

LUCIANE LILIAN CRISTINA PATRICIO MARTINS

**Influência dos polimorfismos do gene IL-28B na
resposta à terapia com interferon peguilado e ribavirina
em pacientes tratados por hepatite C crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Dr. Evaldo Stanislau Affonso de
Araújo

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Luciane Lilian Cristina Patricio

Influência dos polimorfismos do gene IL-28B na resposta à terapia com interferon peguilado e ribavirina em pacientes tratados por hepatite C crônica / Luciane Lilian Cristina Patricio Martins. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Evaldo Stanislau Affonso de Araújo.

Descritores: 1.Interleucinas/genética 2.Hepatite C crônica/terapia
3.Polimorfismo de nucleotídeo único 4.Hepacivirus 5.Interferon-alpha/uso
terapêutico 6.Polietilenoglicóis 7.Ribavirina/uso terapêutico
8.Brasil/epidemiologia

USP/FM/DBD-168/14

*Aos meus avós Ruy e Ivanir, que hoje brilham no céu para iluminar minha vida
e meus caminhos.*

À minha mãe Cristina, que me incentivou sempre a trilhar a busca pelo saber.

*Sou do jeitinho que você me moldou mãe! Assim como meu nome diz, sou luz
para a sua vida, assim como você é para a minha.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela missão confiada a mim, por ter me dado força para superar as dificuldades encontradas ao longo do caminho. Em muitos momentos foi difícil, mas eu consegui.

Agradeço ao meu orientador Dr. Evaldo Stanislau Affonso de Araújo, pela orientação, amizade, por estimular meu interesse pelo conhecimento e principalmente por ter acreditado em meu potencial de uma forma que nem eu mesmo sabia que poderia corresponder.

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Alci Barone, por ter confiado em meu trabalho, pela disponibilidade e ensinamentos durante a realização desta dissertação.

Agradeço ao Msc. Carlos Eduardo de Melo pela ajuda na realização da parte prática deste trabalho e também pela amizade e conselhos.

Agradeço ao Dr. Celso C. Mazza e Dra. Fatima Mitiko Tengan, que me auxiliaram no recrutamento de pacientes.

Agradeço à enfermeira Marisa do Nascimento que colaborou nas coletas de sangue quando necessário.

Agradeço às amigas Sueli Fernandes e Danielli Botarelli Fragoso pelos momentos de descontração e acima de tudo pela amizade sincera construída no ambiente de trabalho.

À todos os membros do LIM-47 que colaboraram de alguma forma para a realização desta dissertação.

À Roseli Antonia Santo que dedicou seu tempo em ajudar e relembrar os prazos neste período de Pós-Graduação.

Agradeço principalmente aos pacientes envolvidos nesta pesquisa que disponibilizaram seu tempo para contribuir para a ciência.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de figuras	
Lista de quadros e tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	1
1.2 Virologia.....	2
1.2.1 Estrutura e organização do VHC.....	3
1.2.2 Ciclo de vida do VHC.....	5
1.2.3 Genótipos VHC.....	6
1.3 Transmissão.....	6
1.4 Diagnóstico.....	7
1.5 Resposta imune e princípios da terapia.....	8
1.6 Fatores de resistência do vírus e do hospedeiro.....	10
1.7 Interleucina 28B.....	11
1.7.1 <i>SNP</i> rs12979860.....	14
1.7.2 <i>SNP</i> rs8099917.....	16
1.7.3 <i>SNP</i> rs12980275.....	18
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Casuística.....	21
4.2 Aspectos éticos do estudo.....	22
4.3 Materiais.....	23
4.4 Métodos.....	23
4.4.1 Coleta de dados.....	23
4.4.1. Clínicos.....	23
4.4.1.2 Laboratoriais.....	23
4.4.1.3 Anatomia patológica.....	24

4.4.2 PCR VHC Qualitativo.....	24
4.4.3 PCR VHC Quantitativo.....	25
4.4.4 Genotipagem do VHC.....	25
4.4.5 Purificação de DNA.....	26
4.4.6 Quantificação de DNA.....	27
4.4.7 Análise dos polimorfismos do gene IL-28B por PCR em tempo real.....	27
4.4.8 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	33
6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	47
ANEXOS.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ABREVIATURAS E SIGLAS

3'NCR região 3' não codificadora

5'NCR região 5' não codificadora

ALT alanina amino transferase

AST aspartato amino transferase

BD bilirrubina direta

BI bilirrubina indireta

BT bilirrubina total

CD36 scavenger B1 humano

cDNA ácido desoxirribonucléico complementar

DAA direct antiviral agent – agente antiviral de ação direta

DNA ácido desoxirribonucléico

ELISA enzyme-linked immunosorbent assay

EPO eritropoetina

FAL fosfatase alcalina

G-CFS granulocyte colony -stimulating factor – filgastrina

GGT gama glutamil transferase

GWAS estudo de associação genômica ampla

Hb hemoglobina

HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HIV vírus da imunodeficiência humana

Ht hematócrito

IFN interferon

IFN- λ interferon lambda

IFN- α interferon alfa

IL-10 interleucina 10

IL-28B interleucina 28B

IRES sítio interno de entrada ribossomal

IRES sítio interno de entrada ribossomal

ISG gene estimulado por interferon

JAK janus quinase

LDLR receptor de proteína de baixa densidade

MHC complexo principal de histocompatibilidade

NK célula natural killer

NR não respondedor

PCR reação em cadeia de polimerase

PEG-IFN interferon alfa peguilado

RBV ribavirina

RFLP restriction fragment polymorphism

RFT resposta de final de tratamento

RNA ácido ribonucléico

RVNS resposta virológica não sustentada

RVPc resposta virológica precoce completa

RVPp resposta virológica precoce parcial

RVR resposta virológica rápida

RVRe resposta virológica estendida

RVS resposta virológica sustentada

SNP polimorfismo de nucleotídeo único

VHA vírus da hepatite A

VHB vírus da hepatite B

VHC vírus da hepatite C

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Organização do VHC.....	4
Figura 2	Modelo do papel do polimorfismo da IL-28B.....	13
Figura 3	PCR em tempo real, método Taq Man.....	28
Figura 4	Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação da sonda FAM.....	29
Figura 5	Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação da sonda VIC.....	30
Figura 6	Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação das sondas FAM e VIC.....	30
Gráfico 1	Polimorfismo rs8099917 relacionado a recuperação natural, após tratamento e falha terapêutica.....	17

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Dados confirmados por anti VHC/virologia no ano de 2011.....	2
Tabela 2	Efeitos do <i>SNP</i> rs12979860 após tratamento em pacientes espanhóis infectados pelo VHC.....	14
Tabela 3	Taxas de resposta virológica e genótipo IL-28B.....	15
Tabela 4	Distribuição dos 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV para hepatite C crônica segundo dados demográficos, clínicos e hábitos.....	34
Tabela 5	Análise univariada das características de 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV para hepatite C crônica segundo desfecho terapêutico.....	36
Tabela 6	Frequência dos genótipos dos <i>SNPs</i> rs12979860, rs8099917 e rs12980275, em 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV, segundo desfecho terapêutico.....	37
Tabela 7	Análise univariada da frequência dos genótipos do <i>SNP</i> rs12979860 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.....	38
Tabela 8	Análise univariada da frequência dos genótipos do <i>SNP</i> rs8099917 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.....	39
Tabela 9	Análise univariada da frequência dos genótipos do <i>SNP</i> rs12980275 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.....	40
Tabela 10	Análise do modelo de regressão logística múltipla envolvendo variáveis previamente analisadas ($p < 0,2$), tabelas 6 e 7 – inicial – e que mantiveram associação – final ($p < 0,005$).....	41
Tabela 11	Grau de fibrose hepática e características do grupo de estudo.....	55
Tabela 12	Presença ou ausência de esteatose hepática e características do grupo de estudo.....	55
Tabela 13	Descrição das medidas de função hepática segundo resposta ao tratamento e momentos de aferições.....	56
Tabela 14	Descrição das medidas hematimétricas segundo resposta ao tratamento e momentos de aferições.....	57

Tabela 15	Resultado das comparações múltiplas de alanina amino transferase entre os grupos de resposta e aferições.....	58
Tabela 16	Resultado das comparações múltiplas de aspartato amino transferase entre os grupos de resposta e aferições.....	59
Tabela 17	Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina direta entre os grupos de resposta e aferições.....	61
Tabela 18	Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina indireta entre os grupos de resposta e aferições.....	63
Tabela 19	Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina total entre os grupos de resposta e aferições.....	64
Tabela 20	Resultado das comparações múltiplas de gama glutamil transferase entre os grupos de resposta e aferições.....	66
Tabela 21	Resultado das comparações múltiplas de hemoglobina entre as aferições.....	67
Tabela 22	Resultado das comparações múltiplas de hematócrito entre as aferições.....	67
Tabela 23	Resultado das comparações múltiplas da contagem de leucócitos entre as aferições.....	68
Tabela 24	Resultado das comparações múltiplas da contagem de neutrófilos entre as aferições.....	68
Tabela 25	Resultado das comparações múltiplas da contagem de plaquetas entre os grupos de resposta e aferições.....	69
Quadro 1	Critérios de inclusão e exclusão.....	21
Quadro 2	Exames de função hepática e hematológica utilizados.....	24

RESUMO

Martins, LLCP. Influência dos polimorfismos do gene IL-28B na resposta à terapia com interferon peguilado e ribavirina em pacientes tratados por hepatite C crônica [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Introdução: Estima-se que a infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) acometa 3% da população global constituindo a maior causa de cirrose hepática e hepatocarcinoma. Nos pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC, a terapia em vida real com interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV) resulta em 30% a 50% de resposta virológica sustentada (RVS). Este desfecho é determinado por fatores de associados ao VHC (carga viral, genótipo, quasispécies), características do hospedeiro (etnia, gênero, fatores genéticos, comorbidades, adesão) e fatores ligados aos medicamentos. Estudos de associação genética ampla (GWAS) têm demonstrado que a presença dos polimorfismos (SNP) no gene da interleucina 28B (IL-28B) associam-se a resposta à terapia baseada em interferon. Os SNPs rs12979860, rs8099917 e rs12980275 têm sido amplamente estudados e pacientes com o perfil favorável têm maiores chances de alcançar a RVS ou a eliminação espontânea do VHC.

Objetivos: Avaliar a frequência relativa e a influência dos polimorfismos rs12979860 (C>T), rs8099917 (T>G) e rs12980275 (A>G) no gene IL-28B em brasileiros portadores de infecção crônica pelo VHC tratados com PEG-IFN/RBV em uma casuística de pacientes atendidos pelos médicos do Ambulatório de Hepatites DMIP/LIM-47 e avaliar retrospectivamente a possibilidade de predição de resposta à partir do perfil IL-28B na população estudada. **Materiais e Métodos:** Após aprovação ética, foram selecionados 171 pacientes com coleta retrospectiva e sistematizada das informações de interesse. O DNA destes pacientes foi purificado e foram desenhados primers e sondas específicas para a genotipagem dos SNPs através da técnica de reação em cadeia de polimerase em tempo real. **Resultados:** entre os SNPs selecionados na análise univariada rs12979860 e rs12980275 associaram-se com RVS ($p<0,05$). rs8099917 não teve associação com RVS. Na análise multivariada apenas rs12980275 manteve associação com RVS ($p<0,05$).

Conclusão: Ao contrário do descrito na Literatura Internacional nos pacientes brasileiros apenas o pouco estudado SNP rs12980275 associou-se à RVS.

Descritores: Interleucinas/genética; Hepatite C crônica/terapia; Polimorfismo de nucleotídeo único;.Hepacivirus; Interferon-alpha/uso terapêutico; Polietilenoglicóis; Ribavirina/uso terapêutico; Brasil/epidemiologia.

SUMMARY

Martins, LLCP. Influence of IL-28B gene polymorphisms in the response to pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Introduction: Currently, infection with hepatitis C virus (HCV) affects 3% of people worldwide, and is the major cause of chronic hepatitis C, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In patients infected by genotype 1 of HCV, 30%-50% of patients achieve sustained virological response, when they are treated with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV). This outcome is determined by VHC factors (mutations, genotype, quasispecies), host factors (gender, ethnic, genetic factors, comorbidities, adherence to treatment) and factors related to drugs. Genome wide association studies (GWAS) demonstrated that the presence of polymorphisms in interleukin 28B gene (IL-28B) are associated with response to interferon based therapy. SNPs rs12979860, rs8099917 and rs12980275 have been widely studied and patients with the favorable profile are more likely to achieve SVR. **Objectives:** To evaluate the relative frequency and influence of the polymorphisms rs12979860 (C>T), rs8099917 (T>G) and rs12980275 (A>G) in Brazilian patients treated for chronic hepatitis C with PEG-IFN/RBV, and to evaluate, retrospectively, the prediction of the response possibility from IL-28B profile in the selected patients. **Material and Methods:** It was selected 171 patients. Medical history was evaluated retrospectively. A real time polymerase chain reaction assay was realized in order to analyze the polymorphisms. **Results:** In univariate analysis the polymorphisms rs12979860 and rs12980275 were associated with SVR ($p<0,05$). The SNP rs8099917 was not associated with SVR. Multivariate analysis revealed that only rs12980275 maintained an association with SVR ($p<0,05$). **Conclusion:** It is described on international literature that rs12979860 is strongly associated with SVR, however in Brazilian patients only the less studied SNP rs12980275 was associated with SVR.

Descriptors: Interleukins/genetics; Hepatitis C, chronic/drug therapy; Polymorphism, single nucleotide; Hepacivirus; Interferon-alpha/therapeutic use; Polyethylene glycols; Ribaririn; Brazil/epidemiology.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos

A hepatite C é uma infecção causada pelo vírus da hepatite C (VHC). Caracteriza-se por um processo inflamatório, que pode evoluir para um quadro de fibrose hepática progressiva desencadeando em sua via final a cirrose hepática e o hepatocarcinoma. Aproximadamente 3% da população global, ou seja, aproximadamente 180 milhões de pessoas estão infectadas pelo VHC (Maekawa e Enomoto, 2009; Tang e Grisé, 2009; Lavanchy, 2011).

Estima-se que a hepatite C acometa aproximadamente quatro milhões de brasileiros. Segundo o Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, formulado pelo Ministério da Saúde, no período compreendido entre 1999 a 2010 foram confirmados 69.952 novos casos de hepatite C no Brasil. Cerca de 90% destes casos estão concentrados nas regiões sul e sudeste (**tabela 1**), sendo que os estados de São Paulo e Rio Grande do Sul destacam-se por possuírem o maior número de casos confirmados. Neste mesmo período verificou-se que é maior o número de pacientes com hepatite C, no gênero masculino e nas faixas etárias entre 50 a 59 anos, seguida de 40 a 49 anos.

Em outro estudo realizado acerca do perfil de mortalidade do brasileiro, 3,4% de adultos do gênero masculino faleceram em decorrência de cirrose hepática e outras doenças do fígado, sendo que o VHC é na atualidade a causa mais relevante desses agravos (Saúde Brasil, 2007; Lin; 2010).

Tabela 1. Dados confirmados por anti VHC / virologia no ano de 2011

Região	Casos confirmados
TOTAL	6.432
Região Norte	192
Região Nordeste	609
Região Sudeste	3.370
Região Sul	1926
Região Centro-Oeste	335

Fonte: Ministério da Saúde, 2012

1.2 Virologia

Na década de 1960, Blumberg e colaboradores (1965) descreveram o Antígeno Austrália como marcador da infecção pelo vírus da hepatite B (VHB). Na década de 1970, Feinstone e colaboradores (1973) descreveram o vírus da hepatite A (VHA) como agente causador da hepatite A. Mesmo conhecendo esses dois vírus, as hepatites pós-transfusionais ainda ocorriam sem a detecção de um agente específico, caracterizando assim a hepatite não-A não-B a partir de 1975 (Seef, 2009).

Apenas em 1989, Choo et al. identificaram o VHC, desde então reconhecido como o principal causador de hepatite não-A não-B, que foi renomeada “hepatite C”. O VHC foi classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, da família *Flaviridae* (Pawlotsky, 2004; Choo et al., 1989; Ramadori e Meier, 2001).

1.2.1 Estrutura e organização do VHC

O VHC possui uma fita simples de RNA, tem em média 9.400 nucleotídeos e é de polaridade positiva. É organizado em um região 5' região não codificadora (5'NCR), onde há uma única longa fase de leitura aberta (ORF), que compreende quase seu genoma todo, e que codifica uma poliproteína; e uma região 3' não codificadora (3'NCR) (Wohnsland et al., 2007; Perone et al., 2008).

A 5'NCR é uma região altamente conservada, importante para os processos de tradução e replicação viral. A tradução é mediada pelo sítio interno de entrada ribossomal (IRES), levando a síntese de aproximadamente 3.000 aminoácidos que formam a poliproteína, que posteriormente é clivada por proteases virais e do hospedeiro, gerando as proteínas estruturais (core, E1 e E2), proteína p7 e proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B). A região 3'NCR possui uma porção variável e uma porção conservada entre os diferentes genótipos do VHC, participando do processo de replicação viral (Zhang et al., 2008; Weiser e Tellinghuisen, 2012).

O core é uma proteína pequena, ligante de RNA e compõe a maior parte do nucleocapsídeo do VHC. Tem sido atribuída a esta proteína várias funções e ela interage com outras proteínas celulares. Pode-se ligar com a apolipoproteína II, participando do processo de esteatose e hepatocarcinoma (Tellinghuisen e Rice, 2002; Brass et al., 2006).

As glicoproteínas E1 e E2 são componentes do envelope viral. Juntas formam um complexo heterodimérico não covalente, formando “picos” na superfície do vírus (Cocquerel et al., 2001).

A p7 é uma proteína hidrofóbica localizada entre as regiões estruturais e não estruturais, pertencente à família das viroporinas. Participa dos processos de montagem e maturação do vírus, porém sua função nesses processos ainda não foi elucidada (Weiser e Tellinghuisen, 2012).

A proteína NS2 é essencial para a replicação do VHC, com atividade protease auto catalítica, que cliva a junção NS2-3 em cis, liberando a protease NS3, que cliva outros sítios na poliproteína (Weiser e Tellinghuisen, 2012).

A NS3 é uma proteína hidrofóbica que apresenta atividade serino protease e helicase, sendo que essas atividades ocorrem na presença do cofator NS4A, que é importante na replicação viral (Weiser e Tellinghuisen, 2012).

A NS4B é uma proteína integral de membrana e hidrofóbica. Sua expressão leva a formação de uma rede membranosa. Essa rede é derivada do retículo endoplasmático, e também é o local onde ocorre a replicação do RNA VHC (Brass et al., 2006; Weiser e Tellinghuisen, 2012).

A NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica. É essencial na replicação e montagem do VHC. Recentemente, foi descrita como um potencial regulador da replicação e montagem viral através da sua fosforilação, mas sua função ainda não é totalmente compreendida (Weiser e Tellinghuisen, 2012).

A proteína NS5B compreende a RNA dependente RNA polimerase, que é extremamente importante para a replicação do VHC (Brass et al., 2006).

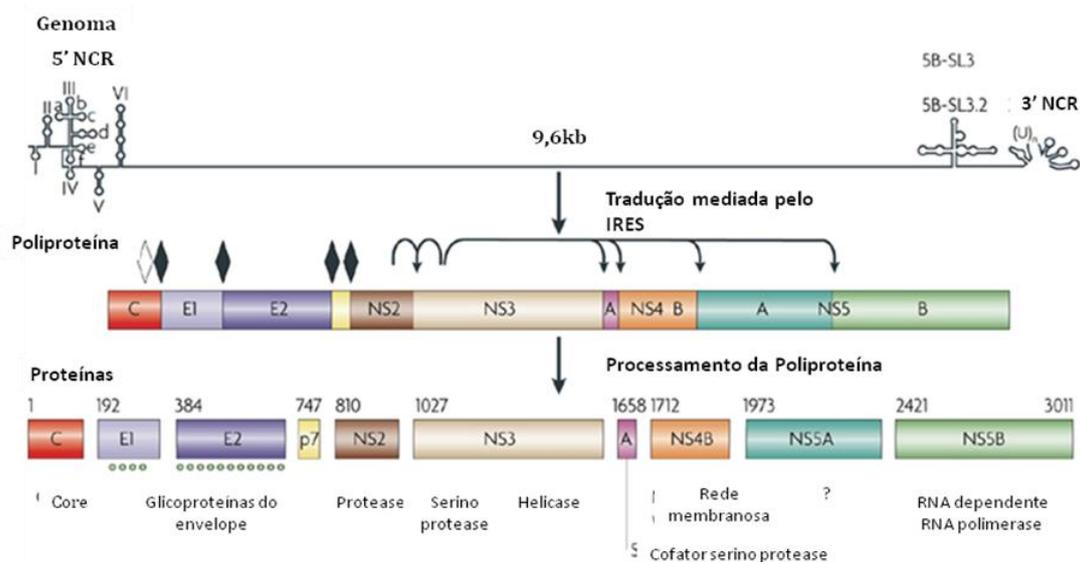


Figura 1: Organização do VHC
Fonte: Adaptado de Moradpour et al., 2007

1.2.2 Ciclo de vida do VHC

O ciclo replicativo do VHC inicia-se pela ligação do vírus à célula hospedeira. Em seguida, a partícula viral é introduzida na célula através dos seguintes receptores celulares: receptor de proteína de baixa densidade (LDLR), proteína de junção celular Claudin-1, tetrapanina CD81 e o scavenger B1 humano (CD36). Dentro da célula, o vírion é liberado após a perda do envelope viral, iniciando o processo de tradução. O genoma do VHC traduz-se em uma grande poliproteína que é clivada, formando as proteínas virais (estruturais e não-estruturais). Após a tradução ocorre o processo de replicação viral, cujo mecanismo ainda não é completamente compreendido. Acredita-se que o ácido ribonucléico (RNA) VHC seja um molde para a síntese da fita negativa intermediária; em seguida essa fita negativa é utilizada como molde para a produção de várias fitas positivas que posteriormente serão utilizadas para a tradução da poliproteína. Na etapa final do ciclo de vida do VHC, ocorre a montagem das partículas virais e a liberação do vírion. Essa etapa depende da via de secreção das lipoproteínas, que necessita da proteína transferidora microssomal de triglicerídeos (responsável pela transferência de lipídios até as partículas nascentes de apolipoproteína B). Caso esse processo não aconteça, a poliproteína é degradada (Moradpour et al., 2007; Dubuisson et al., 2008; Suzuki et al., 2007; Chevaliez e Pawlotsky, 2012).

