Camila da Silva Ferreira

**Frequência do polimorfismo rs12979860, no gene da IL28B, em
pacientes portadores de hepatite C crônica e em controles
sadios: nova metodologia de baixo custo e menor tempo para
genotipagem**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências
Programa de Ciências em Gastroenterologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suzane Kioko Ono

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Camila da Silva

Frequência do polimorfismo rs12979860, no gene da IL28B, em pacientes portadores de hepatite C crônica e em controles sadios : nova metodologia de baixo custo e menor tempo para genotipagem / Camila da Silva Ferreira. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientadora: Suzane Kioko Ono.

Descritores: 1.Interleucina 28B 2.Hepatite C crônica/genética 3.Técnicas de genotipagem 4.Análise custo-benefício 5.Hepacivirus 6.Polimorfismo de nucleotídeo único 7.Interferons

USP/FM/DBD-076/13

DEDICATÓRIA

***Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Rosimeire,
pelo incondicional amor e incentivo.***

***Ao amado Jaime Bezerra Junior, pelo amor, compreensão,
paciência e conselhos, sempre fundamentais***

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda graça dispensada sobre minha vida, por sua infinita misericórdia e amor.

Aos meus Pais, Paulo Ferreira e Rosimeire da S. Melo Ferreira, por todo carinho e dedicação, por estarem presentes em cada momento, por me ofertar suas companhias, conselhos, e colos e principalmente pelo apoio e incentivo à minha educação (sabemos que não foi fácil).

As minhas irmãs Sara e Jacqueline, por toda confiança e carinho.

Ao amado noivo Jaime Bezerra Junior, por todo amor, paciência e dedicação ao longo desse trabalho.

À minha Avó, Isaltina Alves da Silva, por seu exemplo de fibra, coragem e determinação.

Aos meus tios e primos Verônica de Melo Oliveira, Debora da Silva Melo e Carlos Roberto de Oliveira, Virginia, Livia, Caio, Cassio, Gabriella, Daniella e Isabella por todo incentivo apoio e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Suzane Kioko Ono, por sua orientação, confiança, paciência e dedicação. Por tudo isso foi responsável pelo meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, pelo incentivo à pesquisa científica, um exemplo de liderança.

Aos Doutores Prof. Luis Caetano da Silva (in memorium), Márcia Kubrusly, Maria Pessoa e Wanda Regina Calli, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Á Dr^a Isabel Maria V. Guedes de Carvalho-Mello, pelo apoio, apredizado e contribuições.

Aos colegas do grupo do fígado com os quais convivi durante o tempo de estágio e mestrado, muitos tomaram outros rumos, mas com certeza fizeram parte deste trabalho e do meu aprendizado: Ana Maria Sousa Silva, Carolina Aguilar, Denise Rodrigues Ferreira, Dr^a Erika Fujihira, Fernanda Pereira de Campos, Helena Scavone Paschoale, Jeronimo de Alencar Nogueira, Marianges Z. Gouvêa, Maria Luiza da Nova, Rodrigo Martins de Abreu, Sueli Nakatami, pela ajuda concedida.

Aos amigos do laboratório, Paulo D. Nasser, Cinthya Cirqueira, Marcelo Moreira Tavares de Souza e Rodrigo A. Ressio, Mariana A. Nabeshima, pela amizade, companheirismo, tolerância, dedicação, ajuda e aprendizado ao longo de todos esses anos. Foram parte fundamental dessa jornada que sem eles não seria concluída.

A Dr^a. Aline Siqueira Ferreira não só por realizar as análises estatísticas, mas pelo apoio, ensinamentos e contribuições para este trabalho.

Aos colaboradores, funcionários e alunos do departamento de Gastroenterologia, pela convivência, troca de experiências e apoio diário, Sobretudo à Claudia de Arruda, Fátima Gomes, Nalva e Renato Madrid.

Ao Grupo LIM-14 pelo incentivo, entusiasmo e companheirismo no dia a dia como também nas reuniões científicas, nas pessoas do Prof. Dr. Venâncio Avancini Ferreira Alves, Dr^a Alda Wakamatsu, Melissa Rats, Aline Ramos e Cinthya Cirqueira.

Ao serviço de sequenciamento multiusuário do LEMB e do LIM-56, Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Prof. Dr. Alberto Duarte, os alunos, Carla Braconi e Danielle Silva, pela ajuda nos sequenciamentos.

Aos amigos do Instituto de Medicina Tropical, Dr^a Cristina Oliveira, Dr^a Camila Malta Romano, Michele Padovan, Luiz Nali, Cristiane Centrone, Thiago Ferreira de Araújo e Michele Gouvêa, pela ajuda e receptividade ao longo desses anos.

A Maria Auxiliadora e Francisco Moreira (in memorium), pelo apoio, carinho e confiança.

Aos amigos Adriana Regina Miranda, Ana Paula Campos, Ana Carolina Ferreira, Beatriz Kazume, Bruna Gatto, Cinthia Zanini, Denise R. Espejo, Fabiano Aguiel, Juliane Gavioli, e Suellen Piccolo, por toda amizade, carinho e paciência.

Aos pacientes e doadores que participaram desta pesquisa.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho.

A FAPESP, CAPES, CNPq e Fundação Família Alves de Queiróz pelo apoio estrutural e financeiro.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

"Somos todos geniais. Mas se você julgar um peixe por sua capacidade de subir em árvores, ele passará a vida inteira acreditando ser estúpido."

