p = 0,03$

FONTE: La Luna (2012)

Semelhante efeito de significância pode ser verificado quando comparamos os dados de genotipagem dos indivíduos pareados quanto à ausência ou presença dos alelos CC x CT/TT (quadros 6 e 7). Nota-se que o valor de p passa a ser significativo estatisticamente, de 0,489 para 0,03 após pareamento, apesar de não se mostrar significativo após aplicação da correção de Yates ($p = 0,058$).

Esses dados demonstram a importância do pareamento, onde foram retirados possíveis efeitos externos ao que realmente se queria colocar a prova, ou seja, as variações genéticas do hospedeiro.

Como descrito anteriormente, sabe-se que a presença da forma C do SNP rs12979860 está associada ao sucesso na eliminação do HCV, o que se confirmou na população deste estudo (quadros 5 e 7).

5.2.2 Marcador rs8099917

Os resultados de genotipagem de todos os indivíduos da amostra para o marcador rs8099917 (quadro 8), bem como para somente os indivíduos pareados (quadro 9) estão apresentados a seguir:

Quadro 8 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs8099917, no total de indivíduos da amostra

	G	T
RVS	10	66
RVNS	20	54

N = 76

$\chi^2 = 4,50$; $p = 0,034$

FONTE: La Luna (2012)

Quadro 9 - Resultado da contagem de alelos após genotipagem para o marcador rs8099917, para indivíduos pareados nos grupos caso e controle

	G	T
RVS	4	52
RVNS	17	39

N = 56

$\chi^2 = 8,44$; $p = 0,004$

FONTE: La Luna (2012)

Quadro 10 - Genótipos encontrados para o SNP rs8099917 nos grupos caso e controle (amostra total)

	TT	GT/GG
RVS	29	9
RVNS	20	18

N = 76

$\chi^2 = 3,67$; $p = 0,055$

FONTE: La Luna (2012)

Quadro 11 - Genótipos encontrados para o SNP rs8099917 nos grupos caso e controle para os indivíduos pareados

	TT	GT/GG
RVNS	24	4
RVS	13	15

N = 56

$\chi^2 = 7,97$; $p = 0,005$

FONTE: La Luna (2012)

Diferentemente da associação encontrada para o marcador rs12979860, em que somente se observa a significância após pareamento e a retirada de possíveis fatores de estratificação, para o marcador rs8099917, todas as associações se mostram positivas e significativas estatisticamente, mesmo com a aplicação da correção de Yates.

A importância do pareamento também se verifica para este último marcador, uma vez que a significância (p) se torna mais evidente após a retirada dos fatores de estratificação descritos.

Com isso, os dados de genotipagem do marcador rs8099917 para indivíduos infectados pelo genótipo 3 do HCV acima apresentados (quadros 8 a 11), coincidem com os encontrados para o genótipo 1 (Ge et al. 2010; Suppiah et al., 2010; Tanaka et al., 2010) e para os genótipos 2 e 3 (Mangia et al., 2010; Rauch et al., 2010), como bons marcadores de predição na eliminação do vírus.

Conforme descrito previamente, sabe-se que a presença da forma G do SNP rs8099917 está associada à maior chance de falha na eliminação do HCV.

5.3 Meta-análise

Compreende-se como meta-análise a utilização de toda a informação existente sobre a possível identificação de um gene principal oriundo de vários estudos. Sabidamente, características complexas são identificadas pela interação entre genes e ambientes. Assim, a meta-análise se propõe a juntar sinais relativamente fracos de estudos particulares, em um conjunto mais robusto de evidências sobre efeitos genéticos, bem como permitindo um arcabouço quantitativo para modelar a variabilidade entre estudos (Feitosa e Krieger, 2002).

Partindo-se do pressuposto da meta-análise e a fim de se tornar os resultados encontrados nas análises deste trabalho mais robustos, foram agregados os dados encontrados por Cavalcante et al. (2011), em estudo realizado com 56 indivíduos infectados pelos genótipos 2/3 do HCV provenientes do nordeste brasileiro. Os resultados desta meta-análise podem ser visualizados nas tabelas a seguir, bem como o teste de independência segundo Método de Woolf (1955), conjuntamente com testes de heterogeneidade.

5.3.1 Meta-análise - marcador rs12979860

O resultado da meta-análise de associação alélica entre os dados de Santos e da Bahia estão demonstrados na tabela 3, onde verificamos o p de 0,058, com tendência à associação, estando no limiar de significância.

Tabela 3 - Alelos presentes no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs12979860

Alelos	caso		controle		O.R.
	C	T	C	T	
Santos	43	33	51	25	1,565
Bahia	26	30	32	22	1,678
Total	69	63	83	47	1,612

$X^2 = 3,60$ $p = 0,058$

FONTE: La Luna (2012)

Tabela 4 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia

	χ^2	GL
Efeito	3,59*	1
Heterogeneidade	0,00**	1

* Significância de 1/1000

** Não significativa

FONTE: La Luna (2012)

Para a meta-análise dos indivíduos CC versus CT/TT, os dados de associação mostram o p de 0,062 (tabela 5) ou seja, no limiar de significância assim como para a análise alélica da tabela 3.

Tabela 5 - Comparação dos indivíduos CC versus CT/TT no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs12979860

	caso		controle		
Alelos	CC	CT/TT	CC	CT/TT	O.R.
Santos	16	22	19	19	1,375
Bahia	4	24	11	16	4,125
Total	20	46	30	35	1,971

 $\chi^2 = 3,49$ $p = 0,062$

FONTE: La Luna (2012)

Tabela 6 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia

	χ^2	GL
Efeito	3,11*	1
Heterogeneidade	1,87**	1

* Significância de 1/1000

** Não significativa

FONTE: La Luna (2012)

5.3.2 Meta-análise - marcador rs8099917

O resultado da meta-análise de associação alélica entre os dados de Santos e da Bahia são mostrados na tabela 7, onde verificamos o p de 0,007, indicando associação positiva e significativa.

Tabela 7 - Alelos presentes no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs8099917

Alelos	caso		controle		O.R.
	G	T	G	T	
Santos	20	54	10	66	0,409
Bahia	14	42	7	49	0,428
Total	34	96	17	115	0,417

$$X^2 = 7,36 \quad p = 0,007$$

FONTE: La Luna (2012)

Tabela 8 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia

	X^2	GL
Efeito	7,13*	1
Heterogeneidade	0,01**	1

* Significância de 1/1000

** Não significativa

FONTE: La Luna (2012)

Para a meta-análise dos indivíduos TT versus GT/GG, os dados de associação mostram o p de 0,002 (tabela 9), com associação significativa, assim como visto na análise alélica (tabela 7).