O conhecimento do mecanismo de replicação viral é essencial nos dias de hoje para o desenvolvimento de agentes antivirais de ação direta (*DAAs*). Essas drogas agem durante a replicação viral, em alvos como a ligação e entrada do vírus na célula, transcrição, processamento da poliproteína, montagem e liberação do vírus. Os primeiros *DAAs* - inibidores de protease - já são administrados conjuntamente aos agentes não específicos que são utilizados há mais tempo aumentando a eficácia da terapia, reduzindo a intolerância ao tratamento e abreviando a duração do mesmo (O'Leary e Davis, 2010).

1.2.3 Genótipos VHC

Devido a grande heterogeneidade do vírus, ele pode ser dividido em seis genótipos classificados de 1 a 6, e mais de 50 subtipos representados por letras minúsculas (exemplo: 1a, 2b...). No Brasil, os genótipos mais comuns são 1, 3 e 2 (Campioto, 2005).

Em um estudo realizado por Cavalheiro et al. (2008), foram analisados os genótipos de 2.155 indivíduos portadores de VHC atendidos no ambulatório de moléstias infecciosas e parasitárias do Hospital das Clínicas na cidade de São Paulo, e constatou-se que durante o período de 1999 até 2007, 74,4% dos infectados possuíam genótipo 1, 4,2% possuíam genótipo 2 e 20,4% possuíam genótipo 3 e 1,1% possuíam genótipo 5. Posteriormente, Araújo e col. (2010), analisando 500 amostras de pacientes oriundos do LIM-47 e infectados pelo genótipo 1 evidenciaram que 55% deles eram infectados pelo subtipo b, 32,4% pelo subtipo a e 12,6% não foram subtipados ou apresentavam infecções mistas a e b.

A identificação do genótipo do VHC é importante para a determinação do período da terapia, sendo que pacientes infectados pelo genótipo 1 devem ser tratados por um período mais prolongado (em geral 48 semanas) e também possuem um pior prognóstico em relação à obtenção de resposta virológica sustentada (RVS) quando comparado aos outros genótipos que não 1 ou 4. Pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 devem ser tratados por um período de tempo menor (24 semanas) (Araújo et al., 2007a).

1.3 Transmissão

A transmissão do VHC ocorre por meio de sangue contaminado na maior parte das vezes, enquanto o risco de contágio por outros tipos de secreção é menor. A transfusão de sangue até 1992, era a via mais comum de

contágio, mas com o surgimento de testes de triagem esta via de transmissão diminuiu de maneira considerável. Usuários de drogas inalatórias ou intravenosas ilícitas, contágio vertical, contágio sexual, receptores de órgãos transplantados, também são vias de transmissão (Strauss, 2001; Indolfi et al., 2013; Prati, 2006).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite C é realizado através da detecção de anticorpos anti-VHC, com posterior detecção do vírus e sua classificação, através de testes de Biologia Molecular (Mikawa et al., 2009; Chevaliez e Pawlotsky, 2012).

O teste indireto ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) visa a detecção de anticorpos anti-VHC, e é recomendado como o primeiro teste a ser realizado para o rastreamento da infecção pelo VHC. A terceira geração deste teste possui uma alta sensibilidade e especificidade (Brandão et al., 2001; Ferreira-Gonzalez e Shiffman, 2004; Maasoumy et al., 2012).

A biologia molecular é um teste direto confirmatório que detecta o vírus no sangue. A reação em cadeia de polimerase (PCR) visa a amplificação do RNA-VHC, podendo ser um teste qualitativo ou quantitativo, auxiliando no controle da terapia (Teoh et al., 2010).

A genotipagem é empregada após a confirmação do diagnóstico. É importante para a determinação do período da terapia, se houver a indicação da mesma. Pode ser realizada através de técnicas de hibridização reversa ou RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Pawlotsky, 2003; Chevaliez e Pawlotsky, 2012).

1.5 Resposta Imune e princípios da terapia

Diante de uma infecção viral aguda o sistema imune do hospedeiro ativa, através da resposta imune inata, os interferons do tipo I (IFN alfa ou beta) que são produzidos através do reconhecimento das células infectadas. Os IFN possuem propriedades antivirais, como o aumento da expressão de proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, que reconhecem os antígenos virais e ativam macrófagos e células natural killer (NK), que podem destruir as células infectadas, inibindo a replicação viral (Cerny et al., 1999; Ishii e Koziel, 2008; Kanto e Hayashi, 2006).

O interferon alfa peguilado (PEG-IFN) associado a ribavirina (RBV) é o tratamento padrão para portadores de hepatite C crônica, o qual é recomendado a todos os infectados com doença crônica progressiva, visando a redução da carga viral até a indetectabilidade, a regressão e/ou estabilização de danos histológicos, e a reversão de manifestações extra-hepáticas, resultando na redução da mortalidade e melhora na qualidade de vida dos infectados. Sua indicação baseia-se nas propriedades antivirais e imunoestimulantes que naturalmente ocorrem, como acima descrito. Além disso, há uma série de etapas dependentes da interação com os denominados genes estimulados por interferon (*ISGs*) que recentemente têm se mostrado chave no desfecho da terapia (Gallo et al., 2010; Rocca et al., 2004; Feld et al., 2010).

O genótipo viral é reconhecidamente uma das variáveis mais relevantes na definição do desfecho da terapia. Apenas 40 a 45% dos pacientes com genótipo 1 são respondedores, enquanto aproximadamente 80% dos pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 conseguem um desfecho favorável quando tratados pela terapia padrão, PEG-IFN/RBV (Maekawa e Enomoto, 2009).

As respostas virológicas descritas a partir da utilização da metodologia por Biologia Molecular (reação em cadeia de polimerase - PCR) em suas diversas modalidades (Teoh et al., 2010; Araújo et al., 2007a; Chen e Yu, 2010):

1. Resposta virológica rápida (RVR): RNA VHC não detectável na quarta semana de tratamento;
2. Resposta virológica precoce completa (RVPC): RNA VHC não detectável na décima segunda semana de tratamento;
3. Resposta virológica precoce parcial (RVPP): queda do RNA VHC $\geq 2 \log_{10}$ UI/mL na décima segunda semana de tratamento;
4. Resposta de final de tratamento (RFT): não detecção do RNA VHC ao final da terapia, caracterizando assim o paciente respondedor (RS);
5. Resposta virológica sustentada (RVS): não detecção do RNA VHC após 6 meses do término do tratamento dos pacientes respondedores;
6. Resposta virológica não sustentada ou recidiva (RVNS): detecção do RNA VHC após 6 meses do término do tratamento dos pacientes respondedores;
7. Não respondedor (NR): detecção do RNA VHC ao final do tratamento.

Recentemente novas modalidades de resposta foram incluídas na prática clínica. Assim temos:

1. Breakthrough: não detecção do RNA VHC, com posterior detecção do RNA VHC durante o tratamento (rebote virológico);
2. NR parcial: queda de pelo menos $1 \log_{10}$ sem, entretanto, ultrapassar reduções de $2 \log_{10}$;
3. NR completo: viremia estável em vigência de terapia e/ou quedas inferiores a $1 \log_{10}$;
4. Resposta virológica rápida estendida (RVRE): não detecção do RNA VHC na quarta e décima segunda semana de tratamento (Chen e Yu, 2010; Sherman et al., 2010).

Durante o tratamento múltiplos eventos adversos podem ocorrer, tais como: erupções na pele, cefaleia, perda de peso, efeitos “flu-like”, alterações psiquiátricas, exacerbação de doenças auto-imunes, entre outros. A severidade desses eventos pode levar até a interrupção precoce da terapia. Portanto existem inúmeros desafios a serem superados no manejo da hepatite C. Entre eles podemos citar o desenvolvimento de uma vacina contra o VHC; o alto custo, toxicidade e ineficácia da terapia; e a necessidade de prevenção efetiva da re-infecção pelo VHC após o transplante de fígado (Ferreira, 2007; Czepiel et al., 2008; Georgel et al., 2010).

Atualmente os DAAs de primeira geração, *Boceprevir* (Merck Sharpe & Dohme) e *Telaprevir* (Janssen-Cilag), já estão sendo empregados para o tratamento da hepatite C, em conjunto com a terapia padrão (PEG-IFN/RBV). A ação destes DAAs se baseia na inibição das proteínas NS3/4A durante o ciclo de replicação do vírus (Naggie, 2012; Chueca Porcuna et al., 2013).

No Brasil, de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções – Suplemento 2 (2013), o uso destes DAAs é restrito a pacientes infectados pelo genótipo 1 do vírus, sem outras coinfeções (ex: HIV), grau de fibrose avançada (grau 3 e grau 4) ou cirrose compensada e ausência de tratamento prévio com esta classe de medicamento.

1.6 Fatores definidores de resposta do vírus e do hospedeiro

Múltiplos fatores tanto do vírus quanto do hospedeiro determinam o desfecho da terapia. Entre os fatores virais estão: o genótipo e o nível de VHC RNA no soro. Além dessas mais evidentes temos outros fatores de virulência, tais como mutações na região *ISDR*, diversidade de quasiespécies e atuação da protease viral. Entre os fatores do hospedeiro estão: idade, gênero, etnia, obesidade, fatores genéticos e o grau da fibrose hepática (Mangia et al., 2010; Tanaka et al., 2010; Cannon et al., 2008; Pol et al., 2013).

Variações nos genes da resposta induzida pelo interferon alfa têm sido associadas a resposta à infecção aguda pelo VHC, alterando a força e a qualidade da mesma (Thomas et al., 2009). Recentemente autores como Ge et al. (2009), Ahlenstiel et al. (2010), Rauch et al. (2010) entre outros, associaram polimorfismos existentes no gene da interleucina 28B (IL-28B) ao aumento ou diminuição da taxa de RVS em pacientes portadores de VHC e ao clareamento espontâneo do VHC após a infecção aguda.

1.7 Interleucina 28B

A IL-28B é uma citocina inata que pertence à família interferon lambda (IFN- λ). É expressa em baixos níveis por várias células humanas e possui uma grande importância na indução da resposta a infecção viral. Esse tipo de interferon é produzido principalmente por células mononucleares de sangue periférico e células dendríticas e o IFN- α aumenta a sua expressão (Ahlenstiel et al., 2010).

A família IFN- λ , formada pela IL-28A (IFN- λ 2), IL-28B (IFN- λ 3) e IL-29 (IFN- λ 1), possui essa denominação devido a sua similaridade à família de interleucina e citocinas, especialmente IL-10 e o IFN tipo I. Como o IFN tipo I, os IFN- λ s são estimulados na presença de vírus e DNA dupla fita e também possui atividade antiviral. A diferença entre os IFN- λ s e o IFN tipo I é a sua ligação a um receptor heterodimérico complexo formado por uma subunidade alfa IFN- λ específica (IL28RA) e pelo beta receptor IL-10 (IL-10RB). A ligação do IFN- λ a esse complexo leva a ativação da proteína Janus quinase (JAK) e da proteína tirosina quinase 2, desencadeando a fosforilação e ativação do sinal transdutor, tendo como consequência o início da transcrição (STAT) de proteínas quinases. A fosforilação de proteínas STAT1 e STAT2 leva a dimerização, com posterior translocação ao núcleo, ativando os ISGs (Johnston, 2007; Ank, 2006; Bonjardim, 2005; Kotenko, 2003).

O gene da IL-28B está localizado no cromossomo 19 e recentemente demonstrou-se que mutações na proximidade dessa região estão diretamente ligadas à resposta a terapia antiviral ao VHC.

A infecção pelo VHC leva a ativação da resposta imune inata e a produção de IFN- α . A IL-28B pode ser produzida com o estímulo da infecção viral, e é aumentada pelo IFN- α . Acredita-se que durante o tratamento, com o estímulo do IFN, o genótipo respondedor permite uma maior produção de IL-28B, sendo que esta proteína estimula a expressão dos *ISGs*, aumentando as probabilidades de recuperação da pessoa infectada. Os pacientes com genótipo não-respondedor em tratamento induzem uma fraca produção de IL-28B e isso faz com que as chances de desenvolver a forma crônica da doença aumentem. Na **figura 2** apresentamos esquematicamente estes fenômenos (Ahlenstiel et al., 2010).

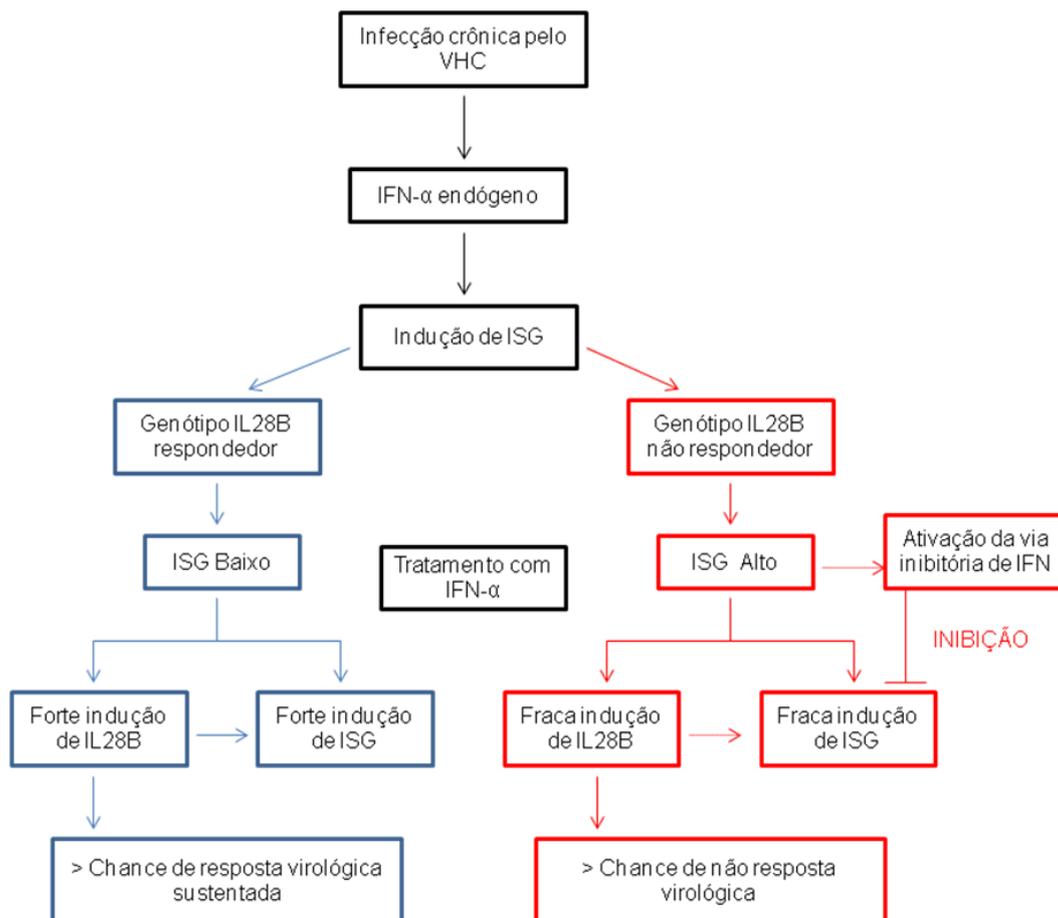


Figura 2: Modelo do papel do polimorfismo do gene IL-28B: na infecção crônica pelo VHC há a ativação do IFN- α e indução dos genes estimuladores de IFN. Durante o tratamento com IFN- α no genótipo respondedor há uma forte indução de IL-28B e ISG que aumentam as chances de RVS. No genótipo não-respondedor há uma fraca indução de IL-28B e ISG, que corresponde a menor chance de RVS.

Fonte: Adaptado de Ahlenstiel et al., 2010.

Estudos genéticos de larga escala começaram a ser empregados, quando a técnica de estudo de associação genômica ampla (GWAS – genome wide association) foi desenvolvida. Com esta técnica foi possível a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP* – single nucleotide polymorphism) ao fenótipo de doenças e também a resposta ao tratamento (Hayes et al., 2012).

Os *SNPs* descritos no gene IL-28B que demonstraram maior associação a resposta a terapia para hepatite C foram: rs12979860, rs8099917 e

rs12980275, de acordo com Ge et al. (2009), Suppiah et al. (2009) e , Tanaka et al. (2009).

1.7.1 *SNP* rs12979860

Ge. et al. (2009) descreveram pela primeira vez o *SNP* rs12979860, localizado 3 kilobases acima do gene IL-28B, que codifica o IFN- λ o qual demonstrou grande associação com a resposta virológica. De acordo com o estudo deste autor, foi classificado como genótipo respondedor o genótipo homozigoto para o alelo C, enquanto o genótipo homozigoto para o alelo T e heterozigoto têm menores chances de sucesso na terapia. Este resultado foi confirmado por Pineda et al. (2010), sendo acrescentado que mesmo pacientes co-infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), mono infectados pelo VHC ou de gênero diferente podem alcançar a RVS se o genótipo respondedor for identificado.

Montes-Cano et al. (2010) também associaram o *SNP* rs12979860 na população espanhola ao sucesso na terapia tanto em pacientes tratados somente com IFN e também em pacientes tratados com IFN associado a RBV, como mostra a tabela abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Efeito do *SNP* rs12979860 após tratamento em pacientes espanhóis infectados pelo VHC

	CC (%)	CT+TT (%)
		IFN- α (Monoterapia)
RVS	35 (60.3)	23 (39.7)
RVNS	20 (37.0)	34 (63.0)
		IFN α + RBV
RVS	33 (60.0)	22 (40.0)
RVNS	14 (26.9)	38 (73.1)

RVS: resposta virológica sustentada; RVNS: resposta virológica não-sustentada; IFN- α : interferon alfa.

Fonte: Adaptado de Montes-Cano et al., 2010.

O genótipo favorável (CC) deste *SNP* também foi associado a recuperação espontânea da infecção pelo VHC, ao alcance da RVR quando os pacientes encontram-se sob terapia com PEG-IFN/RBV, e também ao aumento de RVS (Knapp et al., 2011; Lindh et al., 2011).

No Brasil, Araújo et al. (2010), apresentaram os primeiros dados de pacientes brasileiros, em que foram analisadas 500 amostras de indivíduos infectados pelo genótipo 1 do VHC, a fim de observar a frequência dos genótipos do *SNP* rs12979860 na população e foram encontrados os seguintes resultados: 19,8% dos pacientes possuíam o genótipo respondedor (CC), 59,8% eram heterozigotos e 20,4% eram homozigotos para o alelo T. Portanto, nessa primeira análise a prevalência do polimorfismo favorável em nosso meio mostra-se bastante baixa. Tal fato pode estar associado a dados de baixa resposta observados em vida real (Araújo et al., 2007b; Almeida et al., 2010).

Em outro estudo realizado por Grandi et al. (2013), em uma população brasileira, foi possível observar que pacientes com o genótipo favorável tem mais chances de ter RVPc e RVS e menos chances de recidiva, conforme demonstrado na **tabela 3**.

Tabela 3. Taxas de resposta virológica e genótipo IL-28B				
Resposta ao tratamento	Total n (%)	CC n (%)	CT n (%)	TT n (%)
RVPc (sem 12)	158/269 (59)	32/38 (84)	76/132 (58)	58/99 (59)
RVPp (sem 12)	58/269 (21)	5/38 (13)	30/132 (23)	25/99 (25)
RFT (sem 48)	175/270 (65)	36/39 (92)	83/130 (64)	64/101 (63)
Recidiva	64/178 (35)	6/35 (17)	28/82 (34)	30/61 (49)
RVS	114/263 (43)	29/38 (76)	54/128 (42)	31/97 (32)

RVPc: resposta virológica precoce completa; RVPp: resposta virológica precoce parcial; RFT: resposta de final de tratamento; RVS: resposta virológica sustentada
Fonte: Adaptado de Grandi et al., 2013.

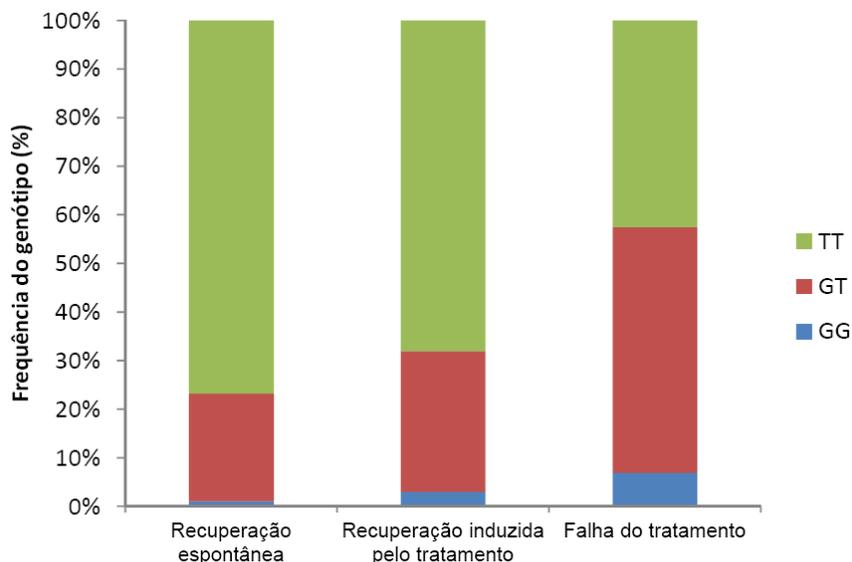
Este *SNP* também foi associado a cinética viral por Bochud et al. (2011). O alelo T do *SNP* rs12979860 influenciou negativamente o declínio da carga viral desde o primeiro dia de terapia, resultando em uma menor taxa de RVR. Na segunda fase de declínio ocorreu o mesmo fenômeno, dificultando a taxa de RVS do grupo estudado.