Albert Einstein

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

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

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Ortografia conforme Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, assinado em Lisboa, em 16 de dezembro de 1990, e aprovado pelo Decreto Legislativo nº 54, de 18 de abril de 1995, publicado no Diário Oficial da União, Seção 1, Página 5585, de 20/04/1995, e no Diário do Congresso Nacional, Seção 2, Página 5837, de 21/04/1995. Em vigor desde 2009.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

1.	Introdução.....	45
2.	Objetivos.....	49
2.1.	Objetivo Primário	49
2.2.	Objetivos Secundários.....	49
3.	Revisão da Literatura.....	53
3.1.	Estrutura do Genoma do VHC	53
3.2.	Diversidade Genética	54
3.3.	História Natural da Hepatite C	56
3.4.	Vias de Transmissão da Hepatite C	58
3.5.	Epidemiologia	62
3.6.	Imunopatogênese da Infecção pelo VHC	64
3.7.	Tratamento da Hepatite C.....	70
4.	Métodos	81
4.1.	Amostra caso.....	81
4.2.	Amostra controle.....	82
4.3.	Comitê de ética.....	83
4.4.	Casuística	83
4.5.	Obtenção dos dados.....	84
4.6.	Processamento das amostras	86
4.7.	Extração do DNA	86
4.8.	Amplificação do fragmento por PCR Convencional	87
4.9.	Purificação do fragmento de PCR convencional.....	89
4.10.	Eletroforese	89
4.11.	Reação de Sequenciamento.....	90
4.12.	Purificação do sequenciamento.....	91
4.13.	Sequenciamento dos produtos purificados	91
4.14.	Confronto de dois pares de iniciadores (CTPP).....	91
4.15.	PCR em Tempo Real.....	94

4.16.	Análise estatística	95
5.	Resultados.....	99
5.1.	Padronização da metodologia	99
5.1.1.	Extração de DNA genômico.....	99
5.1.2.	Análise da reação de PCR convencional.....	99
5.1.3.	Análise dos sequenciamento obtidos	100
5.1.4.	Análise da reação de CTPP.....	101
5.1.5.	Análise da reação de PCR em Tempo Real	102
5.1.6.	Custos para genotipagem do polimorfismo rs12979860.....	103
5.2.	Descrição individual dos grupos	105
5.2.1.	Casos (grupo 1)	105
5.2.1.1.	Primeira análise do grupo 1 em relação a resposta ao tratamento	108
5.2.1.2.	Segunda análise do grupo 1 em relação a resposta ao tratamento	111
5.2.2.	Controle (grupo 2).....	114
5.2.3.	Controle (grupo 3).....	117
5.3.	Comparação dos grupos.....	118
6.	Discussão	125
7.	Conclusão.....	135
8.	Anexos.....	139
9.	Referências Bibliográficas	151

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vírus da Hepatite C	53
Figura 2 - Estrutura Genômica do VHC.....	54
Figura 3 - Árvore filogenética do VHC.....	55
Figura 4 - Distribuição geográfica mundial dos genótipos e subgenótipos do VHC.....	55
Figura 5 - Curso da cronicidade da hepatite C	57
Figura 6 - Distribuição epidemiológica mundial do VHC.....	62
Figura 7 - Modelo sobre a entrada do VHC nas células do hospedeiro	66
Figura 8 – Tipos de resposta no tratamento da Hepatite C com Interferon Peguilado combinado a Ribavirina	73
Figura 9 - Distância dos iniciadores em relação ao SNP.....	88
Figura 10 – Iniciadores da PCR convencional.....	88
Figura 11 – Princípio da reação de CTPP.	92
Figura 12 – Iniciadores da PCR CTPP.....	93
Figura 13 - Extração de DNA genômico em gel de agarose 1,5%	99
Figura 14 - PCR da região próxima ao gene da IL28B.....	100
Figura 15 - Genótipo homozigoto C/C.....	101
Figura 16 – Genótipo heterozigoto C/T.	101
Figura 17 - Genótipo homozigoto T/T.....	101
Figura 18 – Gel PCR CTPP. Gel de agarose 2,0% (p/v).....	102
Figura 19 – Representação gráfica da reação de PCR em tempo real.....	103

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2010..	60
Gráfico 2 - Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2010.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frequência dos alelos C/C, C/T e T/T em diferentes estudos.	76
Tabela 2 - Custos diretos na genotipagem do polimorfismo rs12979860, pelas técnicas de sequenciamento, PCR CTPP e PCR em tempo real.....	104
Tabela 3 – Custos dos equipamentos utilizados nas técnicas de PCR CTPP, sequenciamento e PCR em tempo real.....	105
Tabela 4-Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 1	106
Tabela 5 - Frequência dos alelos C e T em relação ao sexo	106
Tabela 6 - Frequência dos genótipos versus classificação de raça (grupo 1)	107
Tabela 7 – Frequência do genótipo rs12979860 com o grau de fibrose hepática	107
Tabela 8– Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação ao genótipo do VHC.....	108
Tabela 9 – Relação do genótipo do VHC com a tipo de resposta ao tratamento da hepatite C.....	108
Tabela 10 – Resposta ao tratamento em relação ao grau de fibrose	109
Tabela 11 – Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação à resposta ao tratamento	110
Tabela 12 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação à resposta ao tratamento.....	110
Tabela 13 – Faixa etária em relação à resposta ao tratamento	111
Tabela 14 – Resposta ao tratamento em relação ao grau de fibrose	112
Tabela 15 – Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento	113
Tabela 16 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento.....	113
Tabela 17 -Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 2.	114
Tabela 18 – Frequência alélica do polimorfismo rs129979860.	115
Tabela 19 - Frequência dos genótipos versus classificação de raça	115

Tabela 20 – Frequência do polimorfismo rs12979860 versus o grau de fibrose em biópsia hepática (grupo 2)	116
Tabela 21 – Frequência do polimorfismo rs12979860 versus o genótipo do vírus da hepatite C (grupo 2).....	116
Tabela 22 - Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 3	117
Tabela 23 - Frequência alélica em relação ao sexo	117
Tabela 24 – Frequência dos genótipos versus classificação de raça (grupo3)	118
Tabela 25 – Frequência do polimorfismo rs12979860 entre os grupos.....	119
Tabela 26 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 entre os grupos 1,2 e 3	119
Tabela 27 – Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo C/C. 120	
Tabela 28 - Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo C/T ..	121
Tabela 29 - Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo T/T ..	122
Tabela 30 – Grau de fibrose dos grupos 1 e 2	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µL	Microlitros
BX	Biópsia
C-	Controle Negativo
CD8 e CD4	Marcador de Membrana de Linfócitos T auxiliares
CHC	Carcinoma hepatocelular
cols	Colaboradores
Core e P7	Proteínas estruturais
CTL	Linfócito T citolítico
CTPP	do inglês <i>confronting two-pair primer</i> ou Confronto de dois pares de iniciadores
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ou Ácido Desoxirribonucléico ou
dNTP	Desoxiribonucleosideo Trifosfato
E1	Gliproteínas do envelope 1
E2	Gliproteínas do envelope 2
EDTA	do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou Ácido etilenodiamino tetra-acético
EtBr	Brometo de Etídio
<i>g</i>	Força gravitacional
HIV	do inglês <i>human immunodeficiency vírus</i> ou Vírus da imunodeficiência Humana
HLA	do inglês <i>human leukocyte antigen</i> ou Antígenos Leucocitários Humanos
HVR1	Região hipervariável do genoma do VHC
IgA	Imunoglobulina A
IL28B	Interleucina 28B
IL29	Interleucina 29
IMC	Índice de massa corpórea