Tabela 9 - Comparação dos indivíduos TT versus GT/GG no total de indivíduos estudados em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011) - rs8099917

Alelos	caso		controle		O.R.
	GG/GT	TT	GG/GT	TT	
Santos	18	20	9	29	0,344
Bahia	14	14	6	22	0,272
Total	32	34	15	51	0,312

$X^2 = 9,55$ $p = 0,002$

FONTE: La Luna (2012)

Tabela 10 - Teste de heterogeneidade para as análises de Santos e da Bahia

	X^2	GL
Efeito	9,08*	1
Heterogeneidade	0,18**	1

* Significância de 1/1000

** Não significativa

FONTE: La Luna (2012)

Os dados gerados pela meta-análise dos achados deste trabalho e dos achados por Cavalcante et al. (2011) demonstram que o polimorfismo rs8099917 apresenta forte associação entre a presença do alelo G e o risco de não eliminação do HCV genótipo 3, o que já era observado em estudos conduzidos por Ge et al. (2010), Supiah et al. (2010), Tanaka et al. (2010), considerando o genótipo 1 do vírus, embora para o genótipo 3, isso não fosse totalmente conhecido.

Para o polimorfismo rs12979860, os dados da meta-análise não têm poder estatístico para afirmar a mesma associação, ficando apenas uma tendência à associação, o que pode ser visto com os valores de $p > 0,05$, encontrados nas tabelas 3 e 5. Apesar da associação significativa observada nas amostras antes da meta-análise, quando se faz a análise conjunta dos dados, isso não se mantém.

Os testes de heterogeneidade apresentados nas tabelas 4, 6, 8 e 10 demonstram que não há diferenças estatísticas entre as populações deste trabalho e as utilizadas por Cavalcante et al. (2011), condição que valida esta meta-análise.

Deve-se destacar que a maior parte dos estudos da IL28B e o HCV realizados até o presente se concentrou nas associações verificadas para os

indivíduos infectados pelos genótipos 1 e 4, responsáveis pela maior parcela das infecções pelo HCV.

Os efeitos de associação entre os polimorfismos da IL28B parecem ser atenuados quando observados na infecção pelo HCV genótipos 2 e 3 (Balagopal et al., 2010), com isso, mais estudos precisam ser realizados para esclarecer esta associação.

Estudos da IL28B focados em indivíduos infectados pelos genótipos 2 e 3 têm demonstrado resultados conflitantes e, com populações pequenas. O maior estudo realizado até o presente com estes genótipos foi o conduzido por Mangia et al. (2010), e incluiu 268 indivíduos infectados pelos genótipos 2/3 do HCV.

Estes indivíduos foram divididos em grupos. Os que receberam PEG-INF e RBV por um tempo padrão (24 semanas) e os que receberam por um tempo variável (12 semanas para resposta virológica rápida e 24 para os demais). Verificou-se que o genótipo da IL28B não foi associado com RVS em pacientes que receberam o tratamento de duração padrão ou que apresentaram resposta virológica rápida (12 semanas). Porém, houve forte associação entre IL28B e resposta ao tratamento entre pacientes que não apresentaram resposta virológica rápida e receberam o tratamento variado (24 semanas).

Outros estudos produziram resultados mistos. McCarthy et al. (2010) encontraram efeitos em haplótipos da IL28B semelhantes na RVS entre pacientes infectados pelo genótipo 1 e pelos genótipos 2/3 do HCV. Rauch et al. (2010) notaram uma tendência no efeito de haplótipo da IL28B em pacientes infectados pelos genótipos 2/3 do HCV, porém sem significância estatística. Por outro lado, Rallon et al. (2010), não encontraram associação entre haplótipo da IL28B e a resposta ao tratamento em pacientes infectados por HCV genótipo 3, assim como Montes-Cano et al. (2010), que também não associaram haplótipos da IL28B com RVS em um estudo coorte com pacientes espanhóis infectados por genótipos não-1 do HCV.

Apesar da ausência de informação de respondedor rápido para as amostras deste trabalho, pode-se verificar uma associação entre os polimorfismos da IL28B e os indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 na amostra estudada.

Diferentemente dos estudos realizados até agora, este trabalho demonstrou a importância do pareamento, em que ao se retirar os efeitos de estratificação, as associações se tornam significativas.

Devido às controvérsias encontradas em estudos realizados com o genótipo 3 do HCV, além das genotipagens segundo os dois marcadores conhecidos da literatura e apresentados anteriormente, fez-se um estudo de associação para o genoma completo em busca de outros possíveis mecanismos genéticos ainda desconhecidos e, que pudessem estar relacionados ao fenótipo estudado.

5.4 Estudo de Associação por Varredura Genômica (GWAS)

Para o estudo de associação GWAS, foram utilizados os dados resultantes da genotipagem de SNPs por microarranjos de DNA - Genechip Mapping 250K Nsp (Affymetrix).

Esses dados foram convertidos em arquivos compatíveis com o formato PLINK e, para aumentar a qualidade das análises a serem feitas, foram utilizados filtros para exclusão de SNPs que não fossem genotipados em no mínimo 95% das amostras; que apresentassem frequência alélica mínima (MAF) inferior a 1%; e em desvio de Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,001$).

A aplicação destes filtros é indicada por Ziegler et al. (2007) e se baseia na exclusão de possíveis falhas de genotipagens ocorridas durante o processo. Assim, após aplicação dos filtros descritos, foram incluídos na análise 220.442 SNPs.

Os dados dos mais de 220 mil SNPs encontrados são apresentados em uma tabela fornecida pelo PLINK (figura 5) em que as linhas representam cada um dos SNPs e, as colunas trazem informações de número do cromossomo, posição ocupada pelo SNP, alelos possíveis e suas frequências, além de valores de qui-quadrado, significância (p) e Odds Ratio para cada SNP. Com isso, essa tabela possui mais de 220 mil linhas.

Figura 6 - Tela parcial gerada pelo programa PLINK apresentando a tabela com dados dos 220.442 SNPs encontrados, em ordem decrescente de significância