De acordo com Pol et al. (2013), se este *SNP* é avaliado em pacientes que fazem uso da terapia tripla, não há dados que comprovem sua importância, sendo que as características do hospedeiro se torna apenas um coadjuvante diante do uso dessas drogas, lembrando que esses pacientes são NR ou recidivantes ao tratamento com PEG-IFN/RBV.

1.7.2 *SNP* rs8099917

O *SNP* rs8099917 se localiza 8 kilobases acima do começo do códon do gene IL-28B. Este *SNP* foi considerado um fator preditivo da resposta a terapia em populações caucasiana e japonesa. O alelo G está relacionado à falha ao tratamento, sendo que o alelo T foi relacionado à melhor resposta, já que nesse estudo os pacientes que possuíam este alelo tiveram um risco menor de desenvolver a forma crônica da doença. No **gráfico 1** é possível observar a taxa de pacientes que tiveram uma recuperação espontânea, recuperação através do tratamento e falha no tratamento de acordo com os genótipos deste polimorfismo (Rauch et al., 2010).

Gráfico 1. Polimorfismo rs8099917 relacionado a recuperação natural, após tratamento e falha ao tratamento



Abe et al. (2010), encontraram uma correlação entre o rs8099917 e o nível de gama glutamiltransferase (GGT), sendo que pacientes com genótipo TT possuíam menores níveis deste marcador bioquímico, enquanto pacientes com genótipo GG possuíam níveis maiores. Neste mesmo estudo foi descrito que o grau de fibrose e o grau de atividade hepática foram maiores em pacientes homozigotos para o alelo maior (T).

Em outro estudo realizado com pacientes tratados com terapia tripla (Telaprevir+PEG-IFN/RBV) mostrou que a predição de RVS pode ser feita a partir da detecção do genótipo do *SNP* rs8099917. Cerca de 97% dos pacientes com genótipo TT alcançaram a RVS. 83% dos pacientes com genótipo não TT alcançaram a RVS também, desde que na primeira semana de tratamento tenha ocorra uma queda de $\geq 4,7 \log_{10}$ no VHC RNA. Quando não ocorre esta redução da carga viral, apenas 25% dos pacientes com genótipo não TT alcançam a RVS (Shimada et al., 2013).

1.7.3 *SNP* rs12980275

O último *SNP* do gene IL-28B descrito por Grebely et al. (2010) foi o rs12980275, no qual o genótipo AA possui uma maior chance de recuperação natural da infecção pelo VHC, enquanto os genótipos GA e GG não têm a mesma capacidade de recuperação. Nesse mesmo estudo foram comparados os *SNPs* rs12980275 e o rs8099917 e a proporção de RVS entre os genótipos respondedores foram similares.

Em um estudo conduzido por Fernández-Rodríguez et al. (2013), em uma casuística de 324 pacientes coinfectados pelo HIV, os genótipos favoráveis dos *SNPs* rs12980275 e rs8099917 apresentaram uma maior taxa de RVR, RVPp, RFT e RVS. No entanto, em outro estudo realizado em crianças e adolescentes por Domagalski et al. (2013), nenhuma associação foi encontrada entre o *SNP* rs12980275 e as respostas que ocorrem durante o tratamento. Lazarevic et al. (2013), concluíram em seu estudo que portadores dos genótipos favoráveis dos *SNPs* rs12979860 e rs12980275 tem três vezes mais chances de alcançar a RVS do que os outros genótipos.

2. JUSTIFICATIVA

Consideram-se os polimorfismos IL-28B um fator genético de grande relevância para a cura espontânea do paciente e também para a predição da resposta virológica ao tratamento contra o VHC. Em que pese ainda serem necessários mais estudos para esclarecer por completo o papel destes polimorfismos, já é possível observar que esses são fatores de grande importância a ser adotado na prática clínica. Enfatize-se que são mais relevante que os fatores preditores clássicos (carga viral basal, genótipo do VHC, grau de fibrose, etc) até então empregados (Mangia et al., 2010; Tanaka et al., 2010).

Nos Estados Unidos já está disponível um teste comercial para a identificação do polimorfismo rs12979860 (LabCorp-RTP, NC). A informação do polimorfismo juntamente aos outros fatores de predição já existentes (obesidade, gênero, raça e nível de RNA VHC) contribuem na decisão acerca da terapia contra o VHC, quer se indicada, quer pelo tipo, terapia padrão ou já utilizar os *DAAs* que já estão disponíveis no mercado.

3. OBJETIVOS

1. Avaliar a frequência relativa dos polimorfismos rs12979860 (C>T), rs8099917 (T>G) e rs12980275 (A>G) no gene Interleucina 28B (IL-28B) em indivíduos portadores de infecção crônica pelo VHC tratados com combinação de interferon peguilado e ribavirina em uma casuística de pacientes atendidos pelos médicos do Ambulatório de Hepatites DMIP/LIM-47.
2. Avaliar a influência dos polimorfismos rs12979860 (C>T), rs8099917 (T>G) e rs12980275 (A>G) no gene Interleucina 28B (IL-28B) sobre a resposta à terapêutica na coorte acompanhada.
3. Avaliar retrospectivamente a possibilidade de predição de resposta à terapia a partir do perfil IL-28B na população estudada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Trata-se de uma análise retrospectiva a partir de um grupo constituído por pacientes com infecção crônica pelo VHC, que foram ou são atendidos no ambulatório de Hepatites Virais pelos médicos assistentes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Foram incluídos pacientes cujo prontuário possuísse informações terapêuticas. Os critérios de inclusão e exclusão de pacientes estão descritos no **quadro 1**.

Quadro 1. Critérios de Inclusão e Exclusão

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Paciente adulto: ≥ 18 e < 70 anos	Coinfecção VHB e/ou HIV
Tratamento com PEG-IFN e RBV	Outras hepatopatias ou co-morbidades com interferência na terapia anti-VHC
Genótipo 1	Genótipo não-1
Prontuário com informações clínicas e terapêuticas	Não obtenção de dados demográficos, clínicos e terapêuticos

Os pacientes foram classificados de acordo com o resultado de PCR VHC como:

- Não Responder (NR): PCR VHC com carga viral detectável ao término da terapia ou acima de $2\log_{10}$ na semana 12 de terapia;
- Resposta Viroológica Sustentada (RVS): PCR VHC com carga viral abaixo do limite de detecção 24 semanas após a finalização da terapia;

- Resposta Viroológica Não Sustentada (RVNS): PCR VHC com carga viral detectável 24 semanas após a finalização da terapia.

O número de pacientes necessários para o estudo foi calculado e supondo grau de confiança de 95% e poder de 80%, esperando percentual de resposta nos pacientes com genótipo T/T de 26% e supondo percentual de resposta de no mínimo 60% para pacientes C/C a amostra mínima necessária para cada genótipo com teste bicaudal foi de 32 pacientes. Conforme Ge et al. (2010) a distribuição percentual dos genótipos T/T, T/C e C/C é de respectivamente 16%, 49% e 35%, logo a amostra de pacientes deve ser no mínimo 197 para garantir 32 pacientes com genótipo T/T.

Foram selecionados 236 pacientes para participar do estudo. O não encontro da amostra de sangue na Soroteca do Laboratório de Hepatites determinou a convocação do paciente para uma nova coleta, para a determinação dos *SNPs* do gene IL-28B mediante a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXO 1**). Vinte e três pacientes foram excluídos por não possuírem cadastro atualizado para contatá-los. Não foi possível a amplificação do DNA genômico em 25 amostras. Fatores como tempo de estocagem, qualidade da amostra ou fragmentação do DNA, justificaram esta ocorrência. Finalmente 17 pacientes foram excluídos por falta de informações no prontuário médico, bem como dados da terapia e também impossibilidade de classificação do mesmo. Dessa forma 171 pacientes foram incluídos e constituem o grupo estudado.

4.2 Aspectos éticos do estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-HCFMUSP) sob o número 0239/11.

4.3 Materiais

Amostras de soro estocado à -20°C e de sangue total refrigerada armazenadas no Laboratório de Hepatites (LIM-47). Amostras coletadas em um tubo seco (8,5mL) e um tubo de EDTA (4,0mL) mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Prontuários médicos do HCFMUSP.

4.4 Métodos

4.4.1 Coleta de dados

4.4.1.1 Clínicos

Foi formulada uma ficha padrão, para a coleta de dados de interesse ao estudo dos pacientes selecionados (**ANEXO 2**).

4.4.1.2 Laboratoriais

Os exames bioquímicos (função hepática), hematológicos (**quadro 2**) e hormonais foram realizados no Laboratório Central do HCFMUSP. Os exames de Biologia Molecular (reação em cadeia pela polimerase - PCR qualitativo, PCR quantitativo e genotipagem) foram realizados no Laboratório de Hepatites, cujas técnicas serão descritas adiante.

Quadro 2. Exames de função hepática e hematológica utilizados

Função Hepática	Hematologia
Alanina Amino Transferase (ALT)	Hematócrito (Ht)
Aspartato Amino Transferase (AST)	Hemoglobina (Hb)
Bilirrubina direta (BD)	Contagem de leucócitos
Bilirrubina indireta (BI)	Contagem de neutrófilos
Bilirrubina total (BT)	Contagem de Plaquetas
Fosfatase Alcalina (FAL)	
Gama Glutamil Transferase (GGT)	

4.4.1.3 Anatomia Patológica

As lâminas e laudos anátomo-patológicos foram revisados para classificação METAVIR na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP.

4.4.2 PCR VHC Qualitativo

Foi utilizada uma PCR qualitativa para a detecção do RNA VHC no sangue, utilizando o AMPLICOR Hepatitis C Virus (VHC) Test, v 2.0 (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, USA), baseada em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando iniciadores específicos complementares do VHC; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos; e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação

colorimétrica. O limite de detecção considerado no teste foi 50 UI/mL (Desombere et al., 2005; Pawlostky, 2002).

4.4.3 PCR VHC Quantitativo

A PCR quantitativa foi aplicada para a mensuração da viremia no sangue, utilizando o AMPLICOR VHC MONITOR (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, USA), baseado em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando iniciadores específicos complementares do VHC; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos; e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica. Os limites de detecção, inferior e superior, considerados no teste foram de 600UI/mL a 850.000UI/mL, respectivamente.

4.4.4 Genotipagem do VHC (1-6)

Para a genotipagem do vírus da hepatite C foi utilizada a técnica de hibridização reversa (VERSANT™ VHC Genotype Assay-LIPA, Bayer Corp., Tarrytown, NY, USA). O procedimento foi realizado em 3 etapas: hibridização, lavagem e desenvolvimento de cor. Os genótipos passíveis de detecção são do 1 ao 6 com subtipo como 1a, 1b, 2a, 2b, entre outros.

4.4.5 Purificação de DNA

A extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) a partir do soro ou sangue total foi realizada utilizando o kit QIAamp® DNA Mini, que por eluição purifica o DNA, que é isolado e permanece sem proteínas, nucleases e outros contaminantes. Este teste foi desenvolvido para uma rápida purificação de DNA e pode ser utilizado para sangue tratado com citrato, heparina, EDTA, plasma, soro, e outros materiais biológicos, sendo eles frescos ou congelados. A purificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, porém com algumas modificações para a otimização do método.

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram adicionados 20 µL de Proteinase K (para a lise celular), 400 µL de amostra e 200 µL de Buffer AL e agitou-se no vórtex por 15s. Após a agitação, foi realizada uma incubação em bloco de aquecimento à 56°C por 10 minutos.

Ao final da incubação, uma rápida centrifugação foi necessária para remover gotas que podem ter ficado retidas na tampa do tubo, e em seguida adicionou-se 400 µL de etanol (96-100%) à amostra e agitou-se no vórtex por 15 segundos. Novamente foi realizada uma rápida centrifugação.

Todo o conteúdo da amostra foi transferido para a coluna, e duas lavagens foram realizadas para a eliminação de resíduos. Após as lavagens, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados à coluna 50 µL de Buffer AE (que por eluição separa os componentes, sendo que as moléculas de interesse são adsorvidas a coluna), após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada uma centrifugação por 2 minutos. Em seguida foram adicionados 30 µL de Buffer AE à coluna e uma nova centrifugação de 2 minutos. Assim, o DNA purificado se solta da coluna em um volume final de 80 µL.

4.4.6 Quantificação de DNA

A quantificação de DNA foi realizada utilizando o fluorímetro Qubit[®] da empresa Invitrogen[™]. O Qubit é um fluorímetro de bancada que pode quantificar DNA, RNA e proteína, utilizando uma fluorescência ultra-sensível e precisa. O cálculo da quantificação é baseado na relação de dois padrões utilizados na calibração do aparelho, gerando um ajuste de curva algorítmica. Com o Quant-iT[™] ds DNA High Sensitivity Assay Kit foi realizada a quantificação no Qubit[®].

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 198 µL da Working Solution (199 µL de Quant-iT[™] Buffer, e 1 µL de Quant-iT[™] Reagente) juntamente com 2 µL do DNA extraído e agitou-se no vórtex por 15 segundos. Após 2 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a quantificação pelo aparelho. Com esse kit, a leitura do aparelho pode variar entre 0,2 a 100 ng de DNA por amostra.

4.4.7 Análise dos polimorfismos do gene IL-28B por PCR em tempo real

O sistema *TaqMan* na reação de PCR em tempo real visa a detecção de sequências específicas por meio de uma sonda marcada com fluorocromo e quase totalmente complementar à sequência alvo, permitindo a hibridização e posteriormente a detecção do polimorfismo. A sonda possui em sua extremidade 5', um composto fluorescente, conhecido como reporter (responsável pela emissão do sinal que será detectado pelo aparelho). Na extremidade 3' encontra-se um composto chamado quencher que absorve a fluorescência emitida pelo reporter, numa distância de aproximadamente 22-30 pares de base, sendo que este é o tamanho ideal da sonda nesta reação. À medida que vai ocorrendo a amplificação, a taq polimerase que possui atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda, clivando-a. Assim,

o reporter é liberado, gerando fluorescência (**Figura 3**) (Kubista et al., 2006; Yang e Rothman, 2004).

A identificação dos genótipos dos *SNPs* do gene IL-28B foi feita através da determinação da intensidade de fluorescência emitida na reação (Kubista et al., 2006; Mamotte, 2006).

Nesse trabalho as sondas utilizadas foram a VIC (que gera uma coloração verde) e 5-carboxifluoresceína ou FAM, que gera uma coloração azul na curva. Na extremidade 3' da sonda encontra-se o repórter MGB (**figuras 4, 5 e 6**).

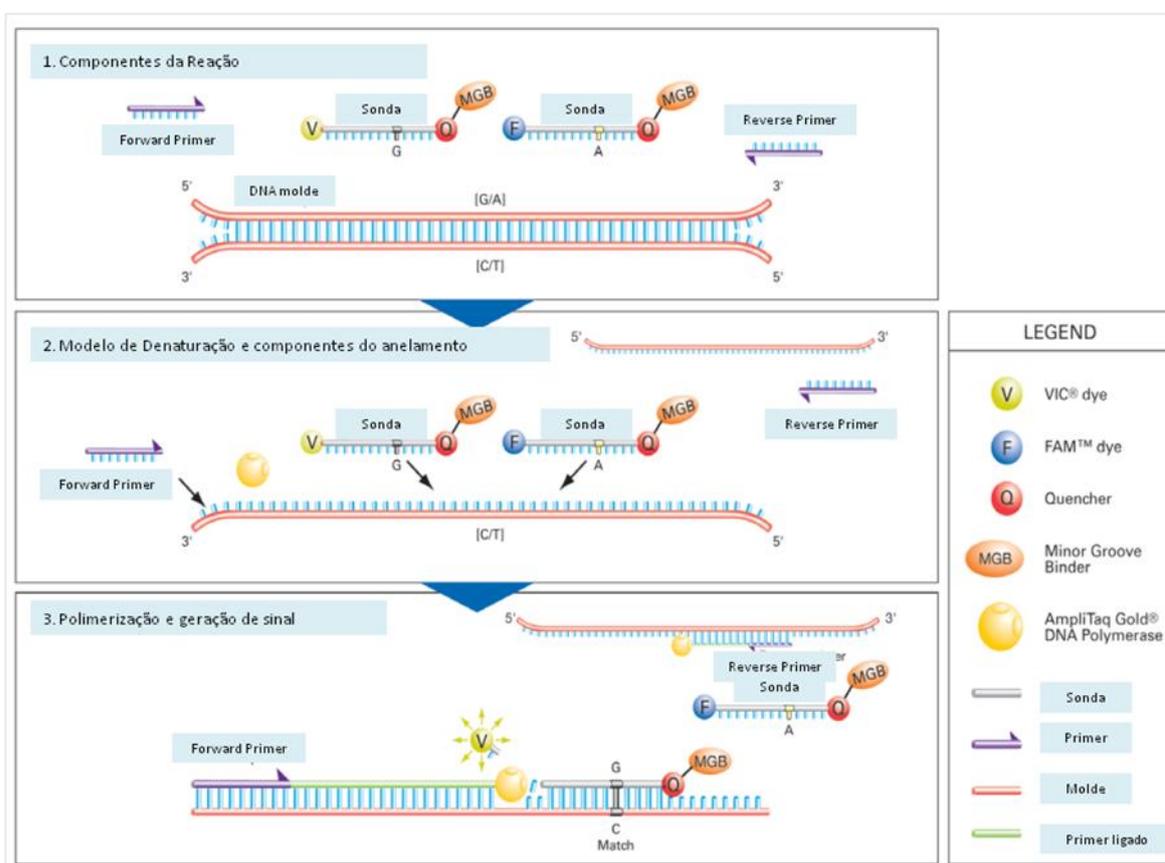


Figura 3: PCR em tempo real, método TaqMan. Durante a amplificação a Taq Polimerase, quando encontra a sonda ligada desloca a sua extremidade 5', clivando-a e o repórter é liberado, gerando a fluorescência.

Fonte: Adaptado de: Invitrogen, 2011

Para a realização das reações foram sintetizados primers e sondas para a identificação de cada um dos três polimorfismos presentes no gene IL-28B, conforme as instruções do fabricante.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento: 12,5 μ L de TaqMan® Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure, desoxinucleotídeos [dNTP], ROX referência passiva), 1,25 μ L de Genotyping Assay® (primers e sondas) e ao final foram adicionados 11,25 μ L de DNA purificado. Os parâmetros (tempo de hibridação e extensão, temperaturas de desnaturação, hibridação e extensão, e o número de ciclos) foram testados e otimizados no termociclador Applied Biosystems StepOne™.

As condições em que ocorreram as reações para os SNPs rs12979860, rs8099917 e rs12980275 foram as seguintes:

- um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 10 minutos
- seguidos de 46 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 57°C por 1 minuto;
- um ciclo de extensão final a 60° por 30 segundos.



Figura 4. Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação da sonda FAM, mostrando um perfil homocigótico.

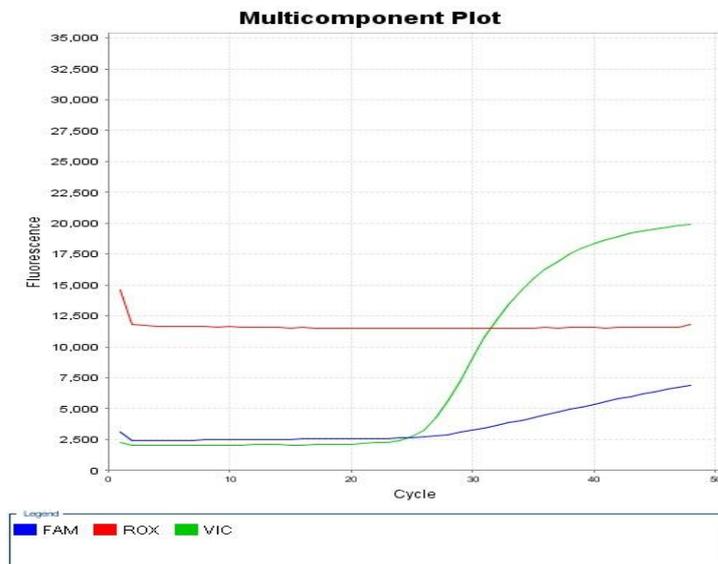


Figura 5. Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação da sonda VIC, mostrando um perfil homocigótico.

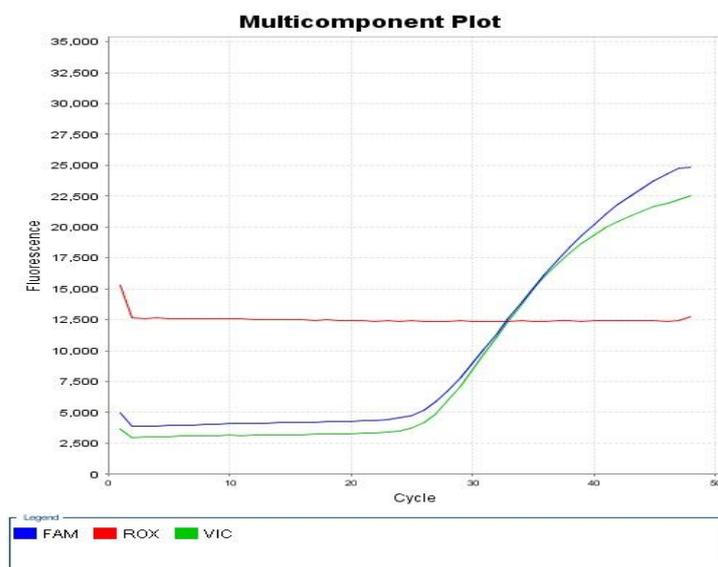


Figura 6. Curva gerada ao final da PCR em tempo real, com ligação das sondas VIC e FAM, mostrando um perfil heterocigótico.

Consideramos para cada *SNP* a seguinte associação com o desfecho da terapia:

- rs12979860: CC favorável, CT e TT desfavoráveis;
- rs8099917: TT favorável, TG e GG desfavoráveis;
- rs12980275: AA favorável, AG e GG desfavoráveis.