INF	Interferon
IRES	Sítio interno de entrada no ribossomo
Kb	Kilobases
kDa	Quilodaltons
L	Litros
LDL	do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i> ou Lipoproteínas de baixa densidade
Log	Logaritmo de base 10
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	do Inglês <i>Major Histocompatibility Complex</i> ou Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
NK	Natural killer
nm	Nanômetro
ng	Nanogramas
NS2, NS3, NS4, NS5A e NS5B	Proteínas não estruturais do genoma do VHC
p/v	Peso/Volume
pb	Pares de base
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial Hidrogeniônico
Rbeta	Receptor beta
RBV	Ribavirina
RNA	do inglês <i>Ribonucleic acid</i> ou Ácido Ribonúcleico
RVF	Resposta virológica ao final do tratamento
RVP	Resposta virológica precoce
RVR	Resposta virológica rápida
RVS	Resposta virológica sustentada

SNP	do inglês <i>single-nucleotide polymorphism</i> ou Polimorfismo de base única
TCD4	Linfócito T auxiliar
TCD8	Linfócito T auxiliar
TCR	Receptor de células T
Th1 e Th2	Linfócitos T auxiliares
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
UI	Unidades internacionais
V	Volume
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VSS	Volume de distribuição em estado de equilíbrio dinâmico

RESUMO

Frequência do polimorfismo rs12979860, no gene da IL28B, em pacientes portadores de hepatite C crônica e em controles sadios: nova metodologia de baixo custo e menor tempo para genotipagem

INTRODUÇÃO: Aproximadamente 170 milhões de pessoas são portadores de hepatite C crônica, sendo esta atualmente a principal causa de transplantes hepáticos no mundo. Os pacientes com hepatite crônica C são atualmente tratados com interferon e ribavirina (IFN/RBV). Estudos de associação do genoma associaram à resposta ao tratamento com IFN/RBV a um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) nas proximidades do gene da Interleucina 28B, que codifica a interferona- λ . **OBJETIVOS:** Padronizar nova metodologia de baixo custo e menor tempo de execução para a genotipagem do polimorfismo rs12979860. Investigar a frequência do polimorfismo rs12979860, em uma coorte de pacientes com hepatite crônica C e sua associação com a resposta ao tratamento no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. **MÉTODOS:** A genotipagem foi realizada, por novo método diagnóstico, PCR *multiplex* CTPP (confronto de dois pares de iniciadores) e validado através de sequenciamento direto e PCR em tempo real. Um estudo retrospectivo foi realizado em 248 portadores de hepatite C crônica, tratados com interferon e ribavirina; 138 portadores de hepatite C crônica, virgens de tratamento e 240 doadores de sangue. Foi analisado o DNA, dados clínicos e demográficos, juntamente com dados sobre a resposta ao tratamento. **RESULTADOS:** O método de PCR CTPP foi padronizado e mostrou-se mais rápido e de menor custo comparado ao sequenciamento e PCR em tempo real. Pacientes com resposta virológica sustentada (RVS) apresentaram uma frequência de 33/61 (54,1%) para o genótipo C/C, de 21/61 (34,4%) para o genótipo C/T e 7/61 (11,5%) para o genótipo T/T. Pacientes que não tiveram RVS (Não RVS) apresentam uma frequência de 44/185 (23,8%) para o genótipo C/C, de 102/185 (55,1%) para o genótipo C/T e de 39/185 (21,1%) para o genótipo T/T. Os Não RVS estão associados ao genótipo C/T ($p=0,002$) e ao genótipo T/T ($p=0,001$) quando comparados com o grupo de RVS. **CONCLUSÕES:** Esta dissertação descreve um método inovador, rápido e de baixo custo, o PCR CTPP, que detecta o polimorfismo rs12979860. O ensaio é internamente controlado e não requer a utilização de endonucleases de restrição ou equipamento especial. O polimorfismo rs12979860 é um preditor significativo da resposta ao tratamento com IFN/RBV em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C. A genotipagem deste, em conjunto com os indicadores já existentes, pode identificar prováveis não respondedores ao tratamento.

Descritores: 1.Interleucina 28B 2.Hepatite C crônica/genética 3.Técnicas de genotipagem 4.Análise custo-benefício 5.Hepacivirus 6.Polimorfismo de nucleotídeo único 7.Interferons.

SUMMARY

Frequency of rs12979860 polymorphism in the IL28B gene in patients with chronic hepatitis C and healthy controls: new methodology for low cost and shorter time for genotyping

INTRODUCTION: Approximately 170 million people are chronic carriers of hepatitis C virus (HCV). Chronic HCV patients are currently treated with pegylated interferon and ribavirin (PEG-IFN/RBV). A genome-wide association with PEG-IFN/RBV treatment response and a single nucleotide polymorphism (rs12979860) has been identified near the interleukin 28B gene that encodes interferon- λ -3. **AIM:** Describe an innovative, fast, and low-cost multiplex polymerase chain reaction with confronting two-pair primers that detects the rs12979860 polymorphism. Investigate the frequency of polymorphism rs12979860, among patients with chronic hepatitis C and association with to response treatment at the Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. **METHODS:** Genotyping was performed by new diagnostic method, multiplex PCR CTPP (confronting two-pair primers) and validated by direct sequencing and real time PCR. Retrospective study was conducted in 248 patients with hepatitis C chronic treated with interferon and ribavirin, 138 patients with chronic hepatitis C treatment-naïve and 240 blood donors. We analyzed DNA, clinical and demographic data, along with data on the response to treatment. **RESULTS AND CONCLUSIONS:** The CTPP method was standardized and proved faster and lower cost compared to sequencing and real time PCR. Patients with sustained virologic response (SVR) showed a frequency of 33/61 (54.1%) for the genotype C/C of 21/61 (34.4%) for the genotype C/T and 7/61 (11.5%) for genotype T/T. Patients with out sustained virologic response (Non SVR) have a frequency of 44/185 (23.8%) for the genotype C/C, 102/185 (55.1%) for the genotype C/T and 39/185 (21.1%) for genotype T/T. The Non SVR are associated with genotype C/T ($p = 0.002$) and T/T genotype ($p = 0.001$) as compared with the group of SVR. Today, the IL28B genotyping is recommended by in the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver guidelines. As a result, physicians should consider testing IL28B in patients with hepatitis C; however, the implementation of routine genotyping has been halted in tertiary care hospitals because of the need for molecular biology tools that are expensive and highly complex. The CTPP multiplex assay described here detects in a single reaction the genotypes C/C, C/T, and T/T. This method allows rapid genotyping of the polymorphism rs12979860, which is reproducible in minimally equipped laboratories; it does not require any special equipment and is a relatively low-cost procedure. The PCR-CTPP method can be used for large testing arrays and is also suitable for genotyping a small number of samples.