Haploview 4.2 -- filtros_memosindCR.assoc
File Display Analysis Help

PLINK

CHROM	MARKER	POSITION	A1	F_A	F_U	A2	CHISQ	P	OR
12	rs11057381	124357857	G	0.5357	0.1607	C	17.35	3.111E-5	6.026
8	rs7827593	134024462	A	0.2692	0.0	G	17.32	3.154E-5	NaN
1	rs11581460	27242009	A	0.4464	0.09615	G	16.49	4.891E-5	7.581
5	rs4703156	100907855	T	0.6111	0.2321	G	16.23	5.618E-5	5.198
8	rs1961985	5809562	G	0.07692	0.4107	A	16.02	6.261E-5	0.1196
5	rs10044074	80763521	C	0.0	0.25	T	15.47	8.388E-5	0.0
8	rs1845040	19568392	C	0.5536	0.1964	T	15.24	9.477E-5	5.073
19	rs7258744	9534967	G	0.5556	0.1964	A	15.16	9.852E-5	5.114
19	rs7246415	9534981	A	0.5556	0.1964	G	15.16	9.852E-5	5.114
1	rs10753108	175630523	C	0.625	0.2593	T	14.89	1.142E-4	4.762
7	rs215675	32382997	G	0.07143	0.375	A	14.88	1.145E-4	0.1282
7	rs215676	32383151	A	0.07143	0.375	T	14.88	1.145E-4	0.1282
5	rs13157965	171484631	C	0.1071	0.4286	T	14.75	1.227E-4	0.16
X	rs2742611	143738222	G	0.3529	0.0	A	14.57	1.349E-4	NaN
8	rs2552159	3919778	C	0.1607	0.5	G	14.57	1.35E-4	0.1915
10	rs7079228	61607888	G	0.6296	0.2679	A	14.57	1.354E-4	4.647
17	rs2060551	75338410	C	0.3393	0.05357	T	14.48	1.416E-4	9.072
5	rs349329	100788078	G	0.625	0.2679	C	14.45	1.438E-4	4.556
7	rs387575	32383187	G	0.07143	0.3704	A	14.4	1.476E-4	0.1308
14	rs1018976	71306909	T	0.4259	0.1071	C	14.39	1.485E-4	6.183
7	rs6462352	32354345	T	0.01786	0.2679	C	14.29	1.566E-4	0.0497
7	rs6955946	32356039	A	0.01786	0.2679	G	14.29	1.566E-4	0.0497
7	rs6462353	32364143	C	0.01786	0.2679	T	14.29	1.566E-4	0.0497
3	rs1286841	25730461	A	0.3036	0.03571	G	14.26	1.591E-4	11.77
4	rs4695938	175567639	T	0.5536	0.2037	A	14.26	1.595E-4	4.847
X	rs7056426	38639856	C	0.5882	0.1471	T	14.23	1.616E-4	8.286
3	rs6419888	86961118	A	0.125	0.4464	G	14.18	1.666E-4	0.1771
10	rs705478	3582348	T	0.3929	0.08929	C	14.1	1.73E-4	6.6
3	rs9310023	86875458	A	0.1429	0.4643	G	13.68	2.164E-4	0.1923
3	rs9842925	86917446	C	0.1429	0.4643	T	13.68	2.164E-4	0.1923

Viewing 220442 results

Chr: Start kb: End kb: Filter:

Specify Marker: Remove Column:

FONTE: PLINK (Purcell et al., 2007)

Uma alternativa oferecida pelo PLINK para visualizar, de forma global, a associação desse universo de SNPs em um único gráfico é apresentado na Figura 6. Nela, o eixo das abscissas apresenta o número do cromossomo e, o eixo das ordenadas, o negativo do logaritmo do valor de p para cada um dos 220.442 SNP encontrados, representados pelos pontos coloridos. Este gráfico é conhecido como “*Manhattan plot*”.

Figura 7 - Manhattan plot – apresentação dos SNPs encontrados de acordo com valor de significância (p) calculado para cada um

FONTE: PLINK (Purcell et al., 2007)

A fim de se evitar erros do tipo I, em que se consideram hipóteses falsas como verdadeiras, preconiza-se aplicar a correção de *Bonferroni*. E para este universo de SNPs com testes múltiplos, o valor mínimo de significância esperado para associação entre os SNPs e a característica estudada seria $p < 0,05/220.442 = 2,27 \times 10^{-7}$.

Deve-se destacar que esse teste é extremamente conservador e requer grandes amostras, além do que, sua aplicação neste estudo poderia levar ao aumento de erros do tipo II, em que não seriam notadas associações genéticas.

Considerando-se que nenhum SNP apresentou o valor mínimo esperado para *Bonferroni*, decidiu-se utilizar uma correção menos drástica na tentativa de se encontrar SNPs candidatos. Dessa forma, foi empregado um limiar arbitrário de 1×10^{-4} e, a partir disto, foram selecionados SNPs para posterior acompanhamento (tabela 11).

Tabela 11 - SNPs com sugestão de associação à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3

Marcador	Localização Cromossômica	Valor de p	Gene/Região Regulatória	Posição
rs11057381	12q24.31	$3,111 \times 10^{-5}$	DNAH10	Intron
rs7827593	8q24.22	$3,154 \times 10^{-5}$	TG	intron
rs11581460	1p36.11	$4,891 \times 10^{-5}$	ENSR00000533198 NUDC	íntron
rs4703156	5q21,1	$5,618 \times 10^{-5}$	Pseudogene AC113380.1	< 20 kb
rs7258744	19p13.2	$9,852 \times 10^{-5}$	ZNF266	intron

FONTE: La Luna (2012)

A partir da indicação dos SNPs sugestivos, foram feitas consultas a bancos de dados do *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e do ENSEMBL na procura dos genes e/ou regiões regulatórias selecionadas próximas a regiões descritas na literatura e relacionados com a característica estudada. O resultado destas consultas está descrito abaixo, na ordem em que os SNPs são apresentados na tabela 11.

O SNP rs11057381, localizado no cromossomo 12q24.31 encontra-se em um íntron de um gene chamado DNAH10. Esse gene sintetiza uma proteína chamada Dineína que é uma classe de proteínas motoras associadas a microtúbulos, sendo encontradas em cílios e flagelos de algumas células. Maiti et al. (2000) verificaram que a proteína DNAH10 é altamente expressa no cérebro, testículos e traqueia.

O SNP rs7827593, localizado no cromossomo 8q24.22 encontra-se em um íntron de um gene chamado TG. Trata-se de uma tiroglobulina que é uma glicoproteína precursora dos hormônios T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina).

Estudo de Dumont et al. (1989) verificou que a TG pode apresentar três funções: ser precursor do hormônio da tireóide, promover armazenamento de iodo e armazenamento de hormônios tireoidianos inativos.

Doenças auto-imunes são comuns entre os indivíduos infectados pelo HCV, principalmente a de tireóide. Há diversos estudos demonstrando associação entre a doença auto-imune da tireóide e a infecção pelo HCV (Antonelli et al., 2004; 2006; Danilovic, 2010; Tomer et al., 2007).

Além disso, há evidências de que o aumento da produção de INF- α induzido por infecções virais ou devido ao tratamento possa desencadear não somente

tireoidite auto-imune, mas também as não-imunes, que regredem após encerramento do tratamento e da infecção (Prummel e Lauberg, 2003).

A sugestão de associação entre o SNP da região de um gene relacionado à tiroglobulina e o fenótipo estudado neste trabalho com relação à infecção pelo HCV merece atenção especial, no sentido de ampliar a amostra e verificar se esta indicação se mantém significativa.