4.4.8 Análise estatística

Consideraram-se as variáveis de maior relevância associadas ao desfecho da terapia baseada em PEG-IFN/RBV, as mesmas foram agrupadas em relação ao hospedeiro (gênero, etnia, idade, comorbidades, hábitos), ao vírus (genótipo VHC, carga viral) e ao dano hepático (grau de fibrose e esteatose – **ANEXO 3**). As variáveis foram descritas com uso de frequências absolutas e relativas em relação ao desfecho terapêutico; foi verificada a associação entre as variáveis e o desfecho terapêutico com o uso de testes exatos de Fischer ou testes da razão de verossimilhanças, e quando a amostra permitiu foi utilizado o teste do qui-quadrado (Kirkwood e Sterne, 2006).

As variáveis idade e tratamentos prévios foram descritas e comparadas ao desfecho com o uso de teste de ANOVA.

Para a avaliação da função hepática e hematológica, foram realizadas as descrições dos valores de acordo com o desfecho terapêutico, sendo que as variáveis foram analisadas durante os períodos: pré-tratamento, semana 4, semana 12, semana 24, semana 48 ou 72 e 24 semanas após o término da terapia; com uso de medidas resumo, conforme **ANEXO 4**.

Foram comparados os valores de cada medida segundo à resposta a terapia nos períodos de análise, descritos acima, com uso de equações de estimação generalizadas com distribuição marginal normal e função de ligação identidade, supondo matriz de correlações entre os períodos e autorregressiva

de ordem 1. As análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para verificar se houve diferenças nos valores de funções hepática e hematológica, de acordo com o desfecho terapêutico ou períodos analisado (McCullgh e Nelder, 1989; Neter et al., 1996). As tabelas se encontram no **ANEXO 5**.

Para verificar quais fatores influenciam a RVS, foi construído o modelo de regressão logística múltipla com as variáveis que apresentaram níveis descritivos menores que 0,2 ($p < 0,2$) nas análises univariadas, permanecendo no modelo final apenas as variáveis estatisticamente significativas (Hosmer e Lemeshow, 2000).

Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

Os softwares utilizados nas análises foram SPSS 20.0 e Excel 2003.

5. RESULTADOS

A distribuição dos pacientes estudados de acordo com gênero, etnia, idade, genótipo VHC, grau de fibrose, esteatose, desfecho terapêutico, número de comorbidades, tabagismo, etilismo e uso de drogas ilícitas, são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Distribuição dos 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV para hepatite C crônica segundo dados demográficos, clínicos e hábitos

Características	N	%
Gênero		
Masculino	81	47,4
Feminino	90	52,6
Etnia		
Negro	27	15,8
Não negro	144	84,2
Idade (anos)		
18 a 30	9	5,27
31 a 40	23	13,45
41 a 50	49	28,65
51 a 60	62	36,25
61 a 70	28	16,38
Genótipo Viral		
1a	52	30,4
1b	101	59,1
1a1b	4	2,3
1	14	8,2
Carga Viral Basal		
>850.000UI/MI	74	43,27
<850.000UI/MI	36	21,05
Não disponível	61	35,67
Grau de Fibrose (METAVIR)		
F0-F2	118	71,51
F3-F4	47	28,49
Esteatose		
Sim	85	53,12
Não	75	46,88
Desfecho Terapêutico		
RVS	55	32,16
RVNS	37	21,64
NR	79	46,20
Número de Comorbidades		
Não descrita/não disponível	63	36,84
1	54	31,57
2	26	15,20
3	19	11,12
4 ou mais	9	5,27
Etilismo		
Sim	27	15,79
Não	49	28,65
Não disponível	95	55,55
Tabagismo		
Sim	32	18,72
Não	39	22,80
Não disponível	100	58,48
Uso de drogas Ilícitas		
Sim	12	7,02
Não	49	28,65
Não disponível	110	64,33

Considerou-se etilismo como a menção qualitativa da ingesta alcoólica. O mesmo ocorreu com as variáveis tabagismo e uso de drogas ilícitas.

Entre as comorbidades observadas, as mais frequentes foram: Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes Mellitus tipo 2 e Depressão.

Tabela 5. Análise univariada das características de 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV para hepatite C crônica segundo desfecho terapêutico.

Variável	Resposta						Total	P
	NR		RVNS		RVS			
	N	%	N	%	N	%		
Gênero								0,977*
Feminino	41	51,9	20	54,1	29	52,7	90	52,6
Masculino	38	48,1	17	45,9	26	47,3	81	47,4
Etnia								0,912*
Negro	13	16,5	5	13,5	9	16,4	27	15,8
Não-negro	66	83,5	32	86,5	46	83,6	144	84,2
Idade (anos)								0,112**
Média (DP)	48,8 (10)		53 (9,3)		49,2 (11,6)		49,8 (10,5)	
Grau de Fibrose Hepática (METAVIR)								0,097*
F0-F2	51	66,2	24	66,7	43	82,7	118	71,5
F3-F4	26	33,8	12	33,3	9	17,3	47	28,5
Nível de Atividade Inflamatória (METAVIR)								0,618#
A1	26	33,8	12	32,4	24	46,2	62	37,3
A2	41	53,2	21	56,8	23	44,2	85	51,2
A3	10	13,0	4	10,8	5	9,6	19	11,4
Genótipo VHC								0,107#
1	4	5,1	2	5,4	8	14,5	14	8,2
1a	30	38,0	12	32,4	10	18,2	52	30,4
1b	44	55,7	21	56,8	36	65,5	101	59,1
1a1b	1	1,3	2	5,4	1	1,8	4	2,3
Drogas Utilizadas								0,068#
PEG-IFN + RBV	9	11,4	6	16,2	4	7,4	19	11,2
PEG ALFA 2A + RBV	25	31,6	15	40,5	30	55,6	70	41,2
PEG ALFA 2B + RBV	45	57,0	16	43,2	20	37,0	81	47,6
RVR								<0,001#
Não	46	97,9	12	80,0	24	68,6	82	84,5
Sim	1	2,1	3	20,0	11	31,4	15	15,5
RVPp								0,003#
Não	23	76,7	1	33,3	0	0,0	24	64,9
Sim	7	23,3	2	66,7	4	100,0	13	35,1
RVPc								<0,001*
Não	75	94,9	25	67,6	25	45,5	125	73,1
Sim	4	5,1	12	32,4	30	54,5	46	26,9
Tratamento prévio								0,089**
Média (DP)	1,5 (0,6)		1,3 (0,6)		1,3 (0,6)		1,4 (0,6)	
Eventos Adversos								0,842*
Não	32	41,0	12	35,3	21	40,4	65	39,6
Sim	46	59,0	22	64,7	31	59,6	99	60,4
Anemia								0,095#
Não	75	94,9	33	89,2	46	83,6	154	90,1
Sim	4	5,1	4	10,8	9	16,4	17	9,9
Uso de Adjuvantes								0,047#
Nenhum	65	85,5	28	82,4	36	69,2	129	79,6
G-CFS	9	11,8	2	5,9	7	13,5	18	11,1
EPO	2	2,6	3	8,8	5	9,6	10	6,2
G-CFS + EPO	0	0,0	1	2,9	4	7,7	5	3,1
Tabagismo								0,295*
Não	17	47,2	10	71,4	12	57,1	39	54,9
Sim	19	52,8	4	28,6	9	42,9	32	45,1
Etilismo								0,093*
Não	22	59,5	14	87,5	13	56,5	49	64,5
Sim	15	40,5	2	12,5	10	43,5	27	35,5
Uso prévio de Drogas Ilícitas								0,573#
Não	24	77,4	10	90,9	15	78,9	49	80,3
Sim	7	22,6	1	9,1	4	21,1	12	19,7

NR, não respondedor; RVNS, resposta virológica não sustentada; RVS, resposta virológica sustentada; PEG-IFN, interferon alfa peguilado; RBV, ribavirina; PEG ALFA 2A, interferon alfa peguilado 2A; PEG ALFA 2B, interferon alfa peguilado 2B; G-CFS, filgrastina; EPO, eritropoetina; RVR, resposta virológica rápida; RVPp, resposta virológica precoce parcial; RVPc, resposta virológica precoce competente; * resultado do teste do qui-quadrado; ** resultado da ANOVA; # resultado do teste da razão de verossimilhanças.

Tabela 6. Frequência dos genótipos dos *SNPs* rs12979860, rs8099917 e rs12980275, em 171 pacientes tratados com PEG-IFN/RBV, segundo desfecho terapêutico.

SNP IL-28B	Resposta						Total		P
	NR		RVNS		RVS		N	%	
	N	%	N	%	N	%			
rs12979860									<0,001*
C/C	8	10,1	16	43,2	26	47,3	50	29,2	
C/T	43	54,4	13	35,1	20	36,4	76	44,4	
T/T	28	35,4	8	21,6	9	16,4	45	26,3	
rs8099917									0,129#
T/T	35	44,3	23	62,2	36	65,5	94	55,0	
T/G	41	51,9	13	35,1	17	30,9	71	41,5	
G/G	3	3,8	1	2,7	2	3,6	6	3,5	
rs12980275									0,008*
A/A	14	17,7	14	37,8	25	45,5	53	31,0	
A/G	47	59,5	17	45,9	25	45,5	89	52,0	
G/G	18	22,8	6	16,2	5	9,1	29	17,0	

NR, não respondedor; RVNS, resposta virológica não sustentada; RVS, resposta virológica sustentada; * resultado do teste do qui-quadrado; # resultado do teste da razão de verossimilhanças.

A **Tabela 6** expressa o cerne de nossa discussão. Por meio dela observa-se a frequência dos genótipos dos *SNPs* rs12979860, rs8099917 e rs12980275 do gene IL-28B, e sua influência na terapia. Os genótipos favoráveis dos *SNPs* rs12979860 (CC) e rs12980275 (AA) estão associados a RVS no grupo estudado, com valores de $p = <0,001$ e $p = 0,008$, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o *SNP* rs8099917 e a resposta à terapia.

Tabela 7. Análise univariada da frequência dos genótipos do *SNP* rs12979860 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.

Variável	Genótipo rs12979860						Total	P	
	CC		CT		TT				
	N	%	n	%	N	%			n
Gênero									0,448
Feminino	30	60,0	37	48,7	23	51,1	90	52,6	
Masculino	20	40,0	39	51,3	22	48,9	81	47,4	
Etnia									0,607
Negro	8	16,0	10	13,2	9	20,0	27	15,8	
Não negro	42	84,0	66	86,8	36	80,0	144	84,2	
Grau de Fibrose									0,724*
F0-F2	36	75,0	50	68,5	32	72,7	118	71,5	
F3-F4	12	25,0	23	31,5	12	27,3	47	28,5	
Esteatose									0,160*
Não	26	59,1	30	41,7	19	43,2	75	46,9	
Sim	18	40,9	42	58,3	25	56,8	85	53,1	
RVR									0,011#
Não	17	65,4	37	90,2	28	93,3	82	84,5	
Sim	9	34,6	4	9,8	2	6,7	15	15,5	
RVPp									0,425#
Não	3	75,0	15	71,4	6	50,0	24	64,9	
Sim	1	25,0	6	28,6	6	50,0	13	35,1	
RVPc									<0,001*
Não	7	28,0	41	71,9	28	87,5	76	66,7	
Sim	18	72,0	16	28,1	4	12,5	38	33,3	

RVR, resposta virológica rápida; RVPp, resposta virológica precoce parcial; RVPc, resposta virológica precoce completa; * resultado do teste qui-quadrado; # teste da razão de verossimilhanças

Pela **Tabela 7** pode-se observar que o genótipo CC, está associado a RVR e a RVPc, com valores de $p = 0,011$ e $p < 0,001$, respectivamente.

Tabela 8. Análise univariada da frequência dos genótipos do *SNP* rs8099917 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.

Variável	Genótipo rs8099917						Total	P
	TT		TG		GG			
	n	%	n	%	N	%		
Gênero								0,270#
Feminino	49	52,1	36	50,7	5	83,3	90	52,6
Masculino	45	47,9	35	49,3	1	16,7	81	47,4
Etnia								0,046#
Negro	20	21,3	7	9,9	0	0,0	27	15,8
Não negro	74	78,7	64	90,1	6	100,0	144	84,2
Grau de Fibrose								0,095#
F0-F2	67	72,8	45	67,2	6	100,0	118	71,5
F3-F4	25	27,2	22	32,8	0	0,00	47	28,5
Esteatose								0,046#
Não	49	55,7	24	36,4	2	33,3	75	46,9
Sim	39	44,3	42	63,6	4	66,7	85	53,1
RVR								0,091#
Não	40	78,4	40	93,0	2	66,7	82	84,5
Sim	11	21,6	3	7,0	1	33,3	15	15,5
RVPp								0,504#
Não	14	73,7	9	56,2	1	50,0	24	64,9
Sim	5	26,3	7	43,8	1	50,0	13	35,1
RVPc								0,007#
Não	35	55,6	37	78,7	4	100,0	76	66,7
Sim	28	44,4	10	21,3	0	0,0	38	33,3

RVR, resposta virológica rápida; RVPp, resposta virológica precoce parcial; RVPc, resposta virológica precoce completa; # resultado do teste da razão de verossimilhanças

Pela **Tabela 8** foi encontrada a associação do rs8099917 com a etnia ($p = 0,046$), esteatose ($p = 0,046$) e RVPc ($p = 0,007$). O genótipo TT está presente em pacientes não negros ($p=0,046$) e sem esteatose no grupo de estudo ($p = 0,046$). O genótipo GG está associado com a ausência RVPc ($p = 0,001$).

Tabela 9. Análise univariada da frequência dos genótipos do *SNP* rs12980275 do gene IL-28B segundo características associadas ao desfecho da terapia no grupo estudado.

Variável	Genótipo rs12980275						Total	P
	AA		AG		GG			
	N	%	n	%	N	%		
Gênero								0,679*
Feminino	30	56,6	44	49,4	16	55,2	90	52,6
Masculino	23	43,4	45	50,6	13	44,8	81	47,4
Etnia								0,741#
Negro	8	15,1	13	14,6	6	20,7	27	15,8
Não negro	45	84,9	76	85,4	23	79,3	144	84,2
Grau de Fibrose								0,647*
F0-F2	37	71,2	59	69,4	22	78,6	118	71,5
F3-F4	15	28,8	26	30,6	6	21,4	47	28,5
Esteatose								0,478*
Não	26	54,2	37	44,0	12	42,9	75	46,9
Sim	22	45,8	47	56,0	16	57,1	85	53,1
RVR								0,009#
Não	21	67,7	43	91,5	18	94,7	82	84,5
Sim	10	32,3	4	8,5	1	5,3	15	15,5
RVPp								0,695#
Não	5	71,4	16	66,7	3	50,0	24	64,9
Sim	2	28,6	8	33,3	3	50,0	13	35,1
RVPc								0,003*
Não	13	43,3	48	71,6	15	88,2	76	66,7
Sim	17	56,7	19	28,4	2	11,8	38	33,3

RVR, resposta virológica rápida; RVPp, resposta virológica precoce parcial; RVPc, resposta virológica precoce completa; * resultado do teste qui-quadrado; # resultado do teste da razão de verossimilhanças

Pela **Tabela 9** é possível observar que entre as variáveis relacionadas ao *SNP* rs12980275, as que se destacaram foram a RVR e RVPc. O genótipo GG, que está relacionado a falha terapêutica, está presente no grupo que não obteve RVR ($p = 0,009$) e também no grupo RVPc ($p = <0,001$).

Tabela 10. Análise do modelo de regressão logística múltipla envolvendo variáveis previamente associadas ao desfecho ($p < 0,2$), tabelas 6 e 7 – inicial – e que mantiveram associação – final ($p < 0,005$).

Modelo	Variável	OR	IC (95%)		p
			Inferior	Superior	
Inicial	Etilismo	1,86	0,55	6,25	0,317
	Uso de Adjuvantes	1,09	0,19	6,23	0,927
	rs12979860				0,892
	CC	1,00			
	CT	0,69	0,12	3,99	0,675
	TT	0,65	0,09	4,52	0,666
	rs12980275				0,627
	AA	1,00			
	AG	0,49	0,09	2,65	0,406
	GG	0,39	0,04	3,64	0,406
	Idade (anos)	1,02	0,96	1,08	0,569
	Nº de tratamentos	0,88	0,30	2,57	0,809
	Anemia	2,74	0,21	35,44	0,439
	GGT	1,00	0,99	1,01	0,468
Final	rs12980275				
	AA	1,00			
	AG	0,44	0,22	0,89	0,023
	GG	0,23	0,08	0,70	0,010

A **Tabela 10** mostra que apenas o *SNP* rs12980275 influencia independentemente das demais variáveis na RVS.

O genótipo AG tem 56% menos chance de RVS e o genótipo GG tem 77% menos chance de RVS quando comparados ao genótipo AA.

6. DISCUSSÃO

O conhecimento acumulado a partir dos estudos de Ge et al. (2009), Suppiah et al. (2009), Tanaka et al. (2009), e na pacífica literatura à respeito do tema amplamente disponível (Booth et al., 2012) a terapia para hepatite C quando utilizado PEG-IFN/RBV, associa-se com índices de sucesso relativamente modestos e frequência de eventos adversos elevados e potencialmente graves. Por tudo isso é desejável muito discernimento e cautela na indicação do tratamento. Precisamos mais escolher os pacientes que mais se beneficiariam da terapia.

Para atingir tais objetivos definem-se critérios para indicar a terapia e para interrupção precoce da mesma, quando predizemos o insucesso. Além disso, tanto o médico quanto o paciente necessitam de preditores do desfecho que auxiliem no processo de tomada de decisão. Tais preditores podem ser utilizados antes do início da terapia ou após o início da mesma.

Nosso trabalho dedica-se à análise de fatores genéticos fortemente associados ao desfecho do tratamento. Lamentavelmente esse é um conhecimento que despontou apenas em 2009 a partir da publicação de Ge et al. Ou seja, tal informação é introduzida na prática clínica, exatamente na transição da terapia interferon baseada para a terapia antiviral direta.

Não obstante, nossa análise permite um conjunto de informações aplicáveis e úteis tanto clássicas quanto às novas modalidades terapêuticas.

Em relação às características observamos que as comorbidades frequentes foram Hipertensão Arterial Sistêmica, Diabetes Mellitus tipo 2 e Depressão. Sabe-se que o genótipo 1 do VHC quando associado à esteatose é em decorrência de fatores ligados ao paciente, em especial ao sobrepeso e obesidade (Kawaguchi e Mizuta, 2014). Esteatose foi descrita em 54% de nossos pacientes. O conjunto das comorbidades e a esteatose frequente configuram um conjunto de fatores negativamente associados ao desfecho da terapia, como descreveremos adiante.

O uso de drogas ilícitas referido, apresentou-se em número inferior ao descrito na literatura. Paraboni et al. (2012) estudaram os fatores de risco para a transmissão do VHC no sudeste brasileiro e concluíram que 18% do grupo avaliado fez uso de drogas ilícitas, enquanto encontramos apenas 7%. É possível que tenhamos a simples omissão do comportamento ou devemos inquirir de forma mais adequada sobre o passado epidemiológico dos pacientes.

A determinação do genótipo VHC determina a duração da terapia. O genótipo 1 é o que necessita de um período mais longo de terapia (48 ou 72 semanas), e o subtipo 1a tem maior RVS que o subtipo 1b (Tsubota et al., 2011). Esta diferenciação dos subtipos do genótipo 1 se tornou ainda mais relevante na era do tratamento antiviral direto. Drogas para tratar o subtipo 1a necessitam de uma maior barreira genética pois apenas uma substituição no nucleosídeo do VHC gera resistência à droga de ação direta. Portanto, o subtipo 1b é um fator de melhor resposta aos agentes antivirais diretos (Zeng et al., 2013).

A esteatose hepática, como previamente citado, ocorre com mais frequência em pacientes infectados pelo genótipo 3 do VHC, provavelmente induzida pelo vírus (Kawaguchi e Mizuta, 2014). A esteatose quando afeta a população em geral, integra uma Síndrome Metabólica constituída ainda pela obesidade, hipertrigliceremia, hipertensão arterial sistêmica e resistência à insulina. Em pacientes com hepatite C crônica, a esteatose associa-se ao aumento da fibrose e também diminui a possibilidade de resposta ao tratamento. (Björnsson; Angulo, 2007). Aproximadamente 53% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC aqui estudados, possuíam esteatose hepática, sem que, entretanto houvesse associação ao desfecho terapêutico. Sato et al. (2014) realizaram um estudo no qual tinham por objetivo avaliar se os polimorfismos do gene IL-28B influenciavam o histórico de doença hepática dos pacientes participantes. Foram encontradas evidências que o genótipo favorável do SNP rs8099917 tem menor probabilidade de apresentar esteatose hepática, confirmando assim o resultado aqui apresentado ($p = 0,046$). Isto pode ocorrer devido à influência do *SNP* no metabolismo lipídico – o genótipo

favorável exporta com mais facilidade os lipídios dos hepatócitos. Nenhuma associação entre a esteatose e o rs12979860 foi encontrada por nós ou pelo estudo citado.

A adesão do paciente à terapia anti-VHC impacta diretamente na taxa de RVS. As doses de PEG-IFN e RBV também devem se manter constantes enquanto a terapia for administrada (Tsubota et al., 2011). Não pudemos acessar os dados de adesão à terapia dos pacientes avaliados e também de redução de dose, pois os prontuários médicos (a maior parte das vezes) não continham este tipo de informação, o que reflete uma baixa qualidade de preenchimento e deve ser ressaltado. É lamentado! Destacamos ainda que o tipo de PEG-IFN (alfa 2a ou alfa 2b) não interferiu no desfecho, ratificando estudos internacionais de maior porte (McHutchison et al., 2009).