Keywords: 1. Interleukin 28B 2. Hepatitis C, chronic/genetics 3. Genotyping techniques 4. Cost-benefit analysis 5. Hepacivirus 6. Polymorphism, single nucleotide 7. Interferons.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A hepatite C é uma inflamação no fígado causada pela infecção do vírus da hepatite C (VHC)^[1]. O vírus da hepatite C foi o principal agente etiológico de hepatite pós-transfusional, originalmente denominada de não-A, não-B. Sua identificação ocorreu somente em 1989, por meio de técnicas de biologia molecular^[2] e, mais tarde, salientou-se estar freqüentemente associado ao carcinoma hepatocelular (CHC)^[3,4]. Esta descoberta possibilitou um progresso extraordinário do conhecimento dessa forma de hepatite no contexto mundial.

Apesar de alguns bancos de sangue terem iniciado em 1990 a triagem do sangue quanto à presença do VHC, a utilização de testes efetivos para o controle de qualidade frente ao VHC foi obrigatoriamente introduzida somente entre 1992 e 1993^[5].

Por meio de pesquisas retrospectivas, alguns estudos observaram que 20% dos pacientes que receberam sangue antes de 1993 provavelmente estão infectados com a hepatite C^[3,5,6].

Apesar dos progressos em diagnóstico laboratorial, especialmente com a realização de exames específicos nos bancos de sangue, constata-se que a hepatite C pode ser considerada uma epidemia crescente^[7]. Estima-se que a prevalência poderá atingir o seu pico em 2040, porém, à medida que o tempo de infecção aumenta, espera-se que a proporção de novos pacientes não tratados e com cirrose dobre até 2020^[7]. Assim, medidas adicionais de prevenção e tratamento precisam ser tomadas antes desse fato ocorrer, ou corre-se o risco de, nas próximas décadas, a epidemia de hepatite C vir a atingir complicações na saúde pública em níveis insustentáveis^[6].

O tratamento padrão para os pacientes com infecção crônica é a combinação do interferon peguilado (INF-PEG) com a ribavirina (RBV)^[8]. Vários critérios são utilizados para o prognóstico de evolução da doença, como carga viral, idade, sexo e extensão da fibrose hepática. Porém, sobre todos esses fatores, acredita-se que o genótipo viral poderia ser o fator mais importante. Apesar do tratamento para hepatite C ser considerado eficiente, apenas 40% a 50% dos pacientes infectados com o genótipo 1 obtêm resposta

virológica sustentada (RVS). Já os pacientes infectados com genótipo 2, alcançam a RVS em torno de 70 a 80%. Os infectados com genótipo 3 podem apresentar RVS em torno de 70% dos casos, considerando a presença de fibrose e esteatose^[9].

Tentativas para explicar as diferenças de resposta ao tratamento ou por que alguns pacientes eliminam o VHC espontaneamente têm sido amplamente pesquisadas. Entre estas destaca-se recentemente o papel dos polimorfismos genéticos.

Um estudo de associação do genoma humano apresentou forte relação do polimorfismo rs12979860, localizado próximo ao gene da Interleucina 28B (IL28B) com RVS. Outro estudo mostra forte associação deste SNP (do inglês - *Single Nucleotide Polymorphism*) com o clareamento espontâneo^[10,11].

Deste modo, conhecer a frequência do polimorfismo rs12979860 deve trazer uma informação essencial para o estabelecimento de novas considerações na avaliação de tratamentos mais seguros e eficientes para os pacientes portadores de hepatite C crônica. Até a presente data não existem dados sobre a frequência deste polimorfismo na população do estado de São Paulo, que tão bem representa a diversidade brasileira. É necessário ainda ressaltar a necessidade e importância do conhecimento deste polimorfismo no desenho de novas terapias específicas em pacientes portadores desta hepatopatia.

Atualmente, este polimorfismo é analisado utilizando-se principalmente as técnicas de PCR em tempo real (ensaios personalizados de TaqMan)^[12, 13,14] e sequenciamento direto^[15,16]. Apesar destas técnicas apresentarem bons resultados, seus custos, com reagentes e equipamentos, impõem limitações para a implementação, da genotipagem, em alguns laboratórios e hospitais públicos.

Neste contexto, este trabalho buscou desenvolver uma metodologia de genotipagem simples, rápida, eficaz e de baixo custo. Também buscou descrever a frequência deste polimorfismo na população portadora de hepatite C e em doadores de sangue, assim como entender a relação entre o polimorfismo e a resposta ao tratamento da doença.

OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1.Objetivo Primário

Padronizar e comparar o custo dos métodos de CTPP, sequenciamento e PCR em tempo real, na identificação do polimorfismo rs12979860, localizado no gene IL28B.

2.2.Objetivos Secundários

Analisar a frequência, deste polimorfismo na população portadora do vírus da hepatite C , atendida no ambulatório de Gastroenterologia clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), bem como em doadores de sangue da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo HC-FMUSP.

Analisar a relação deste polimorfismo com a resposta ao tratamento para hepatite C nos pacientes que tiveram indicação ao tratamento.