O SNP rs11581460 localizado no cromossomo 1p36.11, encontra-se em uma região regulatória chamada ENSR00000533198 e em um íntron de um gene chamado NUDC. Esse gene foi identificado como regulador de movimento nuclear em ciclo de reprodução assexuada do fungo *Aspergillus nidulans*. Em humanos, a função desse gene relaciona-se à síntese de uma proteína responsável pelo movimento nuclear e se associa com dineína (Aumais et al., 2003).

Em estudo realizado por Miller et al. (1999), verificou-se que colônias de macrófagos aumentaram a expressão de NUDC e proteínas em linhas de células eritrocitárias.

A expressão de NUDC também foi significativamente aumentada em células da medula óssea de pacientes com leucemia linfoblástica aguda quando comparados com controles saudáveis, estando assim, associada a problemas na hematopoiese (Miller et al., 1999).

Em outro estudo, conduzido por Zhu et al. (2010), verificou-se interação entre NUDC e cerca de 130 diferentes proteínas, incluindo as chaperonas, as de citoesqueleto, as envolvidas em sinal de transdução, transporte, síntese e controle de ácido nucléico, de metabolismo celular e proteólises.

Já, Pan et al. (2005) verificaram associação entre desenvolvimento de megacariócito em humanos e de NUDC. A administração dessa proteína em ratos aumentou o número de plaquetas circulantes.

O SNP rs4703156, localizado no cromossomo 5q21.1 encontra-se a menos de 20kb de um pseudogene chamado AC113380.1, porém sem função definida descrita.

Finalmente, o SNP rs7258744, localizado no cromossomo 19p13.2, encontra-se no íntron do gene chamado ZNF266 e codifica uma proteína do tipo “dedo de zinco” que interage com ácido nucléico e tem funções diversas.

Análises por *northern blot* detectaram um transcrito principal ZNF266 em células HeLa, células U-937 e PMA induzido por U-937, com alta expressão em linhagens de monócitos e macrófagos (Abrink et al., 1995).

Na região contemplada por este SNP há alguns outros, alinhados verticalmente e bastante próximos (100 Kb *up* e *downstream*), sendo que todos eles estão relacionados a genes do tipo dedo de zinco (ZNF560, ZNF426, ZNF559, ZNF121, ZNF177), com funções semelhantes às descritas anteriormente para ZNF266. A proximidade com que aparecem estes SNPs pode indicar um desequilíbrio de ligação, com sugestão de associação a gene candidato devido à presença de mais de um SNP na região.

5.5 GWAS e IL28B

Deve-se destacar que os marcadores rs8099917 e rs12979860, ambos localizados no cromossomo 19 e distantes cerca de 5kb um do outro na região *upstream* ao gene da IL28, já descritos anteriormente como associados à resposta ao tratamento do HCV, não estão presentes do Genechip utilizado.

Os SNPs do cromossomo 19, presentes no Genechip em regiões mais próximas aos marcadores acima, estão distantes cerca de 20 kb (*downstream*) e com valor de p não significativo ($p = 0,616$).

Além das análises GWAS para os indivíduos pareados e demonstradas acima, fez-se uma análise alternativa descrita em pormenores a seguir.

A partir da indicação de trabalhos da literatura destacando o maior poder preditivo dos SNPs da IL28B associando o alelo G do polimorfismo rs8099917 ao risco de não eliminação do HCV e, dos dados de genotipagem tanto da amostra de Santos, quanto da meta-análise deste trabalho confirmando tal associação, fez-se uma nova análise GWAS, usando como critério de separação dos indivíduos caso e controle, o genótipo para este SNP.

Em um grupo foram incluídos os indivíduos alelos TT e RVS e, noutro os indivíduos TT e RVNS. De acordo com indicações da literatura (Rauch et al., 2010; Tanaka et al., 2010), aos indivíduos alelos TT - que eliminaram o vírus com maior eficiência – esperava-se que estivessem em maior número no grupo RVS. A partir desta abordagem, quis-se buscar novos polimorfismos além do IL28B, uma vez que

este, por si só, não explica a variação encontrada entre indivíduos TT nos grupos RVS e RVNS.

Foram incluídos 29 indivíduos com genótipo TT presentes no grupo RVS e 20 no grupo RVNS. Porém, nem todos apresentavam dados de genotipagem de SNPs por microarranjos de DNA (Genechip Mapping 250K Nsp).

Diante disso, foram incluídos no grupo RVS, 24 indivíduos e no grupo RVNS, 13. Após a análise GWAS para estes indivíduos, submetidos aos mesmos filtros descritos para a análise GWAS anterior, foram obtidos resultados de associação para 217.923 SNPs.

Empregando-se o mesmo limiar determinado para a análise GWAS dos indivíduos pareados, considerou-se como sugestão de associação os SNPs com $p < 1 \times 10^{-4}$. Dessa maneira, teriam destaque quatro SNPs, apresentados na tabela a seguir (tabela 12).

Tabela 12 - SNPs com sugestão de associação à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3 em indivíduos genótipo TT para rs8099917

Marcador	Localização Cromossômica	Valor de p	Gene/Região Regulatória	Posição
rs17154964	11q12.2	$1,441 \times 10^{-6}$	MS4A5, MS4A6E, MS4A5, MS4A41	< 50kb
rs7827593	8q24.22	$3,154 \times 10^{-6}$	TG	ínton
rs1286841	3p24.2	$1,471 \times 10^{-5}$	TOP2B	< 50kb
			NGLY1	
rs4145194	Xq21.33	$4,998 \times 10^{-5}$	-	-

FONTE: La Luna (2012)

Dentre os SNPs demonstrados na tabela 12, o que apresentou maior significância foi o rs17154964. Localiza-se no gene 11q12.2 e, na região compreendida entre 50 kb (upstream e downstream), há alguns genes da família MS4A (MS4A41, MS4A5, MS4A14, MS4A7, MS4A6E). Esses genes codificam proteínas de uma mesma família chamadas 4A, expressas em células hematopoiéticas e tecidos não-linfóides. São componentes de complexos celulares de superfícies envolvidos em transdução de sinal em diversas linhagens celulares. Liang et al. (2001) propuseram que o aumento da expressão destas células pode ocorrer em processos de oncogênese e embriogênese

O segundo SNP foi o rs7827593, localizado no cromossomo 8q24.22 em um íntron do gene da tiroglobulina (TG). Chamou a atenção a presença deste SNP nesta nova análise, uma vez que coincide com o que foi visto na análise GWAS realizada com os indivíduos pareados e descrita na tabela 11.

Uma vez que este SNP está relacionado à tiroglobulina e sabendo-se da associação entre doença auto-imune da tireóide e a infecção pelo HCV, conforme já descrito neste trabalho, a presença deste SNP com sugestão de associação nas duas análises GWAS merece destaque.

O terceiro SNP, rs4145194, está localizado no cromossomo 3p24.2 e, fazendo-se uma busca em uma região de 50kb, são encontrados dois genes.