A Ribavirina pode causar anemia cujo manuseio pode demandar a diminuição de sua dose (o que deve ser evitado para não impactar negativamente a RVS), ou pode-se associar o uso de EPO, preservando a potência plena da terapia. A diminuição da dose do PEG-IFN durante as primeiras doze semanas de tratamento pode influenciar negativamente na queda da carga viral, reduzindo a taxa de RVPp, RVPc e RVS. O PEG-IFN também pode induzir a queda na contagem de neutrófilos, sendo necessária a administração de G-CFS (Tsubota et al., 2011, Liu et al., 2013). Avaliamos a presença de anemia, no entanto não pudemos associá-la à maior taxa de RVS. Por outro lado, pacientes que apresentaram anemia e neutropenia, demandando o uso de EPO, G-CFS ou ambos, obtiveram maior taxa de RVS – provavelmente refletindo a manutenção da potência da terapia.

Durante o tratamento, a carga viral do VHC é avaliada em momentos pré-definidos, a fim de determinar o padrão de decaimento e prever a efetividade da terapia. Os momentos de avaliação são: pré-tratamento, nas semanas 4, 12, 24, 48 ou 72 (fim de terapia) e 24 semanas após o término da terapia.

A RVR, a não detecção do RNA VHC na quarta semana de tratamento associa-se fortemente à obtenção de RVS. Yu et al. (2007) sugerem que

pacientes com RVR e sem fatores basais negativos como cirrose hepática, podem ter o período de tratamento reduzido, minimizando os eventos adversos e também os impactos econômicos.

A RVPp (queda de $2\log_{10}$) e RVPc (não detecção do RNA VHC) são avaliadas na décima segunda semana de tratamento, possuindo valor preditivo negativo de RVS quando ausentes, segundo García-Samaniego et al. (2013) e também auxiliam na decisão de manter ou não o paciente sob terapia anti-VHC. A ausência de RVP determina a imediata suspensão da terapia.

Pudemos avaliar que a RVR, RVPp, RVPc ocorreram com mais frequência no grupo RVS, ratificando seu valor na predição da possibilidade de RVS como citado na literatura (Chung et al., 2013)

A cinética viral, ou seja, o padrão de decaimento da viremia durante a terapia, é influenciada pelo genótipo dos *SNPs* do hospedeiro. O alelo T do *SNP* rs12979860 e o alelo G do *SNP* rs8099917 influenciam negativamente na primeira fase de declínio da carga viral (do primeiro ao quarto dia de terapia), de acordo com Bochud et al. (2011), reduzindo a possibilidade de obtenção de RVR e RVS. O alelo G do *SNP* rs8099917 também influencia desfavoravelmente na segunda fase de declínio (7 dias de terapia), levando a uma queda mais modesta da carga viral do VHC. Observamos em nossos pacientes que o rs12980275 e o rs12979860 influenciam na RVR, enquanto o *SNP* rs8099917 não foi associado ao desfecho precoce.

A etnia é um fator chave que faz com que a intensidade de associação e a frequência dos *SNPs* seja diferente entre as populações. A heterogeneidade é uma característica da população brasileira, resultante da mistura de europeus, africanos e ameríndios. Neste estudo a classificação da variável etnia foi realizada através do sistema Hcnet, um sistema de cadastro dos pacientes atendidos no HCFMUSP, no qual o indivíduo informa seus dados e também sua etnia. Como a coleta de dados é baseada na informação dada pelo paciente que utiliza o critério cor da pele e não a raça, esta pode ser uma limitação deste estudo. Mesmo assim, o *SNP* rs8099917 foi estatisticamente significativo para esta variável, sendo que a maior parte dos pacientes não

negros possui genótipo TT. Isto é confirmado pelo estudo *HapMap* (International HapMap Consortium, 2005; Manolio e Collins, 2009) que mostra que o alelo G deste *SNP*, é encontrado em menor frequência na população africana subsariana, evidenciando que o ancestral influencia na herança genética da população.

Os *SNPs* rs12979860 e rs8099917 são utilizados como fatores de predição de resposta à terapia anti-VHC em populações europeia e japonesa, respectivamente. Além destes, o pouco estudado e divulgado *SNP* rs12980275. De forma marcante, e há que se destacar, esse foi o único *SNP* capaz de prever o desfecho da terapia em nossa população. Inclusive de forma independente de outras variáveis. Tal fato é preocupante pois existem outros estudos como de Grandi et al. (2013) que utilizaram casuística brasileira para avaliar estudo de *SNPs* do gene IL-28B, no entanto o rs12980275 não foi avaliado o que pode ter causado diferenças de resultados que podem induzir a interpretações equivocadas dos resultados. Pelo melhor que sabemos, nosso estudo é o primeiro, e até o momento o único, a analisar em uma coorte consolidada os três distintos *SNPs*.

Por fim, o desfecho da terapia dos pacientes avaliados por nós, evidenciou uma modesta taxa de RVS 32%, em linha com o previamente descrito por Araújo et al., (2007b) e Almeida et al.(2010) no Brasil. Importante destacar que as variáveis supra-citadas podem justificar a baixa resposta, se comparada aos dados oriundos de países de predominância caucasiana ou de orientais, assim como os Estudos de Registro dos PEG-IFNs. Mas, certamente as características genéticas de nossa população refletiram-se na baixa resposta e isso reforça a necessidade de melhor conhecer as nossas características como hora fazemos.

Em resumo, os *SNPs* que se mostraram influentes na RVS foram: rs12979860 e rs12980275, enquanto não foi encontrada nenhuma associação entre o rs8099917 e o sucesso da terapia. Porém, numa análise multivariada, concluímos que apenas o rs12980275 influencia na RVS independente de outras variáveis.

7. CONCLUSÃO

7.1 Frequência dos SNPs

7.1.1 Na população estudada foram observadas as seguintes frequências para o *SNP* rs12979860: CC 10,1%, CT 54,4% e TT 35,4% no grupo NR; CC 43,2%, CT 35,1% e TT 21,6% no grupo RVNS; CC 47,3%, CT 36,4% e TT 16,4% no grupo RVS.

7.1.2 Para o *SNP* rs8099917 foram observadas as seguintes frequências: TT 44,3%, TG 51,9% e GG 3,8 no grupo NR; TT 62,2%, TG 35,1% e GG 2,7% no grupo RVNS; TT 65,5%, TG 30,9% e GG 3,5% no grupo RVS.

7.1.3. O *SNP* rs12980275 foram observadas as seguintes frequências: AA 17,7%, AG 59,5% e GG 22,8 no grupo NR; AA 37,8%, AG 45,9% e GG 16,2% no grupo RVNS; AA 45,5%, AG 45,5 e GG 9,1% no grupo RVS.

7.2 O único *SNP* independentemente associado à predição do desfecho da terapia foi o rs12980275.

7.3 A recomendação para predição de resposta basal em pacientes brasileiros a ser tratados com terapia à base de interferon peguilado e ribavirina é a utilização de *SNP* rs12980275 em que pacientes cujo genótipo seja AG tem 56% menos chance de RVS e o genótipo GG tem 77% menos chance de RVS quando comparados ao genótipo favorável AA.

ANEXO 1

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO:..... CIDADE.....
- CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO:..... CIDADE:
- CEP:.....TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE IL28B NA RESPOSTA À TERAPIA COM INTERFERON PEGUILADO E RIBAVIRINA EM PACIENTES TRATADOS POR HEPATITE C CRÔNICA

PESQUISADOR PRINCIPAL : DR. EVALDO STANISLAU AFFONSO DE ARAÚJO

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 72.705

UNIDADE DO HCFMUSP: IMT – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

PESQUISADOR EXECUTANTE: LUCIANE LILIAN CRISTINA PATRICIO MARTINS

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

- | | | | |
|--------------|-------------------------------------|-------------|--------------------------|
| RISCO MÍNIMO | <input checked="" type="checkbox"/> | RISCO MÉDIO | <input type="checkbox"/> |
| RISCO BAIXO | <input type="checkbox"/> | RISCO MAIOR | <input type="checkbox"/> |

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 6 meses.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Objetivo do Estudo:

O presente estudo visa analisar uma amostra do seu sangue para definir o tipo de resposta do seu corpo quando ele é tratado contra a hepatite C. Isso é feito pela detecção de uma alteração no seu DNA (uma característica que nasceu com o Sr(a) e que define as suas características gerais, como a cor dos seus olhos, do cabelo e, no caso que pesquisamos, se uma parte do seu organismo seria mais forte na resposta ao tratamento da hepatite C) responsável pelo que denominamos informações genéticas.

No caso da hepatite C existem três tipos de variações (sendo que você nasceu com uma dessas três) que têm sido associados a resposta ao tratamento.

Devido a sua importância queremos conhecer como essas características de nascimento (o que chamamos de características genéticas) estão presentes nos pacientes, que como o Sr(a), vamos estudar e depois verificar a influência dessas características vendo como foi o resultado do tratamento de acordo com elas (se o Sr(a) ficou bom, ou não).

Na prática do dia a dia relacionado a sua saúde, fora essa situação da hepatite C que o Sr(a) possui ou possuía, esses termos e informações não terão serventia ao Sr(a), entretanto sinta-se à vontade para nos perguntar algo mais que não tenha entendido sobre essa explicação complicada que fizemos.

2 – Procedimentos do estudo

Se o Sr(a) se dispuser a participar voluntariamente deste estudo, seu prontuário médico (as anotações feitas pelos médicos durante as suas consultas) será analisado e será necessária uma coleta de sangue para a análise dos polimorfismos (variação genética). Na prática o Sr(a) apenas retirará uma amostra de sangue por uma punção venosa periférica (uma “picadinha” na sua veia feita por uma agulha e seringa).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

3 – Descrição da coleta de sangue venoso periférico

Como preparação para a coleta é necessário ficar sem comer por pelo menos 4 horas. Na coleta a pele será desinfetada com álcool e um garrote será colocado ao redor do braço, e depois com uma agulha serão coletados 2 tubos de sangue.

4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos

Hematoma: pode ocorrer quando o local da coleta não é comprimido quando a agulha é retirada da pele. É uma mancha arroxeadada que sairá após alguns dias e não causa dor.

Trombose: pode ocorrer pelo traumatismo da veia por várias picadas. É uma pequena obstrução dessa veia que também não ocorre com frequência e não tem maiores complicações.

Sangramento: em pacientes com doenças hemorrágicas ou em uso de anticoagulantes, o sangramento pode continuar mesmo que se faça compressão no local puncionado. Essa é uma eventualidade rara e que após uma compressão mais prolongada habitualmente se resolve.

Lipotimia (“desmaio”): pode ocorrer em pacientes emotivos, hipoglicêmicos (diminuição do nível de açúcar no sangue, pode ocorrer em pessoas que ficam muito tempo sem comer) ou subnutridos (ocorre em pessoas que não se alimentam corretamente). É um quadro no qual a pessoa pode ter uma intensa sudorese (suar frio), pode ficar pálida (pele muito descorada, branca) e às vezes acha que vai desmaiar. Se isso ocorrer, o que não é provável, o repouso e uma ingestão de líquidos são suficientes para a recuperação rápida.

5 – Benefícios para o participante

Trata-se de um estudo voluntário onde o Sr(a) poderá ajudar a entendermos melhor como a hepatite C responde ao tratamento por causa dessa característica genética. O Sr(a) não receberá nenhum benefício adicional quando comparado a outros pacientes mas poderá saber o resultado e levar ao seu médico para que ele conheça e avalie, se assim desejar.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

6 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O investigador é a Biomédica **Luciane Lilian Cristina Patricio Martins**, CRBM 14.928, e o investigador responsável é o **Dr. Evaldo Stanislau Affonso de Araújo**, CRM 72.705. Ambos podem ser encontrados no telefone **(11) 3085-1601**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.

7 – Participação voluntária / Descontinuação do estudo

Sua participação nesta pesquisa será absolutamente voluntária. Ficará a seu critério participar ou não do estudo. Mesmo que decida participar, sinta-se à vontade de deixá-lo a qualquer momento, sem precisar apresentar uma razão para tal. Esta atitude não afetará seu tratamento médico futuro de forma alguma.

8 – Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

9 – Despesas e compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Portanto, nenhum benefício financeiro ou pessoal será auferido ao Sr(a). Sua participação será espontânea e voluntária.

10 – Utilização dos dados

O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa e seus desdobramentos (elaboração de materiais científicos: artigos, resumos de congresso, aulas, etc) sempre preservando a identidade dos participantes.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Influência dos polimorfismos do gene IL28B na resposta à terapia com Interferon Peguilado e Ribavirina em pacientes tratados por hepatite C crônica”.

Eu discuti com a Biomédica **Luciane Lilian Cristina Patricio Martins** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

ANEXO 2

Ficha de Coleta de Dados

Nome:	Data de Nasc.:	Idade:	Raça:
Registro HC:	Genótipo VHC:	Peso:	Altura:
Tratamento:		Terapia prévia:	
Desfecho terapêutico:			

Biópsia Hepática:

PCR	Pré-trat	Sem 4	Sem 12	Sem 24	Sem 48
Qualitativo					
Quantitativo					

Exames	Pré-trat	Sem 4	Sem 12	Sem 24	Sem 48/72	Follow up
ALT						
AST						
BD						
BI						
BT						
FAL						
GGT						
Hb						
Ht						
Leuco						
Neutrof						
Plaquetas						
Alfafeto						
Glicose						
Insulina						
HOMA						
Col						
Tri						
HDL						
VLDL						
LDL						
Creat						
TP						
TSH						
T4L						
Ferritina						

Tabagista sim
 não

Etilista sim
 não

Drogas Ilícitas sim
 não

Data do Diagnóstico:

Modo de Infecção:

Eventos adversos:

Comorbidades:

Uso de Adjuvantes:

ANEXO 3

Tabela 11. Grau de fibrose hepática e características do grupo de estudo

Variável	Grau de Fibrose				Total		P
	F0-F2		F3-F4		N	%	
	N	%	N	%			
Gênero							0,475*
Feminino	65	55,1	23	48,9	88	53,3	
Masculino	53	44,9	24	51,1	77	46,7	
Etnia							0,885*
Negro	19	16,1	8	17,0	27	16,4	
Não negro	99	83,9	39	83,0	138	83,6	
Genótipo							0,166#
VHC							
1	11	9,3	2	4,3	13	7,9	
1a	38	32,2	13	27,7	51	30,9	
1b	65	55,1	32	68,1	97	58,8	
1a1b	4	3,4	0	0,0	4	2,4	

* resultado do teste qui-quadrado; # resultado do teste da razão de verossimilhanças

Tabela 12. Presença ou ausência de esteatose hepática e características do grupo de estudo

Variável	Esteatose				Total		p
	Não		Sim		n	%	
	n	%	n	%			
Gênero							0,558
Feminino	38	50,7	47	55,3	85	53,1	
Masculino	37	49,3	38	44,7	75	46,9	
Etnia							0,884
Negro	13	17,3	14	16,5	27	16,9	
Não negro	62	82,7	71	83,5	133	83,1	
Genótipo							0,051#
VHC							
1	4	5,3	9	10,6	13	8,1	
1a	25	33,3	25	29,4	50	31,2	
1b	42	56,0	51	60,0	93	58,1	
1a1b	4	5,3	0	0,0	4	2,5	

* resultado do teste qui-quadrado; # resultado do teste da razão de verossimilhanças

ANEXO 4

Tabela 13. Descrição das medidas de função hepática segundo resposta ao tratamento e momentos de aferições

Aferição	Resposta												
	NR			RVNS			RVS			Total			
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	
ALT	Pré	89,69	61,62	75	76,12	54,00	34	100,32	91,76	47	89,94	70,76	156
	4 semanas	56,87	47,12	70	44,48	33,22	31	37,90	19,88	42	48,62	38,70	143
	12 semanas	44,64	66,53	70	34,22	21,89	32	33,11	35,77	35	39,26	52,01	137
	24 semanas	35,13	31,38	67	29,56	20,29	25	32,85	46,04	39	33,39	34,64	131
	48 semanas	38,37	31,12	38	26,03	21,01	29	22,82	10,90	39	29,27	23,46	106
	Follow-up	75,07	50,28	72	53,28	32,37	29	23,36	17,34	44	55,02	45,25	145
AST	Pré	65,45	43,43	76	59,06	44,00	34	62,90	43,58	48	63,30	43,39	158
	4 semanas	47,66	30,10	70	39,42	23,65	31	35,74	15,16	42	42,37	25,56	143
	12 semanas	41,84	40,13	69	34,81	16,44	32	35,14	24,65	35	38,46	32,22	136
	24 semanas	35,57	23,27	67	32,32	16,75	25	39,62	52,68	39	36,15	33,83	131
	48 semanas	37,58	19,76	38	30,54	16,80	28	27,97	12,65	40	32,09	16,96	106
	Follow-up	63,19	55,11	72	41,73	18,18	30	24,91	14,51	44	47,25	43,58	146
BD	Pré	0,28	0,13	57	0,22	0,11	27	0,25	0,11	42	0,26	0,12	126
	4 semanas	0,35	0,18	52	0,30	0,18	20	0,32	0,15	33	0,33	0,17	105
	12 semanas	0,30	0,14	47	0,27	0,15	26	0,30	0,13	27	0,29	0,14	100
	24 semanas	0,24	0,11	49	0,22	0,13	22	0,27	0,15	34	0,25	0,13	105
	48 semanas	0,23	0,12	31	0,22	0,14	22	0,22	0,11	35	0,22	0,12	88
	Follow-up	0,24	0,11	62	0,22	0,17	21	0,19	0,10	37	0,22	0,12	120
BI	Pré	0,52	0,22	57	0,61	0,30	27	0,53	0,26	42	0,54	0,25	126
	4 semanas	0,64	0,25	52	0,67	0,44	20	0,69	0,42	33	0,66	0,35	105
	12 semanas	0,57	0,28	47	0,61	0,44	26	0,69	0,34	27	0,62	0,34	100
	24 semanas	0,51	0,36	49	0,60	0,39	22	0,54	0,32	34	0,54	0,35	105
	48 semanas	0,49	0,38	31	0,53	0,57	21	0,43	0,32	35	0,47	0,41	87
	Follow-up	0,45	0,23	62	0,44	0,17	21	0,45	0,30	37	0,45	0,25	120
BT	Pré	0,81	0,30	57	0,83	0,37	27	0,78	0,35	42	0,80	0,33	126
	4 semanas	0,98	0,38	52	0,97	0,60	20	1,01	0,54	33	0,99	0,48	105
	12 semanas	0,87	0,37	47	0,87	0,56	27	0,99	0,44	27	0,90	0,44	101
	24 semanas	0,75	0,44	49	0,81	0,48	22	0,80	0,44	33	0,78	0,45	104
	48 semanas	0,72	0,48	31	0,74	0,68	22	0,64	0,42	35	0,70	0,51	88
	Follow-up	0,69	0,29	62	0,63	0,23	21	0,64	0,38	37	0,66	0,31	120
FAL	Pré	76,10	26,17	71	82,48	25,63	31	71,87	20,14	45	76,15	24,49	147
	4 semanas	73,11	23,42	60	79,58	22,43	26	73,63	19,45	35	74,65	22,10	121
	12 semanas	68,61	21,24	57	77,89	15,20	27	70,72	20,01	32	71,35	19,84	116
	24 semanas	68,08	17,51	60	73,00	16,28	21	71,91	17,47	35	70,13	17,27	116
	48 semanas	72,94	14,76	36	66,62	17,46	26	69,59	19,95	37	70,03	17,55	99
	Follow-up	73,99	25,74	68	73,21	18,12	24	64,50	17,27	36	71,17	22,55	128
GGT	Pré	115,95	112,23	74	78,52	55,87	31	57,50	47,39	44	90,90	90,42	149
	4 semanas	99,27	83,60	64	80,58	59,60	24	53,97	38,65	37	82,27	70,93	125
	12 semanas	69,81	57,67	57	58,64	42,88	28	42,75	32,21	32	59,74	49,40	117
	24 semanas	65,10	64,66	61	48,13	28,35	23	68,29	107,12	34	62,71	74,74	118
	48 semanas	66,42	82,12	36	44,24	18,84	25	43,36	49,70	39	51,88	59,49	100
	Follow-up	96,20	83,44	69	49,56	28,60	27	35,45	49,08	42	68,59	71,58	138

ALT, alanina amino transferase; **AST**, aspartato amino transferase; **BD**, bilirrubina direta; **BI** bilirrubina indireta; **BT**, bilirrubina total; **FAL**, fosfatase alcalina; **GGT** gama glutamil transferase

Tabela 14. Descrição das medidas hematimétricas segundo resposta ao tratamento e momentos de aferições.