REVISÃO DA LITERATURA

3. Revisão da Literatura

3.1. Estrutura do Genoma do VHC

O vírus da hepatite C (VHC) é um RNA pertencente à família dos *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*, separado dos *Flavivirus* e *Pestivirus*, pois, apesar de apresentar uma estrutura geral semelhante a estes, sua sequência não se aproxima muito de nenhum deles ^[17,18].

O *virion* do VHC é uma partícula esférica de 30-60nm de diâmetro constituída por ácido nucleico, sede de sua infectividade e circundado por uma capa proteica chamada capsídio, responsável por sua especificidade (Figura 1) ^[19].

Figura 1—Vírus da Hepatite C. O VHC é um vírus RNA da família *Flaviviridae* de 30 a 60nm de diâmetro.

Ilustração:modificado ©James A. Perkins 2001

O seu genoma, formado por uma cadeia simples de polaridade positiva, contém cerca de 9.500 nucleotídeos ^[19,20]. Apresenta apenas uma região aberta para leitura, que compreende quase todo o genoma e codifica uma poliproteína de 3.000 aminoácidos, a qual é clivada em proteínas estruturais (*core*, E1 e E2/P7) e não estruturais (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b) pela ação das proteases virais e celulares. Possui uma região hipervariável

3.3.História Natural da Hepatite C

Devido à escassez de estudos prospectivos, dificuldade quanto à definição de transmissão e associações com outros fatores que alteram o curso da doença, como coinfeções, a história natural e o prognóstico da hepatite C ainda geram grandes controvérsias na comunidade científica^[29].

A infecção aguda pelo vírus da hepatite C é geralmente assintomática, com curso subclínico, em 84% dos casos, o que tem dificultado o diagnóstico^[30,31].

O tempo médio de incubação é de 15 a 90 dias ^[30,32], mas a pessoa infectada já pode transmitir o vírus antes disso^[32].

Os sintomas mais comuns encontrados na infecção pelo VHC são icterícia, fadiga, febre, náusea e vômitos, encontrados em aproximadamente 10 a 20% dos pacientes e com duração média de 2 a 12 semanas, quando se salienta a fadiga e a anorexia. A icterícia, geralmente, dura menos de um mês ^[29,33].

O principal fator que leva a hepatite C ao topo das doenças mais estudadas é a sua alta cronicidade. Apenas 15 a 30% das pessoas infectadas pelo VHC curam-se espontaneamente, enquanto 70 a 85% evoluem para cronicidade e de forma assintomática^[33](Figura 05).

Aproximadamente 20 a 40% dos portadores de hepatite C crônica desenvolvem cirrose após 10 a 20 anos de infecção, e em cerca de 20% dos casos pode surgir o carcinoma hepatocelular CHC, após período superior a 30 anos de infecção^[30,34]. É importante salientar que a evolução da doença hepática, na maioria dos casos, é insignificante nas duas primeiras décadas de infecção^[34].

Figura 5 - Curso da cronicidade da hepatite C

Alguns pesquisadores cogitam que a infecção crônica da hepatite C desenvolve-se inevitavelmente para cirrose, CHC e morte do paciente [35,36]. Outros, pelo contrário, acreditam que o VHC possui um curso variável, sendo muitas vezes, causador de evolução benigna, de modo que a maioria dos portadores não desenvolve a doença clínica hepática, indo a óbito por outras doenças notificadas como mais comuns^[29].

Esta progressão da lesão hepática e da hepatite crônica para cirrose e para CHC, pode ainda relacionar-se a fatores do hospedeiro, tais como o hábito crônico de ingerirem bebidas alcoólicas^[5,7], coinfeção com outros vírus, como o vírus da hepatite B (VHB) e da Imunodeficiência Humana (HIV) [5,37]. Ainda, tem sido enfatizado que o gênero masculino assim como tempo de contato com o vírus pode alterar desfavoravelmente o curso da doença [38].

Assim sendo, a literatura descreve que a ação eficiente de uma resposta imunológica pode ser fundamental para a eliminação do VHC em 15% dos indivíduos que entram em contato com o vírus^[39].

Estudos demonstram que a hepatite C crônica associada às transfusões sanguíneas, pode levar a cirrose na proporção de 5 a 25% e evoluir para CHC em até 4% dos casos após 20 anos de infecção [29]. Outros autores como Silva (2003) têm descrito algumas discordâncias na literatura referentes ao tempo de progressão da hepatite crônica para o CHC^[33].

De acordo com Kiyosawa e cols. (1990), o intervalo entre a transfusão de sangue e o diagnóstico de CHC pode chegar a períodos superiores a 29 anos, enquanto que o de cirrose sem CHC aproxima-se de intervalo igual ou superior a 21 anos, se comparados com a evidência de hepatite crônica, notificada após 10 anos da infecção^[40].

A ocorrência de hepatite fulminante associada ao VHC ainda é alvo de controvérsias; casos de infecção com evolução fulminante são raros no Ocidente e tem sido relatado com maior frequência em países do Oriente^[30]. Alguns pesquisadores cogitam que o VHC não causa hepatite fulminante, uma vez que o vírus seria abortado rapidamente da circulação, pois o fígado necrótico seria impróprio para manter a replicação viral^[41,42].

3.4. Vias de Transmissão da Hepatite C

A transmissão do vírus da hepatite C ocorre principalmente através de exposições parenterais, tais como transfusões sanguíneas, uso de substâncias injetadas por via endovenosa, uso de cocaína intranasal, cirurgias, promiscuidade sexual, tatuagem, exposição a produtos derivados de sangue, hemodiálise e transplantes de órgãos de doadores infectados (Quadro 1)^[43,44,45]. Apesar de alguns estudos relatarem a presença do vírus em outras secreções tais como o leite materno, saliva, urina e esperma, aparentemente a concentração viral é baixa para causar infecção, o que pode enfatizar a menor possibilidade de transmissão por essas vias^[45,46].

Modos de Transmissão da hepatite C	
Comuns	Incomuns
Serigas reutilizadas	Cocaína intranasal
Transfusões de sangue e hemoderivados (antes de 1992)	"Piercing"
Acidentes com agulhas	Tatuagens
	Transmissão sexual
	Transmissão vertical

Quadro 1 - Modos mais frequentes e incomuns de transmissão do VHC encontrados na literatura^[47,48,49].