Um destes é o gene NGLY1 (N-glycanase 1) que codifica uma enzima que pode atuar na mediação de degradação de proteossomo em glicoproteínas. O outro gene é o TOP2B ou topoisomerase. Esse gene codifica uma enzima chamada topoisomerase DNA, que controla e altera o estado topológico do DNA durante sua transcrição. Esta enzima está envolvida em processos de condensação, separação das cromátides e no alívio de tensão de torção que ocorre durante a transcrição e replicação do DNA.

Quanto ao último SNP selecionado, trata-se do rs4145194, que está localizado no cromossomo Xq21.33 onde não foram encontrados genes/regiões regulatórias descritos no limiar de até 50 kb (*upstream* ou *downstream*) para esta região, não podendo assim fazer afirmações quanto a seu efeito.

Diante dos resultados descritos, estudos envolvendo polimorfismos destas proteínas poderiam ser realizados em amostras independentes de forma a corroborar o poder das associações sugeridas.

6 CONCLUSÕES

A par das informações trazidas por este trabalho, pode-se concluir que:

- A presença de pelo menos uma forma do alelo G do marcador rs8099917 aumenta o risco de o indivíduo não responder à eliminação do HCV genótipo 3, nesta amostra da população brasileira.
- A associação indicada na literatura entre a presença dos alelos CC do marcador rs12979860 e eliminação do vírus HCV genótipo 1, foi confirmada para os indivíduos genótipo 3, após pareamento por sexo, idade e graus de fibrose.
- A meta-análise dos resultados de genotipagem para IL28B deste trabalho em conjunto com os apresentados por Cavalcante et al. (2011), mostrou significativa associação para o marcador rs8099917 e indicação de associação para o marcador 12979860.
- Uma vez que foram encontradas sugestões de associação entre o marcador rs7827593 localizado no cromossomo 8, relacionado à tiroglobulina, e a resposta ao tratamento com PEG-INF e RBV, poderíamos sugerir que alterações de função tireoideana podem estar relacionadas ao fenótipo aqui estudado.
- Devido às interações encontradas entre os SNPs localizados no cromossomo 19 em proteínas do tipo “dedo de zinco” correlacionadas (ZNF560, ZNF426, ZNF559, ZNF121, ZNF177), sugere-se um estudo de vias metabólicas a fim de se conhecer a ação de pequenos efeitos que, somados possam atuar em um efeito biológico importante, uma vez que essas proteínas são fatores de transcrição.

REFERÊNCIAS*

- Abbas Z. IL-28B polymorphism and response to anti-hepatitis C therapy. *J Pak Med Assoc.* 2011;61(7):621-2.
- Abrink M, Aveskogh M, Hellman L. Isolation of cDNA clones for 42 different Kruppel-related zinc finger proteins expressed in the human monoblast cell line U-937. *DNA Cell Biol.* 1995;14:125-36.
- Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, et al. Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010. *Hepatology*, 2011;53:336-45.
- Affymetrix, Inc. BRLMM: an improved genotype calling method for the mapping 500K array set. Technical Report, White Paper. Santa Clara:Affymetrix, Inc;2006.
- Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med.* 1999;341:556–62.
- Alter MJ. Epidemiology of Hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13(17):2436-41.
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science*, 2008;322:881-88.
- Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, et al. Predictive factors of virological nonresponse to interferon–ribavirin combination therapy for patients infected with hepatitis C virus of genotype 1b and high viral load. *J Med Virol.* 2006;78:83–90.
- Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, et al. Predictive factors of early and sustained responses to peginterferon plus ribavirin combination therapy in Japanese patients infected with hepatitis C virus genotype 1b: amino acid substitutions in the core region and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J Hepatol.* 2007;46:403–10.
- Albert A, Boccato S, Vario A, et al. Therapy of acute hepatitis C. *Hepatology*, 2002;36:S195-200.
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science*, 2008;322:881-88.
- Alvariz FG. Hepatite C Crônica: aspectos clínicos e evolutivos. *Mod hepatol.* 2004;30:20–32.
- Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors*, 2009; 35(1):82-7.
- Antonelli A, Ferri C, Pampana A, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med.* 2004;117(1):10-3.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, et al. Thyroid disorders in chronic hepatitis C virus infection. *Thyroid*, 2006;16(6):563-72. Review.

Armstrong GL, Alter MJ, McQuillan GM, et al. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology*, 2000;31(3):777-82.

Aumais, JP, Williams SN, Luo W, et al. Role for NudC, a dynein-associated nuclear movement protein, in mitosis and cytokinesis. *J. Cell Sci.* 2003;116:1991-2003.

Bacon BR, McHutchison JG. Into the light: strategies for battling hepatitis C. *Am J Manag Care*. 2007;13 suppl 12:S319-26.

Bailon P, Berthold W. Polyethylene glycol conjugated pharmaceutical proteins. *Pharm Sci Tedinol Today*. 1998;1:352–56.

Balogopal A, Thomas DL, Thio CL. IL28B and the control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, 2010;139:1865-76

Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol*. 2000;81:1631-48. Review.

Bedossa P, Poynard T. The METAVIR Cooperative Study Group. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 1996;24(2):289-93.

Bellamy R, Beyers N, McAdam KP, et al. Genetic susceptibility to tuberculosis in Africans: a genome-wide scan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(14):8005-9.

Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, et al. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. *Hepatology*, 2008;47(1):321-31. Review.

Beiguelman B. The genetics of resistance to leprosy. *Int J Lepr*. 1965;33(4):808-12.

Beiguelman B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet Med Gemellol*. 1968;17(4):584-94.

Beiguelman, B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética; 1994. 469 p.

Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus coinfecting patients. The Multiviric Group. *Hepatology*, 1999;30(4):1054-58.

Berg T, Kronenberger B, Hinrichsen H, et al. Triple therapy with amantadine in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C: a placebo-controlled trial. *Hepatology*, 2003;37:1359-67.

Brandao AB, Costa FS. Risk factors for hepatitis C virus infection among blood donors in southern Brazil: a case-control study. *BMC Gastroenterol*, 2002;2:18.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*, 1999;234(2):177-86.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(11):4942-46.

Cangussu LOF. Associação entre antígenos leucocitários humanos de classe II e a hepatite C crônica. Belo Horizonte: 2008. 82f. [manuscrito].

Carrington M, Nelson GW, Martin MP, et al. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*, 1999;283(5408):1748-52.

Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, 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 Int*. 2011;32(3):476-86.

Chakravarti MR, Vogel F. A twin study on leprosy. In: *Topics in Human Genetics*. New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart; 1973. p. 1–123.

Chapman SJ, Hill AV. Human genetic susceptibility to infectious disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(3):175-88.

Chayama K, Tsubota A, Koida I, et al. Nucleotide sequence of hepatitis C virus (type 3b) isolated from a Japanese patient with chronic hepatitis C. *J Gen Virol*. 1994;75:3623-28.