Variável	Aferição	Resposta											
		NR			RVNS			RVS			Total		
		Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
Hb	Pré	15,05	1,35	73	14,93	2,19	33	14,82	1,18	46	14,95	1,52	152
	4 semanas	12,97	1,57	69	13,57	1,49	31	12,65	1,45	43	13,00	1,54	143
	12 semanas	12,03	1,57	72	12,19	1,48	32	11,37	1,49	41	11,88	1,56	145
	24 semanas	11,92	1,54	66	11,98	1,31	26	11,40	1,36	48	11,75	1,45	140
	48 semanas	12,04	1,58	39	11,58	1,23	31	11,62	1,43	42	11,75	1,43	112
	Follow-up	14,66	1,68	73	14,57	1,58	30	14,47	1,18	44	14,58	1,52	147
Ht	Pré	44,34	3,62	73	44,00	6,30	33	43,91	3,19	46	44,13	4,21	152
	4 semanas	38,90	3,90	69	40,51	3,93	31	38,17	3,52	43	39,03	3,87	143
	12 semanas	37,44	4,17	72	37,74	4,08	32	35,46	4,10	41	36,95	4,21	145
	24 semanas	36,91	4,33	66	37,09	3,11	26	35,62	3,69	48	36,50	3,94	140
	48 semanas	37,67	4,36	39	36,41	3,50	30	36,39	3,54	42	36,84	3,85	111
	Follow-up	43,41	4,29	73	43,41	3,52	30	42,72	2,98	44	43,21	3,78	147
Leucócitos	Pré	6,36	1,94	73	6,28	2,00	33	6,31	1,88	46	6,33	1,92	152
	4 semanas	4,30	1,78	69	4,03	1,19	31	3,77	1,24	43	4,08	1,53	143
	12 semanas	3,66	1,64	72	4,04	2,14	32	3,08	1,14	41	3,58	1,67	145
	24 semanas	3,78	1,52	66	3,56	1,90	26	3,25	1,38	48	3,55	1,56	140
	48 semanas	3,76	2,19	39	3,10	0,88	31	3,42	1,56	42	3,45	1,68	112
	Follow-up	5,67	1,74	73	5,63	1,68	30	6,05	1,59	44	5,78	1,68	147
Neutrófilos	Pré	3,16	1,27	73	3,29	1,19	33	3,42	1,47	46	3,27	1,32	152
	4 semanas	2,03	1,17	69	1,81	0,83	31	1,73	0,80	43	1,89	1,00	143
	12 semanas	1,83	1,16	72	1,97	1,15	31	1,48	0,71	41	1,76	1,06	144
	24 semanas	2,08	1,13	66	2,00	1,65	26	1,71	1,03	48	1,94	1,21	140
	48 semanas	2,11	1,76	39	1,74	0,74	30	1,87	1,00	42	1,92	1,27	111
	Follow-up	2,89	1,17	73	3,12	1,37	30	3,27	1,18	44	3,05	1,22	147
Plaquetas	Pré	200,66	62,13	71	191,91	54,64	33	196,84	55,50	45	197,57	58,30	149
	4 semanas	176,71	74,80	70	157,67	47,54	30	156,72	48,03	43	166,71	62,93	143
	12 semanas	164,74	75,83	72	146,72	52,86	32	151,93	55,66	41	157,14	66,02	145
	24 semanas	171,41	77,70	64	145,85	50,30	26	153,94	64,80	48	160,51	69,21	138
	48 semanas	163,44	72,56	39	147,55	51,25	31	167,76	67,74	41	160,59	65,37	111
	Follow-up	196,09	58,94	70	198,07	45,82	30	196,57	61,00	44	196,65	56,76	144

Hb, hemoglobina; **Ht**, hematócrito

ANEXO 5

Tabela 15. Resultado das comparações múltiplas da alanina amino transferase entre os grupos de resposta e aferições

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	33,71	5,24	1	<0,001	14,90	52,52
	Pré - 12 semanas	45,34	6,44	1	<0,001	22,20	68,48
	Pré - 24 semanas	54,29	7,10	1	<0,001	28,77	79,82
	Pré - 48 semanas	54,91	8,27	1	<0,001	25,20	84,63
	Pré - Follow-up	14,16	7,50	1	>0,999	-12,78	41,11
	4 semanas - 12 semanas	11,63	5,32	1	>0,999	-7,48	30,73
	4 semanas - 24 semanas	20,58	6,60	1	0,280	-3,15	44,31
	4 semanas - 48 semanas	21,20	8,06	1	>0,999	-7,77	50,17
	4 semanas - Follow-up	-19,55	7,40	1	>0,999	-46,15	7,05
	12 semanas - 24 semanas	8,96	5,45	1	>0,999	-10,63	28,55
	12 semanas - 48 semanas	9,57	7,56	1	>0,999	-17,60	36,75
	12 semanas - Follow-up	-31,18	7,10	1	0,002	-56,69	-5,67
	24 semanas - 48 semanas	0,62	6,52	1	>0,999	-22,82	24,06
	24 semanas - Follow-up	-40,13	6,60	1	<0,001	-63,84	-16,43
	48 semanas - Follow-up	-40,75	6,56	1	<0,001	-64,33	-17,17
	RVNS	Pré - 4 semanas	29,38	7,80	1	0,025	1,35
Pré - 12 semanas		41,47	9,60	1	0,002	6,97	75,97
Pré - 24 semanas		47,17	10,98	1	0,003	7,73	86,61
Pré - 48 semanas		48,83	11,15	1	0,002	8,77	88,89
Pré - Follow-up		22,77	11,46	1	>0,999	-18,41	63,95
4 semanas - 12 semanas		12,09	7,91	1	>0,999	-16,32	40,50
4 semanas - 24 semanas		17,79	10,28	1	>0,999	-19,15	54,73
4 semanas - 48 semanas		19,45	10,86	1	>0,999	-19,57	58,47
4 semanas - Follow-up		-6,61	11,37	1	>0,999	-47,48	34,26
12 semanas - 24 semanas		5,70	8,43	1	>0,999	-24,60	36,00
12 semanas - 48 semanas		7,36	9,98	1	>0,999	-28,51	43,23
12 semanas - Follow-up		-18,70	10,90	1	>0,999	-57,86	20,47
24 semanas - 48 semanas		1,66	8,74	1	>0,999	-29,73	33,05
24 semanas - Follow-up		-24,40	10,53	1	>0,999	-62,22	13,42
48 semanas - Follow-up		-26,06	8,37	1	0,284	-56,14	4,02
RVS		Pré - 4 semanas	66,40	6,79	1	<0,001	41,99
	Pré - 12 semanas	68,69	8,59	1	<0,001	37,82	99,57
	Pré - 24 semanas	68,26	9,11	1	<0,001	35,54	100,98
	Pré - 48 semanas	72,51	9,45	1	<0,001	38,56	106,46
	Pré - Follow-up	77,23	9,48	1	<0,001	43,18	111,29
	4 semanas - 12 semanas	2,30	7,31	1	>0,999	-23,98	28,58
	4 semanas - 24 semanas	1,86	8,59	1	>0,999	-29,00	32,73
	4 semanas - 48 semanas	6,11	9,25	1	>0,999	-27,13	39,36
	4 semanas - Follow-up	10,84	9,44	1	>0,999	-23,08	44,75
	12 semanas - 24 semanas	-0,43	7,52	1	>0,999	-27,44	26,57
	12 semanas - 48 semanas	3,82	8,93	1	>0,999	-28,28	35,91
	12 semanas - Follow-up	8,54	9,43	1	>0,999	-25,33	42,41
	24 semanas - 48 semanas	4,25	7,12	1	>0,999	-21,34	29,84
	24 semanas - Follow-up	8,97	8,56	1	>0,999	-21,77	39,72
	48 semanas - Follow-up	4,73	7,15	1	>0,999	-20,96	30,41
	Pré	NR - RVNS	13,25	9,69	1	>0,999	-21,58
NR - RVS		-11,20	8,67	1	>0,999	-42,36	19,95
RVNS - RVS		-24,46	10,53	1	>0,999	-62,29	13,37
4 semanas	NR - RVNS	8,92	9,93	1	>0,999	-26,76	44,60
	NR - RVS	21,48	8,90	1	>0,999	-10,49	53,45
	RVNS - RVS	12,56	10,84	1	>0,999	-26,37	51,49
12 semanas	NR - RVNS	9,38	9,90	1	>0,999	-26,18	44,95
	NR - RVS	12,15	9,24	1	>0,999	-21,06	45,36
	RVNS - RVS	2,77	11,09	1	>0,999	-37,09	42,62
24 semanas	NR - RVNS	6,13	10,47	1	>0,999	-31,47	43,73
	NR - RVS	2,76	9,14	1	>0,999	-30,07	35,59
	RVNS - RVS	-3,37	11,42	1	>0,999	-44,40	37,67
48 semanas	NR - RVNS	7,17	10,81	1	>0,999	-31,67	46,01
	NR - RVS	6,39	9,83	1	>0,999	-28,92	41,70
	RVNS - RVS	-0,78	11,13	1	>0,999	-40,76	39,20
Follow-up	NR - RVNS	21,86	10,19	1	>0,999	-14,73	58,46
	NR - RVS	51,87	8,87	1	<0,001	20,00	83,74
	RVNS - RVS	30,00	11,05	1	>0,999	-9,68	69,69

Tabela 16. Resultado das comparações múltiplas da aspartato amino transferase entre os grupos de resposta e aferições

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	18,11	3,98	1	0,001	3,81	32,41
	Pré - 12 semanas	23,86	4,85	1	<0,001	6,43	41,28
	Pré - 24 semanas	29,35	5,28	1	<0,001	10,38	48,32
	Pré - 48 semanas	28,97	6,15	1	<0,001	6,88	51,05
	Pré - Follow-up	2,14	5,49	1	>0,999	-17,61	21,88
	4 semanas - 12 semanas	5,75	4,08	1	>0,999	-8,92	20,42
	4 semanas - 24 semanas	11,24	4,98	1	>0,999	-6,64	29,12
	4 semanas - 48 semanas	10,85	6,05	1	>0,999	-10,87	32,58
	4 semanas - Follow-up	-15,97	5,47	1	0,536	-35,63	3,68
	12 semanas - 24 semanas	5,49	4,18	1	>0,999	-9,54	20,52
	12 semanas - 48 semanas	5,11	5,73	1	>0,999	-15,50	25,71
	12 semanas - Follow-up	-21,72	5,30	1	0,006	-40,77	-2,67
	24 semanas - 48 semanas	-0,39	4,99	1	>0,999	-18,32	17,55
	24 semanas - Follow-up	-27,22	4,97	1	<0,001	-45,06	-9,37
	48 semanas - Follow-up	-26,83	5,02	1	<0,001	-44,85	-8,81
	RVNS	Pré - 4 semanas	18,37	5,96	1	0,314	-3,04
Pré - 12 semanas		24,06	7,23	1	0,133	-1,91	50,02
Pré - 24 semanas		27,52	8,19	1	0,119	-1,91	56,95
Pré - 48 semanas		27,74	8,29	1	0,126	-2,05	57,53
Pré - Follow-up		17,52	8,36	1	>0,999	-12,52	47,56
4 semanas - 12 semanas		5,68	6,04	1	>0,999	-16,03	27,39
4 semanas - 24 semanas		9,15	7,76	1	>0,999	-18,72	37,02
4 semanas - 48 semanas		9,37	8,15	1	>0,999	-19,91	38,64
4 semanas - Follow-up		-0,85	8,35	1	>0,999	-30,85	29,15
12 semanas - 24 semanas		3,46	6,45	1	>0,999	-19,71	26,63
12 semanas - 48 semanas		3,68	7,57	1	>0,999	-23,52	30,89
12 semanas - Follow-up		-6,54	8,05	1	>0,999	-35,47	22,39
24 semanas - 48 semanas		0,22	6,75	1	>0,999	-24,05	24,49
24 semanas - Follow-up		-10,00	7,87	1	>0,999	-38,27	18,27
48 semanas - Follow-up		-10,22	6,38	1	>0,999	-33,13	12,69
RVS		Pré - 4 semanas	28,72	5,14	1	<0,001	10,24
	Pré - 12 semanas	28,71	6,45	1	0,001	5,54	51,88
	Pré - 24 semanas	24,07	6,76	1	0,057	-0,22	48,37
	Pré - 48 semanas	30,65	6,94	1	0,002	5,73	55,56
	Pré - Follow-up	38,32	6,94	1	<0,001	13,39	63,25
	4 semanas - 12 semanas	-0,01	5,59	1	>0,999	-20,10	20,08
	4 semanas - 24 semanas	-4,64	6,48	1	>0,999	-27,91	18,62
	4 semanas - 48 semanas	1,93	6,87	1	>0,999	-22,77	26,63
	4 semanas - Follow-up	9,60	6,98	1	>0,999	-15,49	34,69
	12 semanas - 24 semanas	-4,63	5,74	1	>0,999	-25,26	15,99
	12 semanas - 48 semanas	1,94	6,71	1	>0,999	-22,15	26,03
	12 semanas - Follow-up	9,61	7,03	1	>0,999	-15,67	34,88
	24 semanas - 48 semanas	6,57	5,40	1	>0,999	-12,83	25,98
	24 semanas - Follow-up	14,24	6,44	1	>0,999	-8,91	37,39
	48 semanas - Follow-up	7,67	5,40	1	>0,999	-11,74	27,08
	Pré	NR - RVNS	6,27	7,04	1	>0,999	-19,01
NR - RVS		2,50	6,27	1	>0,999	-20,02	25,01
RVNS - RVS		-3,77	7,63	1	>0,999	-31,19	23,65
4 semanas	NR - RVNS	6,53	7,24	1	>0,999	-19,47	32,52
	NR - RVS	13,10	6,49	1	>0,999	-10,23	36,43
	RVNS - RVS	6,57	7,90	1	>0,999	-21,82	34,97
12 semanas	NR - RVNS	6,46	7,22	1	>0,999	-19,46	32,39
	NR - RVS	7,34	6,78	1	>0,999	-17,01	31,69
	RVNS - RVS	0,88	8,10	1	>0,999	-28,24	29,99
24 semanas	NR - RVNS	4,44	7,66	1	>0,999	-23,09	31,96
	NR - RVS	-2,78	6,68	1	>0,999	-26,78	21,21
	RVNS - RVS	-7,22	8,37	1	>0,999	-37,28	22,84
48 semanas	NR - RVNS	5,04	7,99	1	>0,999	-23,66	33,74
	NR - RVS	4,18	7,20	1	>0,999	-21,70	30,05
	RVNS - RVS	-0,86	8,15	1	>0,999	-30,16	28,43
Follow-up	NR - RVNS	21,65	7,35	1	0,494	-4,77	48,07
	NR - RVS	38,68	6,46	1	<0,001	15,47	61,88
	RVNS - RVS	17,02	7,99	1	>0,999	-11,68	45,73

As **Tabelas 15 e 16** mostram que a ALT e a AST diminuem em média estatisticamente nos pacientes NR e RVS do pré para os demais momentos de avaliação, porém nos pacientes NR há aumento no follow-up enquanto que no RVS se mantém, tanto que no follow-up os valores médios de ALT e AST são estatisticamente maiores nos pacientes NR ($p < 0,001$).

Tabela 17. Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina direta entre os grupos de resposta e aferições

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	-0,075	0,014	1	<0,001	-0,124	-0,027
	Pré - 12 semanas	-0,013	0,017	1	>0,999	-0,074	0,049
	Pré - 24 semanas	0,030	0,019	1	>0,999	-0,039	0,099
	Pré - 48 semanas	0,053	0,022	1	>0,999	-0,027	0,133
	Pré - Follow-up	0,032	0,021	1	>0,999	-0,044	0,107
	4 semanas - 12 semanas	0,063	0,014	1	0,001	0,013	0,112
	4 semanas - 24 semanas	0,106	0,017	1	<0,001	0,043	0,168
	4 semanas - 48 semanas	0,128	0,021	1	<0,001	0,052	0,205
	4 semanas - Follow-up	0,107	0,020	1	<0,001	0,034	0,180
	12 semanas - 24 semanas	0,043	0,015	1	0,561	-0,010	0,096
	12 semanas - 48 semanas	0,066	0,020	1	0,151	-0,006	0,137
	12 semanas - Follow-up	0,044	0,019	1	>0,999	-0,025	0,113
	24 semanas - 48 semanas	0,023	0,017	1	>0,999	-0,037	0,082
	24 semanas - Follow-up	0,001	0,017	1	>0,999	-0,059	0,062
	48 semanas - Follow-up	-0,021	0,016	1	>0,999	-0,080	0,037
RVNS	Pré - 4 semanas	-0,080	0,021	1	0,015	-0,154	-0,006
	Pré - 12 semanas	-0,058	0,025	1	>0,999	-0,146	0,031
	Pré - 24 semanas	-0,002	0,028	1	>0,999	-0,103	0,100
	Pré - 48 semanas	0,009	0,031	1	>0,999	-0,101	0,119
	Pré - Follow-up	-0,011	0,033	1	>0,999	-0,129	0,107
	4 semanas - 12 semanas	0,022	0,021	1	>0,999	-0,052	0,097
	4 semanas - 24 semanas	0,079	0,026	1	0,408	-0,015	0,173
	4 semanas - 48 semanas	0,089	0,030	1	0,399	-0,017	0,195
	4 semanas - Follow-up	0,069	0,032	1	>0,999	-0,047	0,185
	12 semanas - 24 semanas	0,056	0,020	1	0,723	-0,015	0,128
	12 semanas - 48 semanas	0,067	0,026	1	>0,999	-0,026	0,159
	12 semanas - Follow-up	0,047	0,029	1	>0,999	-0,059	0,153
	24 semanas - 48 semanas	0,010	0,021	1	>0,999	-0,066	0,087
	24 semanas - Follow-up	-0,009	0,027	1	>0,999	-0,107	0,088
	48 semanas - Follow-up	-0,020	0,023	1	>0,999	-0,103	0,064
RVS	Pré - 4 semanas	-0,074	0,016	1	0,001	-0,133	-0,016
	Pré - 12 semanas	-0,046	0,022	1	>0,999	-0,123	0,032
	Pré - 24 semanas	-0,031	0,023	1	>0,999	-0,114	0,053
	Pré - 48 semanas	0,024	0,025	1	>0,999	-0,065	0,112
	Pré - Follow-up	0,077	0,026	1	0,429	-0,016	0,170
	4 semanas - 12 semanas	0,029	0,018	1	>0,999	-0,037	0,095
	4 semanas - 24 semanas	0,044	0,021	1	>0,999	-0,033	0,121
	4 semanas - 48 semanas	0,098	0,024	1	0,005	0,013	0,183
	4 semanas - Follow-up	0,152	0,025	1	<0,001	0,061	0,243
	12 semanas - 24 semanas	0,015	0,019	1	>0,999	-0,052	0,082
	12 semanas - 48 semanas	0,070	0,022	1	0,263	-0,010	0,149
	12 semanas - Follow-up	0,123	0,025	1	<0,001	0,034	0,211
	24 semanas - 48 semanas	0,054	0,016	1	0,129	-0,004	0,113
	24 semanas - Follow-up	0,108	0,021	1	<0,001	0,032	0,184
	48 semanas - Follow-up	0,053	0,017	1	0,283	-0,008	0,115
Pré	NR - RVNS	0,056	0,030	1	>0,999	-0,052	0,164
	NR - RVS	0,022	0,026	1	>0,999	-0,073	0,116
	RVNS - RVS	-0,034	0,032	1	>0,999	-0,149	0,081
4 semanas	NR - RVNS	0,051	0,031	1	>0,999	-0,060	0,163
	NR - RVS	0,023	0,027	1	>0,999	-0,074	0,119
	RVNS - RVS	-0,029	0,033	1	>0,999	-0,148	0,091
12 semanas	NR - RVNS	0,011	0,030	1	>0,999	-0,097	0,119
	NR - RVS	-0,011	0,028	1	>0,999	-0,111	0,088
	RVNS - RVS	-0,022	0,033	1	>0,999	-0,140	0,096
24 semanas	NR - RVNS	0,024	0,031	1	>0,999	-0,086	0,134
	NR - RVS	-0,039	0,027	1	>0,999	-0,136	0,058
	RVNS - RVS	-0,063	0,033	1	>0,999	-0,181	0,054
48 semanas	NR - RVNS	0,012	0,032	1	>0,999	-0,102	0,126
	NR - RVS	-0,007	0,028	1	>0,999	-0,108	0,093
	RVNS - RVS	-0,019	0,033	1	>0,999	-0,137	0,099
Follow-up	NR - RVNS	0,014	0,031	1	>0,999	-0,098	0,126
	NR - RVS	0,067	0,026	1	>0,999	-0,028	0,162
	RVNS - RVS	0,054	0,034	1	>0,999	-0,067	0,175

A **Tabela 17** mostra que os pacientes RVS apresentam diminuição média de BD um pouco mais tardia que pacientes NR, sendo que estes de 4 semanas para as demais o valor de BD diminui estatisticamente ($p < 0,05$), enquanto que os RVS apresentam redução de 4 para 48 semanas apenas e continuam reduzindo no follow-up.

Tabela 18. Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina indireta entre grupos de resposta e aferições.