A transfusão de sangue, inicialmente importante forma de transmissão do VHC, vem se tornando cada vez menos frequente devido ao surgimento e obrigatoriedade do uso de exames sorológicos para detecção do anticorpo anti-VHC nos bancos de sangue, desde o início da década de 90 e em todo o território brasileiro.

Conforme descrito por Alter e cols. (1992), a incidência de hepatite C pós-transfusional, nos EUA, vem decaindo de 10% para 0,3 a 0,5% após a introdução dos testes de triagem^[31]. No Brasil, Coelho (1997) observou que a prevalência em pós-transfundidos diminuiu de 18 para 1,4% após 1993 com a utilização do teste para detecção do anticorpo anti-VHC, ou seja, um declínio de 92%^[50]. Atualmente, o risco de transmissão por intermédio de procedimentos transfusionais de sangue tem diminuído de maneira acentuada, sendo de 3% a média mundial^[51,52].

Nos últimos anos, tem sido incomum a transmissão associada a procedimentos médicos, exceto as que ocorrem em centros de hemodiálise, associados a altas taxas de prevalência do VHC. Alguns pesquisadores relatam que as prevalências do VHC, entre profissionais da área de saúde, nos Estados Unidos e Europa variam de 1 a 2%. Entre essas vias de contaminação, tem sido enfatizado o borramento de sangue na conjuntiva como a principal via de acesso^[48,49].

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1986 e 1988, 42% dos casos de hepatite aguda pelo VHC ocorreram entre drogadidos e acredita-se que a transmissão tenha ocorrida por infusão endovenosa, sendo a prevalência mundial, nesta mesma época, de 70 a 90% nesse grupo da população^[31]. No Brasil, o trabalho de Carrilho e Clemente (2003) mostra uma frequência de 14 a 70% entre os dependentes de drogas ilícitas endovenosas, sendo evidenciada uma maior prevalência na cidade do Rio de Janeiro (69,6%)^[47].

O gráfico 01 mostra o percentual das principais vias de infecção no Brasil.

Gráfico 1 - Distribuição percentual dos casos de hepatite C segundo provável fonte/mecanismo de infecção por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2010.

Fonte: Boletim epidemiológico hepatites virais. Casos de hepatites virais: Sinan/SVS/MS^[53].

Notas: 1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os testes anti-VHC e VHC-RNA reagentes; 2) casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2010; 3) dados preliminares para 2010.

Execução: Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.

Embora a transmissão intrafamiliar não seja bem documentada e motivo de grandes controvérsias, vários estudos relataram a transmissão vertical e sexual quando existem contatos estreitos com portadores crônicos^[54,55,56].

A transmissão vertical ocorre em 3,2 a 6,4% dos partos de mães infectadas, dependendo principalmente da carga viral no momento do parto assim como do processo de coinfeção com HIV^[7].

Vários estudos demonstram que não houve diferença significativa entre a transmissão por cesariana mesmo nas de emergências em comparação com o parto normal ^[57,58,59,60]. Até a presente data, não há nenhum estudo que tenha comprovado a ocorrência de transmissão do VHC por intermédio do leite materno.

Embora a transmissão sexual ser motivo de grandes controvérsias, Akahane e cols. (1994), observaram baixa eficácia de infecção por esta via^[61].

Altere cols. (1989), apresentaram o primeiro trabalho onde a possibilidade de transmissão do VHC, através de relação sexual, foi evidenciada como fator de risco para múltiplos parceiros^[62].

Terrault e cols. (2002), estimam um risco de 0-0,6% ano, para parceiros com relações monogâmicas por longo período de tempo e de 1% ano para aqueles com múltiplos parceiros ^[63].

Alguns estudos mostram elevadas taxas de positividade para anti-VHC entre os profissionais do sexo e homens que fazem sexo com outros homens^[64,65,66].

Um dos primeiros estudos realizados no Brasil demonstrou a frequência de 11,76% de anti-VHC em parceiros sexuais de pacientes VHC, sem outros fatores de risco para infecção pelo VHC que apresentassem significado estatístico^[67]. Carrilho e Clemente (2003) realizaram, em São Paulo, estudo que demonstrou uma prevalência de 20,2% de casais VHC-RNA positivos, a partir de um dos cônjuges sorodiscordantes^[47]. Mais recentemente, de Carvalho-Mello e cols. (2010) mostraram, por meio de análise filogenética, que os vírus de 5/9 casais tiveram uma origem comum^[68].

Outros fatores de risco têm sido considerados como de menor fonte de transmissibilidade, tais como a inoculação de cocaína via intranasal e a colocação de *piercing* e tatuagens ^[69]. Mesmo considerados como de transmissão esporádica, tais fatores são responsáveis por pelo menos 12% dos casos^[70].

3.5.Epidemiologia

A infecção pelo VHC representa, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública. Calcula-se que a prevalência global, média, seja de 3%, o que corresponde a aproximadamente 130 milhões de pessoas VHC-positivas em todo o mundo (figura 06)^[71].

Embora seja uma doença endêmica, há um elevado grau de variabilidade geográfica em sua distribuição^[7]. Estima-se que as menores prevalências (0,01%-0,1%) são observadas no Reino Unido e na Escandinávia e a maior (15%-20%), no Egito ^[72,73]. Alter (2007) sugere, ainda, que a prevalência de anticorpo anti-VHC em doadores de sangue na América Latina seja aproximadamente de 0,2 - 0,5%^[7].

Figura 6- Distribuição epidemiológica mundial do VHC

Fonte: Adaptado de Alter (2007)

De acordo com o Ministério da Saúde, em publicação no Boletim Epidemiológico ano II nº1 (2011), no Brasil foram confirmados 69.952 casos de hepatite C, no período de 1999 a 2010, registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Destes, 47.830 provêm da região sudeste e 15.095 da região

sul, que juntas concentram 90% dos casos confirmados no país (gráfico 2). Dentre as Unidades Federadas, destacam-se São Paulo e Rio Grande do Sul, com 58,7% (41.033) e 13,1% (9.143), respectivamente, dos casos confirmados de hepatite C no país.

Gráfico 2 - Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 habitantes) segundo região de residência por ano de notificação. Brasil, 1999 a 2010.