Chen R, Davydov EV, Sirota M, et al. Non-synonymous and synonymous coding SNPs show similar likelihood and effect size of human disease association. *PLoS One*, 2010;5(10):e13574.

Child CGI, Turcotte JG. Surgery and portal hypertension. In: Child CGI, editor. *The liver and portal hypertension*. Philadelphia: WB Saunders; 1964. p. 50-64.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989;244(4902):359–62.

Chowdhury A, Santra A, Chaudhuri S, et al. Hepatitis C virus infection in the general population: a community-based study in West Bengal, India. *Hepatology*, 2003;37:802–09.

Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG. IL28B Genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C Infection: the future of personalized HCV therapies. *Am J Gastroenterol*. 2011;106:38–45.

Comstock GW. Tuberculosis in twins: a re-analysis of the proposit survey. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117(4):621-24.

Conjeevaram HS, Fried MW, Jeffers LJ, et al. Peginterferon and ribavirin treatment in african american and caucasian american patients with hepatitis C genotype 1. *Gastroenterology*, 2006;131(2):470-77.

Contreras AM, Ochoa-Jiménez RJ, Celis A, et al. High antibody level: an accurate serologic marker of viremia in asymptomatic people with hepatitis C infection. *Transfusion*, 2010;50(6):1335-43.

Criswell L A. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 2008; 66(3):176-83.

Danilovic, DLS. Avaliação tireoidiana de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C: correlação com polimorfismos do gene CTLA4. [tese (doutorado em endocrinologia)]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DATASUS - Ministério da Saúde - Secretaria Executiva. Disponível em: www.datasus.gov.br

Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, et al. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003;38:645-52.

Desenclos JC. Epidemiology of hepatitis C. *Rev Prat*. 2000;50:1066–70.

Di Iulio J, Ciuffi A, Fitzmaurice K, et al. Estimating the net contribution of interleukin-28B variation to spontaneous hepatitis C virus clearance. *Hepatology*, 2011;53:1446–54.

Dumont JE, Vassart G, Refetoff S. Thyroid Disorders. In: Scriver, CR, Beaudet AL, Sly WS, et al. *The metabolic basis of inherited disease*. 6th ed. New York: McGraw Hill; 1989. p. 1854-61.

Feero WG, Gutmacher AE, Collins FS. Genomic Medicine: an updated primer. *N Engl J Med*. 2010;362:2001-11.

Feitosa MF, Borecki I, Krieger H, et al. The genetic epidemiology of leprosy in a Brazilian population. *Am J Hum Genet*. 1995;56:1179-85.

Feitosa MF, Alves FP, Moura MM, et al. A major genetic mechanism involved in resistance to malaria in Western Amazônia. *Int J Hum Genet*. 2002;2:77-80.

Fitness J, Floyd S, Warndorff DK, et al. Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the karonga district of Northern Malawi. *Am J Trop Med Hyg*. 2004;71:330-40.

Flori L, Sawadogo S, Esnault C, et al. Linkage of mild malaria to the major histocompatibility complex in families living in Burkina Faso. *Hum Mol Genet*. 2003;12:375-78.

Forns X, Purcell RH, Bukh J. Quasiespecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends microbial*. 1999;7(10):402:10.

Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, 2000;355:887–91.

Fukuhara TA, Taketomi T, Motomura S, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*, 2010;139(5):1577–85.

Gad HH, Dellgren C, Hamming OJ, et al. Interferon-lambda is functionally an interferon but structurally related to the interleukin-10 family. *J Biol Chem*. 2009;284(31):20869-75.

Ge D, Fellay J, Thompson A, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 2009;461(7262):399-401.

Gebo KA, Herlong HF, Torbenson MS, et al. Role of liver biopsy in management of chronic hepatitis C: a systematic review. *Hepatology*, 2002;36(5)Suppl 1:S161-72.

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*, 2003;125(1):80-8.

Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 2009;50(1):322.

Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: A mini-review. *Dig Liver Dis*. 2009;41:67-70.

Goldstein DB. Common genetic variation and human traits. *N Engl J Med*. 2009;360:1696-98.

Hayashi J, Nakashima K, Yoshimura E, et al. Detection of HCV RNA in subjects with antibody to hepatitis C virus among the general population of Fukuoka. *Jpn J Gastroenterol*. 1994;29:147–51.

Hill AV, Allsopp CE, Kwiatkowski D, et al. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature*, 1991;352:595-600.

Hill AVS. Aspects of genetic susceptibility to human infectious diseases. *Annu Rev Genet*. 2006;40:469-86.

Hill AVS. Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. *Parasitology*, 1996;112:S75-S84.

Hoang LT, Lynn DJ, Henn M, et al. The early whole-blood transcriptional signature of dengue virus and features associated with progression to dengue shock syndrome in Vietnamese children and young adults. *J Virol*. 2010;84(24):12982-94.

Hofer H, Watkins-Riedel T, Janata O, et al. Spontaneous viral clearance in patients with acute hepatitis C can be predicted by repeated measurements of serum viral load. *Hepatology*, 2003;37:60-64.

Honda M, Sakai A, Yamashita T et al. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of interferon therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2010;139:499-509.

Fukuhara TA, Taketomi T, Motomura S, et al. Variants in IL28B in liver recipients and donors correlate with response to peg-interferon and ribavirin therapy for recurrent hepatitis C. *Gastroenterology*, 2010;139:1577–85.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature*, 2005;437:1299-1320.

Ito S, Ito M, Cho MJ, et al. Massive seroepidemiological survey of hepatitis C virus: clustering of carriers on the southwest coast of Tsushima, Japan. *Jpn J Cancer Res*. 1991;82:1–3.

Jallow M, Teo YY, Small KS et al. Genome-wide and fine-resolution association analysis of malaria in West Africa. *Nat Genet*. 2009;41:657-65.

James SP, Nicol WD, Shute PG. A study of induced malignant tertian malaria. *Proc. R. Soc. Med*. 1932;25:1153-86.

Jiang Y, Wang Y, Liu T, et al. Association between HLA class II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World J. Gastroenterol*. 2003; 9:2221-25.

Johnson AD, O'Donnell CJ. An open access database of genome-wide association results. *BMC Med. Genet*. 2009;10:6.

Kallmann FJ, Reisner D. Twin studies on the significance of genetic factors in tuberculosis. *Am. Rev. Tuberc*. 1942;47:549-74.

Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol*. 2006;7(2):131-37.

Khattak MF, Salamat N, Bhatti FA, et al. Seroprevalence of hepatitis B, C and HIV in blood donors in northern Pakistan. *J Pak Med Assoc*. 2002;52:398–402.

Khor CC, Chau TN, Pang J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for Dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. *Nat Genet*. 2011;43:1139-41.

Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Science*, 2005;308(5720):385–89.

Krieger H, Feitosa MF. Genetic epidemiology of infectious disease. *Cienc. cul*. 1999;51:191-98.