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	-0,120	0,020	1	<0,001	-0,193	-0,047
	Pré - 12 semanas	-0,032	0,027	1	>0,999	-0,128	0,065
	Pré - 24 semanas	0,021	0,031	1	>0,999	-0,091	0,134
	Pré - 48 semanas	0,092	0,037	1	>0,999	-0,042	0,225
	Pré - Follow-up	0,071	0,037	1	>0,999	-0,063	0,204
	4 semanas - 12 semanas	0,088	0,021	1	0,003	0,014	0,163
	4 semanas - 24 semanas	0,141	0,027	1	<0,001	0,044	0,238
	4 semanas - 48 semanas	0,212	0,034	1	<0,001	0,089	0,335
	4 semanas - Follow-up	0,191	0,034	1	<0,001	0,067	0,314
	12 semanas - 24 semanas	0,053	0,022	1	>0,999	-0,027	0,132
	12 semanas - 48 semanas	0,124	0,031	1	0,009	0,013	0,234
	12 semanas - Follow-up	0,102	0,031	1	0,172	-0,011	0,215
	24 semanas - 48 semanas	0,071	0,025	1	0,653	-0,018	0,160
	24 semanas - Follow-up	0,049	0,026	1	>0,999	-0,046	0,144
	48 semanas - Follow-up	-0,022	0,024	1	>0,999	-0,109	0,066
	RVNS	Pré - 4 semanas	-0,067	0,031	1	>0,999	-0,178
Pré - 12 semanas		-0,017	0,039	1	>0,999	-0,156	0,122
Pré - 24 semanas		0,028	0,046	1	>0,999	-0,137	0,194
Pré - 48 semanas		0,050	0,052	1	>0,999	-0,136	0,236
Pré - Follow-up		0,176	0,057	1	0,301	-0,028	0,381
4 semanas - 12 semanas		0,050	0,031	1	>0,999	-0,061	0,161
4 semanas - 24 semanas		0,095	0,041	1	>0,999	-0,051	0,241
4 semanas - 48 semanas		0,116	0,048	1	>0,999	-0,056	0,288
4 semanas - Follow-up		0,243	0,054	1	0,001	0,049	0,437
12 semanas - 24 semanas		0,045	0,030	1	>0,999	-0,062	0,152
12 semanas - 48 semanas		0,066	0,040	1	>0,999	-0,079	0,212
12 semanas - Follow-up		0,193	0,048	1	0,009	0,020	0,366
24 semanas - 48 semanas		0,022	0,032	1	>0,999	-0,093	0,137
24 semanas - Follow-up		0,148	0,043	1	0,076	-0,005	0,301
48 semanas - Follow-up		0,127	0,036	1	0,058	-0,002	0,255
RVS		Pré - 4 semanas	-0,177	0,024	1	<0,001	-0,264
	Pré - 12 semanas	-0,121	0,034	1	0,048	-0,241	0,000
	Pré - 24 semanas	-0,027	0,038	1	>0,999	-0,163	0,108
	Pré - 48 semanas	0,101	0,042	1	>0,999	-0,048	0,250
	Pré - Follow-up	0,111	0,045	1	>0,999	-0,052	0,274
	4 semanas - 12 semanas	0,056	0,027	1	>0,999	-0,043	0,154
	4 semanas - 24 semanas	0,149	0,033	1	0,001	0,029	0,269
	4 semanas - 48 semanas	0,278	0,038	1	<0,001	0,140	0,415
	4 semanas - Follow-up	0,288	0,043	1	<0,001	0,134	0,441
	12 semanas - 24 semanas	0,093	0,028	1	0,116	-0,006	0,193
	12 semanas - 48 semanas	0,222	0,034	1	<0,001	0,098	0,346
	12 semanas - Follow-up	0,232	0,040	1	<0,001	0,089	0,375
	24 semanas - 48 semanas	0,129	0,024	1	<0,001	0,041	0,216
	24 semanas - Follow-up	0,138	0,033	1	0,004	0,020	0,257
	48 semanas - Follow-up	0,010	0,026	1	>0,999	-0,083	0,103
	Pré	NR - RVNS	-0,064	0,072	1	>0,999	-0,321
NR - RVS		-0,021	0,062	1	>0,999	-0,245	0,204
4 semanas	RVNS - RVS	0,043	0,076	1	>0,999	-0,232	0,317
	NR - RVNS	-0,010	0,072	1	>0,999	-0,269	0,249
	NR - RVS	-0,077	0,063	1	>0,999	-0,303	0,148
12 semanas	RVNS - RVS	-0,067	0,077	1	>0,999	-0,345	0,210
	NR - RVNS	-0,049	0,071	1	>0,999	-0,304	0,207
	NR - RVS	-0,110	0,063	1	>0,999	-0,337	0,118
24 semanas	RVNS - RVS	-0,061	0,077	1	>0,999	-0,337	0,215
	NR - RVNS	-0,057	0,072	1	>0,999	-0,314	0,200
	NR - RVS	-0,069	0,062	1	>0,999	-0,294	0,155
48 semanas	RVNS - RVS	-0,013	0,077	1	>0,999	-0,288	0,263
	NR - RVNS	-0,106	0,073	1	>0,999	-0,368	0,156
	NR - RVS	-0,012	0,064	1	>0,999	-0,240	0,217
Follow-up	RVNS - RVS	0,094	0,077	1	>0,999	-0,183	0,371
	NR - RVNS	0,042	0,073	1	>0,999	-0,219	0,303
	NR - RVS	0,020	0,062	1	>0,999	-0,205	0,244
	RVNS - RVS	-0,022	0,078	1	>0,999	-0,304	0,259

Tabela 19. Resultado das comparações múltiplas de bilirrubina total entre grupos e aferições.

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	-0,191	0,026	1	<0,001	-0,284	-0,098
	Pré - 12 semanas	-0,034	0,034	1	>0,999	-0,157	0,089
	Pré - 24 semanas	0,049	0,040	1	>0,999	-0,094	0,192
	Pré - 48 semanas	0,143	0,047	1	0,398	-0,028	0,313
	Pré - Follow-up	0,102	0,047	1	>0,999	-0,068	0,272
	4 semanas - 12 semanas	0,157	0,026	1	<0,001	0,063	0,251
	4 semanas - 24 semanas	0,240	0,034	1	<0,001	0,116	0,364
	4 semanas - 48 semanas	0,334	0,043	1	<0,001	0,177	0,490
	4 semanas - Follow-up	0,293	0,044	1	<0,001	0,135	0,450
	12 semanas - 24 semanas	0,083	0,028	1	0,473	-0,018	0,184
	12 semanas - 48 semanas	0,177	0,039	1	0,001	0,036	0,318
	12 semanas - Follow-up	0,136	0,040	1	0,102	-0,008	0,279
	24 semanas - 48 semanas	0,094	0,032	1	0,465	-0,020	0,207
	24 semanas - Follow-up	0,053	0,034	1	>0,999	-0,068	0,174
48 semanas - Follow-up	-0,041	0,031	1	>0,999	-0,152	0,071	
RVNS	Pré - 4 semanas	-0,152	0,039	1	0,018	-0,293	-0,010
	Pré - 12 semanas	-0,076	0,049	1	>0,999	-0,253	0,100
	Pré - 24 semanas	0,026	0,059	1	>0,999	-0,184	0,236
	Pré - 48 semanas	0,050	0,065	1	>0,999	-0,185	0,285
	Pré - Follow-up	0,195	0,072	1	>0,999	-0,065	0,455
	4 semanas - 12 semanas	0,075	0,039	1	>0,999	-0,066	0,217
	4 semanas - 24 semanas	0,178	0,052	1	0,087	-0,008	0,363
	4 semanas - 48 semanas	0,202	0,060	1	0,123	-0,015	0,418
	4 semanas - Follow-up	0,347	0,068	1	<0,001	0,101	0,592
	12 semanas - 24 semanas	0,102	0,038	1	>0,999	-0,033	0,238
	12 semanas - 48 semanas	0,126	0,050	1	>0,999	-0,055	0,308
	12 semanas - Follow-up	0,271	0,061	1	0,001	0,054	0,489
	24 semanas - 48 semanas	0,024	0,040	1	>0,999	-0,121	0,169
	24 semanas - Follow-up	0,169	0,054	1	0,267	-0,025	0,363
48 semanas - Follow-up	0,145	0,045	1	0,207	-0,018	0,308	
RVS	Pré - 4 semanas	-0,254	0,031	1	<0,001	-0,365	-0,143
	Pré - 12 semanas	-0,166	0,043	1	0,016	-0,319	-0,013
	Pré - 24 semanas	-0,058	0,048	1	>0,999	-0,230	0,114
	Pré - 48 semanas	0,121	0,053	1	>0,999	-0,070	0,311
	Pré - Follow-up	0,197	0,058	1	0,100	-0,011	0,406
	4 semanas - 12 semanas	0,088	0,035	1	>0,999	-0,038	0,213
	4 semanas - 24 semanas	0,196	0,043	1	0,001	0,043	0,349
	4 semanas - 48 semanas	0,374	0,049	1	<0,001	0,199	0,550
	4 semanas - Follow-up	0,451	0,055	1	<0,001	0,255	0,647
	12 semanas - 24 semanas	0,108	0,035	1	0,344	-0,019	0,235
	12 semanas - 48 semanas	0,287	0,044	1	<0,001	0,129	0,444
	12 semanas - Follow-up	0,363	0,051	1	<0,001	0,180	0,547
	24 semanas - 48 semanas	0,179	0,031	1	<0,001	0,067	0,291
	24 semanas - Follow-up	0,256	0,043	1	<0,001	0,102	0,409
48 semanas - Follow-up	0,077	0,033	1	>0,999	-0,043	0,196	
Pré	NR - RVNS	-0,004	0,092	1	>0,999	-0,334	0,325
	NR - RVS	0,000	0,081	1	>0,999	-0,289	0,290
4 semanas	RVNS - RVS	0,005	0,098	1	>0,999	-0,348	0,357
	NR - RVNS	0,035	0,092	1	>0,999	-0,296	0,366
12 semanas	NR - RVS	-0,063	0,081	1	>0,999	-0,353	0,228
	RVNS - RVS	-0,097	0,099	1	>0,999	-0,453	0,258
24 semanas	NR - RVNS	-0,047	0,091	1	>0,999	-0,373	0,279
	NR - RVS	-0,132	0,082	1	>0,999	-0,425	0,162
48 semanas	RVNS - RVS	-0,085	0,098	1	>0,999	-0,438	0,268
	NR - RVNS	-0,028	0,091	1	>0,999	-0,356	0,301
Follow-up	NR - RVS	-0,107	0,081	1	>0,999	-0,397	0,184
	RVNS - RVS	-0,079	0,098	1	>0,999	-0,433	0,274
Follow-up	NR - RVNS	-0,097	0,093	1	>0,999	-0,431	0,237
	NR - RVS	-0,022	0,082	1	>0,999	-0,317	0,273
Follow-up	RVNS - RVS	0,075	0,098	1	>0,999	-0,279	0,429
	NR - RVNS	0,089	0,093	1	>0,999	-0,245	0,423
Follow-up	NR - RVS	0,096	0,081	1	>0,999	-0,194	0,385
	RVNS - RVS	0,007	0,100	1	>0,999	-0,353	0,367

As **Tabelas 18 e 19** mostram que o BI e BT apresentam comportamento semelhante ao BD, sendo que os pacientes RVS apresentam redução em momentos mais tardios do tratamento e pacientes NR apresentam diminuição já em 12 semanas.

Tabela 20. Resultado das comparações múltiplas de gama glutamil transferase entre grupos de resposta e momentos

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	22,90	6,17	1	0,031	0,74	45,06
	Pré - 12 semanas	48,80	8,07	1	<0,001	19,80	77,80
	Pré - 24 semanas	50,11	9,05	1	<0,001	17,59	82,63
	Pré - 48 semanas	53,86	10,59	1	<0,001	15,82	91,90
	Pré - Follow-up	18,56	10,15	1	>0,999	-17,92	55,04
	4 semanas - 12 semanas	25,90	6,51	1	0,010	2,53	49,28
	4 semanas - 24 semanas	27,21	8,16	1	0,130	-2,09	56,52
	4 semanas - 48 semanas	30,96	10,10	1	0,333	-5,33	67,26
	4 semanas - Follow-up	-4,34	9,82	1	>0,999	-39,61	30,93
	12 semanas - 24 semanas	1,31	6,76	1	>0,999	-22,99	25,61
	12 semanas - 48 semanas	5,06	9,36	1	>0,999	-28,58	38,70
	12 semanas - Follow-up	-30,24	9,30	1	0,174	-63,65	3,16
	24 semanas - 48 semanas	3,75	7,69	1	>0,999	-23,88	31,38
	24 semanas - Follow-up	-31,56	8,17	1	0,017	-60,89	-2,22
	48 semanas - Follow-up	-35,30	7,68	1	0,001	-62,90	-7,71
	RVNS	Pré - 4 semanas	1,13	9,82	1	>0,999	-34,17
Pré - 12 semanas		20,10	12,23	1	>0,999	-23,83	64,02
Pré - 24 semanas		29,69	14,18	1	>0,999	-21,26	80,65
Pré - 48 semanas		35,65	15,03	1	>0,999	-18,34	89,64
Pré - Follow-up		26,45	15,78	1	>0,999	-30,24	83,14
4 semanas - 12 semanas		18,97	10,17	1	>0,999	-17,56	55,50
4 semanas - 24 semanas		28,57	13,02	1	>0,999	-18,22	75,36
4 semanas - 48 semanas		34,52	14,37	1	>0,999	-17,10	86,15
4 semanas - Follow-up		25,32	15,43	1	>0,999	-30,13	80,78
12 semanas - 24 semanas		9,60	10,07	1	>0,999	-26,59	45,79
12 semanas - 48 semanas		15,55	12,60	1	>0,999	-29,71	60,81
12 semanas - Follow-up		6,35	14,17	1	>0,999	-44,57	57,27
24 semanas - 48 semanas		5,95	10,65	1	>0,999	-32,32	44,23
24 semanas - Follow-up		-3,25	13,05	1	>0,999	-50,13	43,64
48 semanas - Follow-up		-9,20	10,39	1	>0,999	-46,55	28,15
RVS		Pré - 4 semanas	3,04	8,22	1	>0,999	-26,51
	Pré - 12 semanas	9,07	10,66	1	>0,999	-29,24	47,38
	Pré - 24 semanas	-2,49	11,78	1	>0,999	-44,83	39,85
	Pré - 48 semanas	4,04	12,37	1	>0,999	-40,40	48,49
	Pré - Follow-up	24,68	12,94	1	>0,999	-21,82	71,19
	4 semanas - 12 semanas	6,03	8,79	1	>0,999	-25,55	37,61
	4 semanas - 24 semanas	-5,53	10,78	1	>0,999	-44,27	33,22
	4 semanas - 48 semanas	1,01	11,74	1	>0,999	-41,18	43,19
	4 semanas - Follow-up	21,64	12,57	1	>0,999	-23,54	66,82
	12 semanas - 24 semanas	-11,56	9,06	1	>0,999	-44,12	21,00
	12 semanas - 48 semanas	-5,03	10,84	1	>0,999	-43,99	33,94
	12 semanas - Follow-up	15,61	12,09	1	>0,999	-27,83	59,06
	24 semanas - 48 semanas	6,53	8,33	1	>0,999	-23,38	36,45
	24 semanas - Follow-up	27,17	10,72	1	>0,999	-11,33	65,67
	48 semanas - Follow-up	20,64	8,40	1	>0,999	-9,53	50,80
	Pré	NR - RVNS	38,66	14,69	1	>0,999	-14,12
NR - RVS		57,65	13,00	1	0,001	10,95	104,36
RVNS - RVS		18,99	16,00	1	>0,999	-38,51	76,49
4 semanas	NR - RVNS	16,89	15,18	1	>0,999	-37,66	71,43
	NR - RVS	37,79	13,32	1	0,697	-10,08	85,66
	RVNS - RVS	20,91	16,52	1	>0,999	-38,46	80,28
12 semanas	NR - RVNS	9,96	15,04	1	>0,999	-44,07	63,98
	RVNS - RVS	17,92	13,72	1	>0,999	-31,37	67,21
24 semanas	RVNS - RVS	7,97	16,52	1	>0,999	-51,39	67,32
	NR - RVNS	18,24	15,38	1	>0,999	-37,04	73,52
	NR - RVS	5,05	13,58	1	>0,999	-43,75	53,85
48 semanas	RVNS - RVS	-13,19	16,79	1	>0,999	-73,52	47,14
	NR - RVNS	20,45	15,76	1	>0,999	-36,18	77,07
	NR - RVS	7,84	13,94	1	>0,999	-42,24	57,91
Follow-up	RVNS - RVS	-12,61	16,42	1	>0,999	-71,62	46,40
	NR - RVNS	46,55	15,17	1	0,330	-7,97	101,07
	NR - RVS	63,78	13,18	1	<0,001	16,42	111,13
	RVNS - RVS	17,23	16,40	1	>0,999	-41,68	76,14

Pela **Tabela 20**, tem-se que a GGT é o único parâmetro hepático que apresenta diferenças médias estatisticamente significativas entre os grupos de resposta em momentos mais precoces do tratamento, NR maior que RVS no pré-tratamento ($p = 0,001$), sendo que NR é o único que apresenta alguma alteração ao longo do seguimento ($p < 0,05$).

Tabela 21. Resultado das comparações múltiplas de hemoglobina entre as aferições

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Pré - 4 semanas	1,88	0,12	1	<0,001	1,54	2,23
Pré - 12 semanas	3,00	0,15	1	<0,001	2,57	3,43
Pré - 24 semanas	3,07	0,16	1	<0,001	2,59	3,55
Pré - 48 semanas	3,18	0,17	1	<0,001	2,67	3,69
Pré - Follow-up	0,33	0,18	1	0,928	-0,19	0,84
4 semanas - 12 semanas	1,12	0,12	1	<0,001	0,77	1,47
4 semanas - 24 semanas	1,19	0,15	1	<0,001	0,75	1,63
4 semanas - 48 semanas	1,30	0,17	1	<0,001	0,81	1,79
4 semanas - Follow-up	-1,55	0,17	1	<0,001	-2,06	-1,05
12 semanas - 24 semanas	0,07	0,12	1	>0,999	-0,29	0,43
12 semanas - 48 semanas	0,18	0,15	1	>0,999	-0,27	0,63
12 semanas - Follow-up	-2,67	0,16	1	<0,001	-3,15	-2,19
24 semanas - 48 semanas	0,11	0,13	1	>0,999	-0,26	0,48
24 semanas - Follow-up	-2,74	0,15	1	<0,001	-3,19	-2,30
48 semanas - Follow-up	-2,85	0,13	1	<0,001	-3,22	-2,48

Tabela 22. Resultado das comparações múltiplas de hematócrito entre as aferições

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Pré - 4 semanas	4,92	0,31	1	<0,001	4,00	5,84
Pré - 12 semanas	7,06	0,39	1	<0,001	5,91	8,20
Pré - 24 semanas	7,51	0,43	1	<0,001	6,24	8,79
Pré - 48 semanas	7,30	0,46	1	<0,001	5,94	8,66
Pré - Follow-up	0,80	0,47	1	>0,999	-0,56	2,17
4 semanas - 12 semanas	2,14	0,32	1	<0,001	1,20	3,08
4 semanas - 24 semanas	2,59	0,40	1	<0,001	1,42	3,77
4 semanas - 48 semanas	2,38	0,45	1	<0,001	1,07	3,69
4 semanas - Follow-up	-4,12	0,46	1	<0,001	-5,46	-2,78
12 semanas - 24 semanas	0,46	0,32	1	>0,999	-0,50	1,41
12 semanas - 48 semanas	0,25	0,41	1	>0,999	-0,96	1,45
12 semanas - Follow-up	-6,25	0,44	1	<0,001	-7,53	-4,98
24 semanas - 48 semanas	-0,21	0,34	1	>0,999	-1,21	0,79
24 semanas - Follow-up	-6,71	0,40	1	<0,001	-7,89	-5,53
48 semanas - Follow-up	-6,50	0,34	1	<0,001	-7,49	-5,51

Tabela 23. Resultado das comparações múltiplas da contagem de leucócitos entre as aferições

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Pré - 4 semanas	2,32	0,16	1	<0,001	1,87	2,78
Pré - 12 semanas	2,68	0,18	1	<0,001	2,14	3,22
Pré - 24 semanas	2,77	0,20	1	<0,001	2,19	3,35
Pré - 48 semanas	2,92	0,21	1	<0,001	2,32	3,53
Pré - Follow-up	0,50	0,20	1	0,193	-0,09	1,10
4 semanas - 12 semanas	0,36	0,16	1	0,346	-0,10	0,82
4 semanas - 24 semanas	0,45	0,19	1	0,269	-0,11	1,00
4 semanas - 48 semanas	0,60	0,20	1	0,049	0,00	1,20
4 semanas - Follow-up	-1,82	0,20	1	<0,001	-2,41	-1,22
12 semanas - 24 semanas	0,09	0,16	1	>0,999	-0,38	0,56
12 semanas - 48 semanas	0,24	0,19	1	>0,999	-0,33	0,81
12 semanas - Follow-up	-2,18	0,20	1	<0,001	-2,76	-1,60
24 semanas - 48 semanas	0,15	0,17	1	>0,999	-0,34	0,65
24 semanas - Follow-up	-2,27	0,19	1	<0,001	-2,82	-1,71
48 semanas - Follow-up	-2,42	0,17	1	<0,001	-2,91	-1,93

Tabela 24. Resultado das comparações múltiplas da contagem de neutrófilos entre as aferições

Comparação	Diferença média	Erro padrão	gl	P	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Pré - 4 semanas	1,45	0,12	1	<0,001	1,10	1,80
Pré - 12 semanas	1,51	0,14	1	<0,001	1,11	1,91
Pré - 24 semanas	1,35	0,14	1	<0,001	0,92	1,77
Pré - 48 semanas	1,41	0,15	1	<0,001	0,97	1,85
Pré - Follow-up	0,15	0,14	1	>0,999	-0,28	0,57
4 semanas - 12 semanas	0,06	0,12	1	>0,999	-0,30	0,42
4 semanas - 24 semanas	-0,10	0,14	1	>0,999	-0,52	0,31
4 semanas - 48 semanas	-0,04	0,15	1	>0,999	-0,47	0,40
4 semanas - Follow-up	-1,30	0,15	1	<0,001	-1,73	-0,87
12 semanas - 24 semanas	-0,16	0,12	1	>0,999	-0,53	0,20
12 semanas - 48 semanas	-0,09	0,14	1	>0,999	-0,52	0,33
12 semanas - Follow-up	-1,36	0,14	1	<0,001	-1,78	-0,93
24 semanas - 48 semanas	0,07	0,13	1	>0,999	-0,31	0,45
24 semanas - Follow-up	-1,20	0,14	1	<0,001	-1,61	-0,78
48 semanas - Follow-up	-1,26	0,13	1	<0,001	-1,64	-0,89

As **Tabelas de 21 a 24** mostram que os parâmetros hematológicos dos pacientes diminuí em média estatisticamente do pré e de 4 semanas para os momentos seguintes e voltam a aumentar no follow-up independentemente do grupo de resposta ($p < 0,05$).