FONTES: Casos de hepatites virais: Sinan/SVS/MS; população: estimativas populacionais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) segundo os Censos (1980, 1991 e 2000), contagem da população (1996) e projeções intercensitárias (1981 a 2009).

NOTAS: (1) Foram considerados casos confirmados aqueles que apresentaram os testes anti-VHC e VHC-RNA reagentes; (2) casos notificados no SINAN até 31 de dezembro de 2010; (3) dados preliminares para 2010.

EXECUÇÃO: Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais.

Há uma diversidade na frequência da hepatite C de acordo com a idade do indivíduo, que normalmente adquire o VHC ao submeter-se a fatores de risco.

Estudos de prevalência por faixas etárias permitiram a determinação de três grupos com características epidemiológicas distintas^[7].

No primeiro grupo evidenciam-se os EUA, Austrália e Brasil, com taxas de prevalência mais elevadas nos indivíduos entre 40 e 50 anos,

correlacionando-se as contaminações ocorridas 10 a 30 anos antes do diagnóstico^[7].

No segundo grupo, no qual o Japão e Itália são classificados, encontram-se taxas de prevalência mais altas em idosos, com a contaminação tendo ocorrido há mais de 30 anos^[7].

No terceiro grupo, encontra-se o Egito com presença do VHC em todas as faixas etárias, com elevado risco, para contaminação, no passado e presente^[7].

Embora a incidência anual de novas infecções sintomáticas seja de 1 a 3 casos/100.000 pessoas, acredita-se que a verdadeira incidência seja muito mais alta do que citado, tendo em vista a grande frequência e a característica de doença assintomática^[33].

É difícil determinar com precisão a incidência de infecção pelo VHC, uma vez que os ensaios não distinguem a infecção aguda da crônica e a maioria dos países não possuem estratégias eficientes em coletar dados sobre os casos de doença agudas.

3.6. Imunopatogênese da Infecção pelo VHC

A lesão celular, causada pelo VHC, depende da interação vírus-hospedeiro, ou seja, quanto mais intensa a resposta imune, maior a lesão celular, podendo até levar o paciente ao óbito, fato este observado com maior frequência na hepatite fulminante, evento raro, como já comentado. Uma resposta imunológica intensa torna-se muito eficiente na infecção aguda, pois os linfócitos T auxiliares (células TCD4 e CD8) podem provocar a eliminação do vírus^[74].

O mecanismo responsável pela persistência ou clareamento viral na hepatite C ainda não foi totalmente esclarecido. Entretanto, a presença de linfócitos T específicos contra o VHC, o aparecimento de viremia sob imunossupressão, que são aspectos autoimunes, e a deterioração da doença na coinfeção com o HIV, são características que sugerem um mecanismo imunomediado seja fundamental na lesão hepática causada pelo vírus e talvez

também na eliminação do VHC^[75,76,77]. Acredita-se que a elevada taxa de variabilidade genética do VHC é o principal fator para facilitar o escape do vírus da vigilância imunológica^[74]. A reação imunológica contra o VHC ocorre na maioria dos indivíduos infectados. Os autoanticorpos são comumente encontrados, porém em baixos títulos^[78].

Relatos na literatura sugerem que na infecção aguda existe alguma correlação entre a resposta rápida e precoce das células T e a possível eliminação viral. Esta resposta é decorrente do balanço entre a resposta imune do paciente e a replicação viral^[79].

O equilíbrio pode ser alcançado por fatores do paciente (CTL, células B, HLA e resposta não-específica) e fatores virais (carga viral, genotipagem e *quasiespecies*). Por outro lado, pode ser alterado por: imunossupressão, drogas anti-retrovirais e drogas que ativam a resposta imune^[80].

Para que ocorra a eliminação viral, vários fatores devem ocorrer simultaneamente, como: diminuição da viremia e ativação da resposta inespecífica (células NK, interferon e complemento) e específica do CTL. Atualmente, sabe-se que a resposta imune do paciente é responsável pela eliminação viral e pela lesão celular^[74,80].

3.6.1. Componentes da Resposta Imune Antiviral do VHC

A cinética com que os hepatócitos serão infectados esta diretamente relacionada a fatores do vírus, como tamanho, composição genética e taxa de replicação. Estes fatores também determinam a resposta imune que será desenvolvida pelo paciente^[81].

O mecanismo de entrada do VHC na célula do hospedeiro ainda é desconhecido. Sabe-se que o acesso do vírus aos hepatócitos se realiza através de vários receptores celulares a partir das glicoproteínas, E1 e E2 separadamente ou em conjunto. Essa internalização pode ser mediada por receptores de lipoproteínas de baixa densidade - LDL (do inglês - *Low-Density Lipoprotein*), através da endocitose^[22].

Esta ligação pode ocorrer também através de moléculas da família dos glicosaminoglicanos, com a entrada mediada por outros receptores de alta afinidade^[77,82]. Há evidências de que anticorpos monoclonais anti-CD81 inibem a ligação da proteína E2 com as células que serão infectadas^[83]. Em seguida o vírus invadirá o organismo, utilizará o maquinário do hospedeiro, tornar-se-á persistente com ou sem lesão hepática e se espalhará pelo organismo, evitando assim sua eliminação (Figura 07). Assim a lesão hepática decorre: do mecanismo celular, da alteração da função da membrana celular, ou devido aos produtos virais^[77,84].

Figura 7 - Modelo sobre a entrada do VHC nas células do hospedeiro

Fonte: Adaptado de Moradpour; Penin; Rice (2007)^[22]

3.6.1.1. Resposta Imune Humoral

O VHC pode causar infecção crônica apesar das respostas imune celular e humoral ativas. O vírus pode escapar da resposta imune quando a cinética da infecção e a replicação viral não permitem que os anticorpos promovam completa neutralização após a primo infecção^[81]. Embora os anticorpos anti-VHC interfiram na entrada do VHC na célula, opsonizando-os para posterior eliminação pelos macrófagos, eles não conseguem eliminar o vírus das células infectadas^[74]. Os anticorpos tornam-se detectáveis em um período médio de 7 a 31 semanas após a infecção^[85].

Os anticorpos são dirigidos contra múltiplos epítomos das proteínas virais^[85]. Por outro lado, a eliminação viral, é acompanhada da redução na quantidade de anticorpos contra o VHC^[81].