Krieger H, Morton NE, Mi NP, et al. Racial Admixture in North-eastern Brazil, *Ann. Hum Genet*. 1965;29:113-25.

La Luna A. Estudo genético-epidemiológico do número de episódios de malária em uma amostra de Monte Negro, RO. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2007.

La Luna, A. Busca de fatores genéticos associados à resposta ao tratamento do HCV genótipo 3. [tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

Lange CM, Zeuzem S. IL28B single nucleotide polymorphisms in the treatment of hepatitis C. *J Hepatol.* 2011;55(3):692-701.

Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger S, et al. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *J Hepatol.* 2011;54(5):859-65.

Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345(1):41-52.

Law MG, Dore GJ, Bath N, et al. Modelling hepatitis C virus incidence, prevalence, and long-term sequelae in Australia, 2001. *Int J Epidemiol.* 2003;32:717-24.

Liang YH, Buckley TR, Tu LL, et al. Structural organization of the human MS4A gene cluster on Chromosome 11q12. *Immunogenet.* 2001;53(5):357-68.

Licata A, Di Bona D, Schepis F, et al. When and how to treat acute hepatitis C? *J Hepatol.* 2003;39:1056-62.

Lin TM, Chen CJ, Wu MM, et al. Hepatite B virus markers in Chinese twins. *Anticancer res.* 1989;9:737-41.

Lindh M, Lagging M, Norkrans G, et al. Observed and calculated interleukin-28B genotype frequencies in hepatitis C virus infection. *Hepatology.* 2010;52(5):1860-61.

Liu H, Carrington M, Wang C, et al. Repeat-region polymorphisms in the gene for the dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin-related molecule: effects on HIV-1 susceptibility. *J. Infect. Dis.* 2006;193:698-702.

Luby SP, Qamruddin K, Shah AA, et al. The relationship between therapeutic injections and high prevalence of hepatitis C infection in Hafizabad, Pakistan. *Epidemiol Infect.* 1997;119:349-56.

Maheshwari A, Ray S, Thuluvath PJ. Acute hepatitis C. *Lancet.* 2008;372:321-32.

Maiti AK, Mattei MG, Jorissen M, et al. Identification, tissue specific expression, and chromosomal localization of several human dynein heavy chain genes. *Europ. J. Hum. Genet.* 2000;8:923-32.

Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology.* 1997;25:1527-38.

Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatol.* 1999;30:984-89.

Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, et al. Interleukin-28B Polymorphism Determines Treatment Response of Patients With Hepatitis C Genotypes 2 or 3 Who Do Not Achieve a Rapid Virologic Reponse. *Gastroenterology*, 2010;139:821–27.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, 2009;461:747-53.

Marcellin P. Hepatitis C: The clinical spectrum of the disease. *J Hepatol.* 1999;31:9–16.

Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G et al. Interferons α and λ inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*, 2006;131:1887-98.

Mathei C, Van Dooren S, Lemey P, Van Damme P, Buntinx F, Vandamme AM. The epidemic history of hepatitis C among injecting drug users in Flanders, Belgium. *J Viral Hepat.* 2008;15:399–408.

McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet.* 2008;9(5):356-69.

McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, et al. Clinical advances in liver, pancreas, and biliary tract: replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology*, 2010;138:2307-14.

McGarvey MJ, Houghton M, Weiner AJ. Structure and molecular virology. In: Zuckerman AJ, Toma HC, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998. p. 253-70.

McHutchison JG, Poynard T. Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 1999;19 suppl 1:57-65.

McHutchison JG, Mannis M, Patel K, et al. Adherence to combination therapy enhances sustained response in genotype-1–infected patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002;123:1061–69.

McOmish F, Yap PL, Dow BC. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol.* 1994;32:884-92.

Mellor J, Holmes EC, Jarvis LM, et al. International HCV collaborative study group. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *J Gen Virol.* 1995;76:2493-507.

Miller BA, Zhang MY, Gocke CD, et al. A homolog of the fungal nuclear migration gene nudC is involved in normal and malignant human hematopoiesis. *Exp. Hemat.* 1999;27:742-50.

Ministério da Saúde, Programa Nacional de Hepatites Virais. Avaliação da assistência às hepatites virais no Brasil. Brasília: MS; 2002, p. 1-61.

Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Programa Nacional de Hepatites Virais. Hepatites Virais: o Brasil está atento. Brasília: MS; 2008, p. 25-35.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília: MS; 2011, p. 37-58.

Mira MT, Alcais A, Moraes MO, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, 2004;427(6975):636-40.

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, et al. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, 2010; 52:33-37.

Morton N. Outline of genetic epidemiology. New York: Karger; 1982. 245 p.

Muir AJ, Bornstein JD, Killenberg PG. Atlantic coast hepatitis treatment group. Peginterferon alfa-2b and ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C in blacks and non-Hispanic whites. *N Engl J Med*. 2004;350(22):2265-71.

Mujeeb SA, Shahab S, Hyder AA. Geographical display of health information: study of hepatitis C infection in Karachi, Pakistan. *Public Health*. 2000;114:413–15.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, et al. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol*. 1995;140:424-26.

Nainan OV, Alter MJ, Kruszon-Moran D, et al. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*, 2006;131:478-84.

NanoDrop Technologies. Disponível em: <<http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>>. Acesso em: 23 fev. 2012.

Nguyen MH, Keefe EB. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 3:97-101, 2005.

Ohshima S, Komatsu M, Nakane K, et al. Iatrogenic GB virus C/hepatitis G virus infection in an area endemic for hepatitis C virus. *J Hosp Infect*. 2000;44:179–85.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The vertical transmission of hepatitis C virus collaborative study group. *N Engl J Med*. 1994;330:744-50.

Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y. et al. The 5' terminal sequence of the hepatitis C virus genome. *Jpn J Exp Med.* 1990;60:167-77.

Onay VU, Briollais L, Knight JA, et al. SNP-SNP interactions in breast cancer susceptibility. *BMC Cancer*, 2006;6:114-30.

Orr N. e Chanock S. Common genetic variation and human disease. *Adv Genet.* 2008;62:1–32.

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G, et al. Occupational hepatitis C virus infection in Italian health care workers. *Am J Public Health.* 1995;85:1272–75.

Palitzsch KD, Hottentrager B, Schlottmann K, et al. Prevalence of antibodies against hepatitis C virus in the adult German population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11:1215–20.

Pan RM, Yang Y, Wei MX, et al. A microtubule associated protein (hNUDC) binds to the extracellular domain of thrombopoietin receptor (Mpl). *J. Cell. Biochem.* 2005;96:741-50.

Prummel MF, Laurberg P. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid.* 2003;13(6):547-51. Review.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81:559-75.

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G, et al. Occupational hepatitis C virus infection in Italian health care workers. *Am J Public Health.* 1995;85:1272–75.