Tabela 25. Resultado das comparações múltiplas da contagem de plaquetas entre os grupos de resposta e aferições

Resposta/ Aferição	Comparação	Diferença média	Erro padrão	GI	p	IC (95%)	
						Inferior	Superior
NR	Pré - 4 semanas	19,84	4,46	1	0,001	3,82	35,87
	Pré - 12 semanas	34,07	5,83	1	<0,001	13,11	55,02
	Pré - 24 semanas	31,96	6,92	1	0,001	7,11	56,81
	Pré - 48 semanas	36,50	8,11	1	0,001	7,36	65,64
	Pré - Follow-up	4,04	8,12	1	>0,999	-25,15	33,23
	4 semanas - 12 semanas	14,22	4,36	1	0,168	-1,43	29,87
	4 semanas - 24 semanas	12,11	5,94	1	>0,999	-9,24	33,47
	4 semanas - 48 semanas	16,66	7,45	1	>0,999	-10,10	43,42
	4 semanas - Follow-up	-15,80	7,57	1	>0,999	-43,00	11,40
	12 semanas - 24 semanas	-2,11	4,54	1	>0,999	-18,43	14,21
	12 semanas - 48 semanas	2,44	6,58	1	>0,999	-21,21	26,09
	12 semanas - Follow-up	-30,02	6,86	1	0,002	-54,68	-5,37
	24 semanas - 48 semanas	4,55	5,33	1	>0,999	-14,62	23,71
	24 semanas - Follow-up	-27,92	6,00	1	<0,001	-49,46	-6,37
48 semanas - Follow-up	-32,46	5,42	1	<0,001	-51,92	-13,00	
RVNS	Pré - 4 semanas	35,24	6,54	1	<0,001	11,76	58,73
	Pré - 12 semanas	46,00	8,71	1	<0,001	14,71	77,29
	Pré - 24 semanas	52,24	10,43	1	<0,001	14,76	89,71
	Pré - 48 semanas	44,54	11,30	1	0,012	3,93	85,15
	Pré - Follow-up	-2,19	12,24	1	>0,999	-46,16	41,78
	4 semanas - 12 semanas	10,75	6,69	1	>0,999	-13,27	34,78
	4 semanas - 24 semanas	16,99	9,11	1	>0,999	-15,75	49,73
	4 semanas - 48 semanas	9,29	10,32	1	>0,999	-27,78	46,37
	4 semanas - Follow-up	-37,44	11,50	1	0,174	-78,77	3,90
	12 semanas - 24 semanas	6,24	6,85	1	>0,999	-18,37	30,84
	12 semanas - 48 semanas	-1,46	8,82	1	>0,999	-33,16	30,24
	12 semanas - Follow-up	-48,19	10,40	1	0,001	-85,57	-10,82
	24 semanas - 48 semanas	-7,70	7,03	1	>0,999	-32,94	17,55
	24 semanas - Follow-up	-54,43	9,24	1	<0,001	-87,61	-21,24
48 semanas - Follow-up	-46,73	6,72	1	<0,001	-70,86	-22,60	
RVS	Pré - 4 semanas	39,72	5,67	1	<0,001	19,35	60,08
	Pré - 12 semanas	47,97	7,47	1	<0,001	21,12	74,81
	Pré - 24 semanas	46,65	8,47	1	<0,001	16,20	77,09
	Pré - 48 semanas	30,37	9,47	1	0,205	-3,65	64,40
	Pré - Follow-up	-2,46	10,13	1	>0,999	-38,87	33,95
	4 semanas - 12 semanas	8,25	5,72	1	>0,999	-12,31	28,81
	4 semanas - 24 semanas	6,93	7,29	1	>0,999	-19,27	33,13
	4 semanas - 48 semanas	-9,34	8,60	1	>0,999	-40,26	21,57
	4 semanas - Follow-up	-42,18	9,46	1	0,001	-76,18	-8,18
	12 semanas - 24 semanas	-1,32	5,56	1	>0,999	-21,29	18,65
	12 semanas - 48 semanas	-17,59	7,49	1	>0,999	-44,52	9,33
	12 semanas - Follow-up	-50,43	8,66	1	<0,001	-81,54	-19,32
	24 semanas - 48 semanas	-16,27	5,56	1	0,524	-36,25	3,70
	24 semanas - Follow-up	-49,11	7,36	1	<0,001	-75,55	-22,67
48 semanas - Follow-up	-32,84	5,82	1	<0,001	-53,76	-11,92	
Pré	NR - RVNS	7,76	13,13	1	>0,999	-39,41	54,92
	NR - RVS	-0,48	11,64	1	>0,999	-42,31	41,34
4 semanas	RVNS - RVS	-8,24	14,20	1	>0,999	-59,25	42,77
	NR - RVNS	23,16	13,17	1	>0,999	-24,16	70,47
	NR - RVS	19,39	11,60	1	>0,999	-22,30	61,08
12 semanas	RVNS - RVS	-3,77	14,23	1	>0,999	-54,89	47,35
	NR - RVNS	19,69	13,10	1	>0,999	-27,39	66,77
	NR - RVS	13,42	11,61	1	>0,999	-28,31	55,15
24 semanas	RVNS - RVS	-6,27	14,19	1	>0,999	-57,26	44,72
	NR - RVNS	28,03	13,38	1	>0,999	-20,06	76,12
	NR - RVS	14,20	11,57	1	>0,999	-27,38	55,79
48 semanas	RVNS - RVS	-13,83	14,29	1	>0,999	-65,19	37,53
	NR - RVNS	15,79	13,54	1	>0,999	-32,87	64,45
	NR - RVS	-6,61	12,03	1	>0,999	-49,82	36,60
Follow-up	RVNS - RVS	-22,40	14,26	1	>0,999	-73,65	28,84
	NR - RVNS	1,52	13,36	1	>0,999	-46,47	49,51
	NR - RVS	-6,99	11,70	1	>0,999	-49,03	35,06
	RVNS - RVS	-8,51	14,39	1	>0,999	-60,20	43,18

Pela **Tabela 25**, tem-se que as plaquetas apresentam comportamento similar dos grupos de resposta ao longo do seguimento, sendo que os pacientes diminuíram do pré para os demais momentos ($p < 0,05$) e aumentaram novamente no follow-up ($p < 0,05$).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe H, Ochi H, Maekawa T, Hayes CN, Tsuge M, Miki D, Mitsui F, Hiraga N, Imamura M, Takahashi S, Ohishi W, Arihiro K, Kubo M, Nakamura Y, Chayama K. Common variation of IL28B affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. **J Hepatol**. 2010 Sep; 53(3): 439-43.

Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. **J Gastroenterol**. 2010 Jul 16.

Almeida PRL, Mattos AA, Tovo CV. Sustained virological response according to the type of early virological response in HCV and HCV/HIV. **Ann of Hepatol**. 2010; 9(2):150-5.

Ank N, West H, Paludan SR. IFN-lambda: novel antiviral cytokines. **J Interferon Citokyne Res**. 2006 Jun; 26(6):373-9.

Araújo ESA, Courtouké C, Barone AA. Hepatitis C treatment: shorter and better?. **Braz J Infect Dis**. 2007a; 11(1): 118-124.

Araújo ESA, Melo CE, Martins LP, Menegat FD, Almeida CS, Dantas BP, Tengan FM, Barone AA. Brazilian profile of IL-28B single nucleotide polymorphism (SNP): a retrospective analysis and possible consequences for interferon-alfa based therapies. **Hepatology**. 2010; 52(4): 779A.

Araújo ESA, Tengan FM, Ranzani O, Pinaffi J, Gonçalves F, Rangel L, Stape N, Cavalheiro NP, Carrilho FJ, Barone AA. Pegylated interferon for chronic HCV infection: is it good for real life?. **14th International Symposium on Viral Hepatitis C Virus & Related Viruses**. 2007b, Glasgow. Programme and Abstract Book, 2007. p232-232.

Björnsson E, Angulo P. Hepatitis C and steatosis. **Arch Med Res**. 2007 Aug; 38(6):621-7.

Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S. A new antigen in leukemia sera. **JAMA**. 1965; 191:541-6.

Bochud PY, Bilbert S, Negro F, Haagmans B, Soulier A, Ferrari C, Missale G, Zeuzem S, Pawlotsky JM, Schalm S, Hellstrand K, Neumann AU, Lagging M. IL28B polymorphisms predict reduction of HCV RNA from the first day of therapy in chronic hepatitis C. **J Hepatol**. 2011 Nov; 55(5):980-8.

Bonjardim CA. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses – and viruses counteract IFN action. **Microbes Infect**. 2005 Mar;7(3):569-78.

Booth DR, Ahlenstiel G, George J. Pharmacogenomics of hepatitis C virus infections: personalizing therapy. **Genome Med.** 2012; 4(12):99.

Brandão AB, Fuchs SC, Silva MA, Emer LF. Diagnosis of hepatitis C in clinical practice: review of literature. **Rev Pan Salud Publica.** 2001 Mar; 9(3):161-8.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. **Int J Med Sci.** 2006;3(2): 29-34.

Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** 2005; 38(1): 41-49.

Cannon NA, Donlin MJ, Fan X, Aurora R, Tavis JE, Virahelp-C Study Group. Hepatitis C virus diversity and evolution in the full open-reading frame during antiviral therapy. **Plos One.** 2008. May 7;3(5):e2123.

Cavalheiro NP, Melo CE, Tengan FM, Araujo ESA, Barone AA. Prevalence of the HCV genotypes in two periods 1990-1997 and 1999-2007 in a cohort of patients in Sao Paulo, Brazil. **15th International Symposium on Hepatitis C Virus & Related Viruses**; 2008; Texas. Conference Program and Abstract Book, 2008. p. 214.

Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. **Hepatology.** 1999 Sep;30(3):595-601.

Chen CH, Yu ML. Evolution of interferon-based therapy for chronic hepatitis C. **Hepat Res Treat.** 2010; 2010.

Chevaliez S, Pawlotsky JM. Virology of hepatitis C virus infection. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** 2012 Aug; 26(4): 381-9.

Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A non-B hepatitis genome. **Science.** 1989; 224,359-62.

Chueca Porcuna N, Alvarez Estévez M, Parra Ruiz J, Hernández Quero J, García García F. [Update on hepatitis C therapy. New drugs, treatment response monitoring and emergence of resistance]. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2013 Feb;31 Suppl 1:40-7.

Chung HJ, Lee JW, Kim YS, Lee JI. Prediction of sustained virologic response based on week 4 and week 12 response in hepatitis C virus genotype 1 patients treated with peginterferon and ribavirin: assessment in a favorable IL28B allele-prevalent area. **Intervirol.** 2013;56(3):178-83.

Cocquerel L, Meunier JC, Op de Beeck A, Bonte D, Wychowski C, Dubuisson J. Coexpression of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2 in cis improves

the stability of membrane insertion of E2. **J Gen Virol.** 2001 Jul;82(Pt7):1629-35.

Czepiel J, Biesiada G, Mach T. Viral hepatitis C. **Pol Arch Med Wewn.** 2008 Dec;118(12):734-40.

Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, Clinckspoor F, Leroux-Roels G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus Versant HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. **J Clin Microbiol.** 2005;43(6):2590-7.

Domagalski K, Pawlowska M, Tretyn A, Halota W, Pilarczyk M, Smukalska E, Linkowska K, Grzybowski T. Impact of IL-28B polymorphisms on pegylated interferon plus ribavirin treatment response in children and adolescents infected with HCV genotypes 1 and 4. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2013 Jan 13.

Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cell Microbiol.** 2008 Apr; 10(4):821-7.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. **Science.** 1973 Dec 7; 182(116):1026-8.

Feld JJ, Modi AA, El-Diwany R, Rotman Y, Thomas E, Ahlenstiel G, Titerence R, Koh C, Cherepanov V, Heller T, Ghany MG, Park Y, Hoofnagle JH, Liang J. S-adenosyl methionine improves early viral responses and interferon-stimulated gene induction in hepatitis C nonresponders. **Gastroenterol.** 2010. Sep 17.

Fernández-Rodríguez A, Rallón N, Berenguer J, Jiménez-Sousa MA, Cosín J, Guzmán-Fulgencio M, Restrepo C, Lopez JC, García-Álvarez M, Miralles P, Soriano V, Benito JM, Resino S. Analysis of IL28B alleles with virological responses patterns and plasma cytokine levels in HIV/HCV-coinfected patients. **AIDS.** 2013 Jan 14;27(2):163-73.

Ferreira MS. Treatment of chronic hepatitis C in treatment-naïve patients. **BJID.** 2007; 11(5):45-49.

Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. **Sem Liver Dis.** 2004;24 Suppl 2:9-18.

Gallo M, Bottomley MJ, Pennestri M, Eliseo T, Paci M, Koch U, Bazzo R, Summa V, Carfi A, Cicero DO. Structural characterization of the Hepatitis C Virus NS3 protease from genotype 3a: The basis of the genotype 1b vs. 3a inhibitor potency shift. **Virology.** 2010 Sep 30;405(2):424-438.

García-Samaniego J, Romero M, Granados R, Aléman R, Jorge Juan M, Suárez D, Pérez, Castellano G, González-Portela C. Factors associated with

early virological response to peginterferon- α -2a/ribavirin in chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol**. 2013 Mar 28;19(12):1943-52.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**. 2009 Sep 17;461(7262):399-401.

Georgel P, Schuster C, Zeisel MB, Stoll-Keller F, Berg T, Bahram S, Baumert TF. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. **Trends Mol Med**. 2010 Jun;16(6):277-86.

Grandi T, Silva CM, Amaral KM, Picon PD, Costi C, Fré NN, Fiegenbaum M, Niel C, Rossetti ML. Response to treatment in Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated with a single-nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013 Feb; 108(1):48-53.

Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, Matthews GV, Suppiah V, Applegate T, Yeung B, Phillipa M, Rawlinson W, Lloyd AR, Booth D, Kaldor JM, George J, Dore GJ. Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 2010 Oct;52(4): 1216-24.

Hayes CN, Imamura M, Aikata H, Chayama K. Genetics of IL28B and HCV – response to infection and treatment. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2012 May 29;9(7):406-17.

Hosmer DW, Lemeshow S. **Applied logistic regression**. 2a. ed. New York: Wiley: 2000. 320p.

Indolfi G, Nesi A, Resti M. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus. **J Med Virol**. 2013 Apr; 85(4):608-14.

International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. **Nature**. 2005 Oct 27;437(7063):1299-320.

Invitrogen. [Internet]. 2011. [citado Nov 2012]. Disponível em: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/brochures/cms_040597.pdf.

Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. **Clin Immunol**. 2008 Aug;128(2):133-47.

Johnston SL. Innate immunity in the pathogenesis of virus-induced asthma exacerbations. **Proc Am Thorac Soc**. 2007 Jul;4(3):267-70.

Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern Med**. 2006;45(4):183-91.

Kawaguchi Y, Mizuta T. Interaction between hepatitis C virus and metabolic factors. **World J Gastroenterol**. 2014 Mar 21;20(11):2888-901.

Kirkwood BR, Sterne JAC. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts: Blackwell Science; 2006.

Knapp S, Warshow U, Ho KM, Little AM, Fowell A, Alexander G, Thursz M, Cramp M, Khakoo SI. A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. **Gastroenterol**. 2011 Jul;141(1):320-5.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. Interferon-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nat Immunol**. 2003;4(1):69-77.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med**. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.

Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. **Clin Microbiol Infect**. 2011 Feb;17(2):107-15.

Lazarevic I, Cupic M, Karalic D, Delic D, Svrtlih M, Simonovic J, Svorcan P, Milic N, Jovanovic T. The influence of single and combined IL28B polymorphisms on response to treatment of chronic hepatitis C. **J Clin Virol**. 2013 Sep;58(1):254-7.

Lin K. Development of novel antiviral therapies for hepatitis C virus. **Viral Sin**. 2010; 25(4):246-66.

Lindh M, Lagging M, Arnholm B, Eilard A, Nilsson S, Norkrans G, Söderholm J, Wahlberg T, Wejstal R, Westin J, Hellstrand K. **J Viral Hepat**. 2011 Jul18(7):325-31.

Liu YL, Du XF, Chen XY, Ma LN, Guo DD, Lu JF, Cao ZH, Zhang YH. Bone marrow suppression or active proliferation? An analysis of neutropenia after pegylated interferon treatment of patients with chronic hepatitis C. **Scand J Infect Dis**. 2013 Dec;45(12):939-43.

Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. 2012 Aug;26(4):401-12.

Maekawa S, Enomoto N. Viral factors influencing the response to the combination therapy of peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C. **J Gastroenterol**. 2009;44(10):1009-15. Review.

Mamotte CD. Genotyping of single nucleotide substitutions. **Clin Biochem Rev**. 2006 Feb;27(1):63-75.

Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, Shianna KV, Mottola L, Petruzzellis D, Bacca D, Carretta V, Minerva N, Goldstein DB, McHutchison JG. Interleukin-28B polymorphism determines treatment response of patients with hepatitis C genotypes 2 or 3 who do not achieve a rapid virologic response. **Gastroenterol.** 2010 Jun 2.

Manolio TA, Collins FS. The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. **Annu Rev Med.** 2009;60:443-56.

McCullagh P, Nelder JA. **Generalized linear models.** 2nd ed. Chapman and Hall: New York, USA; 1989. p.511.

McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, Nyberg LM, Lee WM, Ghalib RH, Schiff ER, Galati JS, Bacon BR, Davis MN, Mukhopadhyay P, Koury K, Noviello S, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Sulkowski MS; IDEAL Study Team. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. **N Engl J Med.** 2009 Aug 6;361(6):580-93.

Mikawa AY, Santos AS, Kenfe FR, da Silva FH, da Costa PI. Development of a rapid one-step immunochromatographic assay for HCV core antigen detection. **J Virol Methods.** 2009 Jun; 158(1-2):160-4.

Ministério da Saúde. [Internet]. 2009. [citado Nov 2010]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2009/d0114.def>.

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Nuñez-Roldán A, González-Escribano MF. Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. **Hepatology.** 2010 Jul;52(1):33-7.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. **Nat Rev Microbiol.** 2007 Jun; 5(6):453-63.

Naggie S. Management of hepatitis C virus infection: the basics. **Top Antvir Med.** 2012 Dec; 20(5):154-61.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. **Applied linear statistical models.** 4 ed. Illinois: Richard D. Irwing; 1996. p.1408.

O'Leary JC, Davis GL. Hepatitis C virus replication and potential targets for direct-acting agents. **Therap Adv Gastroenterol.** 2010 Jan; 3(1):43-53.

Paraboni ML, Sbeghen MD, Wolff FH, Moreira LB. Risk factors for infection with different hepatitis C virus genotypes in southern Brazil. **Scientific World Journal.** 2012;2012.

Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. **Gastroenterol.** 2002;122(6):1554-68.

- Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol.** 2004; 12(2): 96-102.
- Pawlotsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnosis assays. **Clin Liver Dis.** 2003;127-137.
- Perone C, Castillo DM, Pereira GL, Carvalho NO; Januário JN; Teixeira R. Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2008; 41(3): 238-242.
- Pineda JA, Caruz A, Rivero A, Neukam K, Salas I, Camacho A, Palomares JC, Mira JA, Martínez A, Roldán C, de la Torre C, Macías J. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin by IL28B gene variation in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. **Clin Infect Dis.** 2010 Oct 1;51(7): 788-95.
- Pol S, Aerssens J, Zeuzem S, Andreone P, Lawitz EJ, Robert S, Younossi Z, Foster GR, Focaccia R, Horban A, Pockros PJ, Van Heeswijk RP, De Meyer S, Luo D, Botfield M, Beumont M, Picchio G. Limited impact of IL28B genotype on response rates in telaprevir-treated patients with prior treatment failure. **J Hepatol.** 2013 Jan 12.
- Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. **J Hepatol.** 2006; 45:607-16.
- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções (Genótipo 1 do HCV e Fibrose Avançada) – Suplemento 2. 2013 [citado Mar 2014]. Disponível em: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2011/49960/web_suplemento_2_protocolo_hepatite_c_pdf_98045.
- Ramadori G, Meier V. Hepatitis C virus infection: 10 years after the discovery of the virus. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** 2001 May;13(5):465-71. Review.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study. Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterol.** 2010 Apr;138(4):1338-45, 1345.e1-7.
- Rocca LG, Yawn BP, Wollan P, Kim WR. Management of patients with hepatitis C in a community population: diagnosis, discussions, and decisions to treat. **Ann Fam Med.** 2004 Mar-Apr;2(2):116-24.
- Sato M, Kondo M, Tateishi R, Fujiwara N, Kato N, Yoshida H, Taguri M, Koike K. Impact of IL28B genetic variation on HCV-induced liver fibrosis, inflammation, and steatosis: a meta-analysis. **Plos One.** 2014 Mar 17;9(3):e91822. doi:10.1371/journal.pone.0091822.

Saúde Brasil 2007. 2008 [citado Nov 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/coletiva_saude_061008.pdf.

Seef LB. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). **Liver Int.** 2009 Jan; 29 Suppl 1:89-99.

Sherman KE, Flamm SL, Afdhal NH, et al. Telaprevir in combination with peginterferon alfa2a and ribavirin for 24 or 48 weeks in treatment-naïve genotype 1 HCV patients who achieved an extended rapid viral response: final results of phase 3 ILLUMINATE Study. **Program and abstracts of the 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases**; 2010, Boston, Massachusetts.

Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ida T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, Kumada T, Sata M. Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study. **J Gastroenterol.** 2013 Nov 28.

Strauss E. Hepatitis C. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2001; 34(1):69-82.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendini M, Spengler U, Dore GJ, Powel E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nat Gen.** 2009 Oct;41(10):1100-4.

Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C virus life cycle. **Adv Drug Deliv Rev.** 2007 Oct 10;59(12):1200-12.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nischiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami N. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Gen.** 2009 Oct;41(10):1105-9.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Tokunaga K, Mizokami M. lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. **Hepatol Res.** 2010 May;40(5):449-60.

Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clin Sci (Lond).** 2009 Jun 15;117(2):49-65.

Tellighuisen TL, Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. **Curr Opin Microbiol.** 2002 Aug;5(4): 419-27.

Teoh NC, Farrel GC, Chan HL-Y. Individualization of therapy for chronic hepatitis C. **J Gastroenterol Hepatol**. 2010 Jul;25(7):1206-16.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**. 2009 Oct 8;461(7265):798-801.

Tsubota A, Fujise K, Namiki Y, Tada N. Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. **World Journal Gastroenterol**. 2011 Jan 28;17(4):419-32.

Weiser BM, Tellinghuisen TL. Structural biology of the hepatitis C virus proteins. **Drug Discovery Today: Technologies**. 2012;9(3):195-204.

Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. **Clin Microbiol Rev**. 2007;20(1):23-38.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **Lancet Infect Dis**. 2004 Jun;4(6):337-48.

Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, Li XG, Li SC. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin. **J Gastroenterol Hepatol**. 2007 Jun;22(6):832-6.

Zeng QL, Zhang JY, Zhang Z, Wang LF, Wang FS. Sofosbuvir and ABT-450: terminator of hepatitis C virus? **World J Gastroenterol**. 2013 Jun 7;19(21):3199-206.

Zhang Z, Harris D, Pandey VN. The fuse binding protein is a cellular factor required for efficient replication of hepatitis C virus. **J Virol**. 2008; Jun; 82(12):5761-73.