Rallón NI, Naggie S, Benito JM, 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*, 2010;24(8):F23-9.

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*, 2010;138(4):1338-45.

Regateiro FJ. Manual de genética médica. Coimbra: Imprensa da Universidade, 2007. 496 p.

Reiche EMV, Bonametti AM, Morimoto HK, et al. Epidemiological, immunological and virological characteristics, and disease progression of HIV-1/HCV-co-infected patients from a southern Brazilian population. *Int J Mol Med.* 2008;21:387-95.

Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.* 2001;17:502-10.

Rosen HR, Gretch, DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol Med Today.* 1999;5:393-99.

Samokhvalov EI, Hijikata M, Gylka RI, et al. Full-genome nucleotide sequence of a hepatitis C virus variant (Isolate name VAT96) Representing a new subtype within the genotype 2 (Arbitrarily 2k). *Virus Genes*. 2000;20(2):183-87.

Sangik O, Afdhal NH. Antiviral therapy for treatment naive patients with hepatitis C virus. *Gastroenterol Clin N Am*. 2004;33:497–511.

Sarrazin C, Susser S, Doeiring A, et al. Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients. *J Hepatol*. 2011;54(3):1099–106.

Shen GQ, Rao S, Martinelli N et al. Association between four SNPs on chromosome 9p21 and myocardial infarction is replicated in an Italian population. *J Hum Genet*. 2008;53(2):144-50.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection, *Lancet Infect Dis*. 2005;5:558–67.

Shi ST, Lai MMC. Hepatitis C viral RNA: challenges and promises. *Cell. Mol. Life Sci*. 2001;58:1276–95.

Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology*, 1995;21:570-83.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, 2005;42:962-73.

Smith DB, Mellor J, Jarvis LM. Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. *J Gen Virol*. 1995;76:1749-61.

Sterling RK, Stravitz RT, Luketic VA, et al. A comparison of the spectrum of chronic hepatitis C virus between caucasians and african americans. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2:469-73.

Strader DB, Wright T, Thomas DL, et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology*, 2004;39(4):1147-71.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, et al. Hepatitis C virus genotyping by means of 5'-UR/core line probe assays and molecular analysis of untypeable samples. *Virus Res*. 1995;38:137-57.

Sulaiman HA, Julitasari, Sie A, et al. Prevalence of hepatitis B and C viruses in healthy Indonesian blood donors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89:167–70.

Sultana N, Qazilbash AA, Bari A. Prevalence of anti-hepatitis C antibodies in patients with liver disease. *Pak Armed Forces Med J*. 2000;50:9–13.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet.* 2009;41(10):1100-4.

Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, et al. Hepatitis C viral life cycle. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007;59:1200–12.

Svrtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, et al. Older age at the time of liver biopsy is the important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, 2007;54:2324-27.

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(10):1105-9.

Thaler MM, Park CK, Landers DV, et al. Vertical transmission of hepatitis C virus. *Lancet*, 1991;338:17-8

Terrault NA, Wringht TL. Viral hepatitis A through G. In: *Gastrointestinal and liver disease*. 5th. ed. Philadelphia: Saunders; 1998. Cap.68, p.1123-1170.

Tibbs C, Donaldson P, Underhill J, et al. Evidence that the HLA DQA1*03 allele confers protection from chronic HCV-infection in Northern European Caucasoids. *Hepatology*, 1996;24:1342-45.

Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2005;9:383-98.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 2009;461(7265):798-801.

Thye T, Nejntsev S, Intemann CD, et al. MCP-1 promoter variant -362C associated with protection from pulmonary tuberculosis in Ghana, West Africa. *Hum Mol Genet.* 2009;18:381–88.

Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, et al. Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the second (2e and 2f), tenth (10a) and eleventh (11a) genetic groups. *J. Gen. Virol.* 1996;77:293-301.

Tomer Y, Blackard JT, Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2007;36(4):1051-66. Review.

Tosh K, Campbell SJ, Fielding K, et al. Variants in the SP110 gene are associated with genetic susceptibility to tuberculosis in West Africa. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006;103:10364-68.

Trotta R, Donati MB, Iacoviello L. Trends in pharmacogenomics of drug acting on hypertension. *Pharmacol Res.* 2004;49(4):351-56.

Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, et al. Effect of hepatitis C and B virus infection on risk of hepatocellular carcinoma: a prospective study *Br J Cancer*. 1997;76(7):968-74.

Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 52;6:1888–96.

Valente C, Fernandes C, Trindade L. Hepatite C aguda no profissional de saúde - revisão a propósito de um caso clínico. *J Port Gastrenterol*. 2010;17(6):255-61.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001;291(5507):1304-51.

Walker MR, Rapley R. Guia de rotas na tecnologia do gene. São Paulo: Atheneu; 1999. 334 p.

Wang Z e Moult J. SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat*. 2001;17(4):263-70.

Welfman M, Brotodihardjo A, Crewe E. Coinfection with hepatitis B and C, C and D viruses result in severe chronic liver disease and responds poorly to interferon. *J Viral Hepat*. 1995;2:39–45.

Wong LL, Limm WM, Severino R. et al. Improved survival with screening for hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl*. 2000;6:320-25.

Woolf B. On Estimating the Relation between Blood Groups and Disease. *Ann Hum. Genet*. 1955;19(4):251-53.

World Health Organization. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat*. 1999;6:35–47.

Xia GL, Liu CB, Cao HL, et al. Prevalence of hepatitis B and C virus infections in the general Chinese population: results from a nationwide cross-sectional seroepidemiologic study of hepatitis A, B, C, D, and E virus infections in China, 1992. *Int Hepatol Commun*. 1996;5:62–73.

Yu ML, Chuang WL. Treatment of chronic hepatitis C in Asia: when East meets West. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:336–45.

Zein CO, Zein NN. Advances in therapy for hepatitis C infection. *Microbes Infect*. 2002;4:1237–46.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med*; 2011;364:2417-28.

Zeuzem S, Sulkowski M, Lawitz E, et al. Efficacy and Safety of Albinterferon Alfa-2b in Combination with Ribavirin in Treatment-Naïve, Chronic Hepatitis C Genotype 1 (Chc G1) Patients. *J Hepatol*. 2009;50:S377.

Zhang FR, Huang W, Chen MD, et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *N Engl J Med*. 2009;361:2609-18.

Zhu XJ, Liu X, Jin Q, et al. The L279P mutation of nuclear distribution gene C (NudC) influences its chaperone activity and lissencephaly protein 1 (LIS1) stability. *J. Biol. Chem*. 2010;285:29903-910.

Ziegler A, König IR, Thompson JR. Biostatistical aspects of genome-wide association studies. *Biom J*. 2008;50(1):8-28.

Zou S, Tepper M, El Saadany S. Prediction of hepatitis C burden in Canada. *Can J Gastroenterol*. 2000;14:575–80.