Altos títulos de anticorpos no início da infecção dirigidos contra o envelope viral podem pelo menos modular ou até mesmo proteger contra a infecção pelo VHC^[86]; a resolução da infecção aguda pelo VHC estaria associada com o desenvolvimento precoce de anticorpos anti-gpE2^[87].

Foi observado que as diminuições dos níveis de anticorpos encontradas nos pacientes que respondem ao tratamento com interferon indicam um papel decisivo dos anticorpos na eliminação viral^[88]. Entretanto, o clareamento viral pode ocorrer mesmo em pacientes com agamaglobulinemia, doença hereditária caracterizada por baixos níveis de imunoglobulinas, o que pode ser um indício de que o controle sobre o vírus pode ser alcançado mesmo na ausência de anticorpos^[89].

Haverá menor eliminação viral espontânea quando a resposta humoral for tardia assim como contra a extremidade amino da região hipervariável da proteína E2. A persistência viral parece estar associada à distribuição de *quasispecies* mais complexas assim como correlacionada à maior complexidade da HVR1^{[90][91]}.

O VHC possui alta taxa de mutação, principalmente na região hipervariável (HVR1) das proteínas do envelope viral, o que dificulta ainda mais a defesa imune do paciente. Assim, resposta imune humoral pode contribuir

para a seleção dos VHC mutantes que escapam ao reconhecimento dos anticorpos^[39].

Os linfócitos T auxiliares intra-hepáticos são dez vezes mais eficientes do que os do sangue periférico, no auxílio das células B, para produzir IgA. Esta compartimentalização talvez possa explicar porque a produção contínua de anticorpos pode ser observada, mesmo não se detectando as células T auxiliaadoras contra o VHC no sangue periférico^[39].

A progressão para hepatite crônica parece ser um processo multifatorial que depende de diversos aspectos na interação hospedeiro-vírus^[77].

3.6.1.2. Resposta Imune Celular

Uma resposta imune precoce vigorosa, multiespecífica e persistente de células TCD4 e CD8 estão associadas à eliminação do VHC. Após a cura, espera-se a diminuição dos níveis de anticorpos, podendo estes até desaparecerem. Entretanto, as células CD4 e CD8 persistirão, sendo os únicos marcadores de infecção pregressa e do clareamento viral^[77].

As células TCD4 são ativadas quando seus receptores se ligam ao complexo formado pelo peptídeo viral e às moléculas do MHC classe II. A produção de citocinas específicas desempenha função imunomoduladora por meio do mecanismo celular, sendo que Th1 produzirá IL2, INF-alpha e INF-gama; ou pode ser decorrente da produção de anticorpos, sendo que Th2 secretará IL-4, 5, 6, 9, 10 e 13^[76,89].

Observações clínicas sugerem que eventos virais e imunológicos ocorridos nas primeiras semanas após a infecção podem determinar a evolução da hepatite C^[77].

A resposta imune vigorosa da célula TCD4 contra o VHC é fundamental tanto no início da hepatite aguda, para a eliminação viral com a subsequente resolução da doença como na fase tardia para um controle viral de longa duração^[76].

Alguns autores sugerem que quando a ação ocorre sobre a protease e a helicase da proteína não estrutural NS3, na região imunodominante do

aminoácido, os pacientes conseguem eliminar o vírus, na infecção aguda, de forma mais frequente^[92]. Outros, no entanto demonstraram que a ação vigorosa, policlonal e multiespecífica do TCD4 deveriam ser dirigidas contra antígenos estruturais e não-estruturais do genoma viral, para que esses pacientes conseguissem tal eliminação^[75].

A resposta mais vigorosa, predominantemente de linfócitos TCD4 tipo Th1, que, possivelmente elimina o vírus na fase aguda e que precisa ser mantida permanentemente para obter controle da viremia de longa duração, foi mais observada em pacientes que conseguiram clarear o vírus.

A resposta menos vigorosa de linfócitos TCD4 tipo Th2, antecipando o estímulo de produção de anticorpos (não-citotóxica), é encontrada principalmente naqueles em que a infecção persistiu e cronicou. É possível, contudo, que as citocinas consigam controlar a replicação viral por mecanismos não citolíticos^[89].

Mesmo após ter ocorrido o clareamento da hepatite aguda causada pelo VHC, uma vigorosa resposta de linfócitos TCD4 pode ser detectada na corrente sanguínea periférica, sugerindo a existência de efetiva memória imunológica^[92].

A célula TCD8 reconhece por meio do receptor de células T (TCR - do inglês *T cell receptor*), o peptídeo viral apresentado pelas moléculas do MHC classe I na superfície das células infectadas^[74]. A ativação destas células pelo complexo MHC/peptídeo pode levar ao controle e clareamento da viremia por meio citolítico e não citolítico^[89]. O linfócito T citolítico (CTL) é a principal arma de defesa do paciente contra o VHC, assim como está implicado na imunopatogênese da infecção^[93].

A pequena quantidade de precursores CTL contra o VHC no sangue periférico é insuficiente para destruir todos os hepatócitos infectados, favorecendo a persistência do vírus^[92]. Desta forma, a resposta, por meio de CTL contra o VHC talvez seja insuficiente para eliminar o vírus, porém forte o suficiente para controlar a carga viral. O CTL também pode, eventualmente, favorecer a inflamação hepática que poderá ao longo do tempo gerar a cirrose e o carcinoma hepatocelular (CHC)^[84].

Não há evidências de imunidade natural em pacientes que conseguiram eliminar o vírus na hepatite aguda^[94].

3.7.Tratamento da Hepatite C

De acordo com Ferenci e cols.(2001), devido à alta frequência de evolução da hepatite aguda para a crônica, busca-se tratar a infecção tanto na fase aguda como na fase crônica^[95].

O objetivo de tratar pacientes com hepatite aguda é o término da infecção, interrompendo sua progressão para a forma crônica^[96].

O tratamento da hepatite C crônica tem por objetivo à eliminação definitiva do vírus e controle da progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral, impedindo assim a evolução para cirrose e suas complicações, como hipertensão portal, hemorragia digestiva alta, ascite, encefalopatia hepática e CHC, aumentando a expectativa de vida e reduzindo o número de transplantes hepáticos^[97]. Convém ressaltar que, uma vez a cirrose já estabelecida, a negativação viral pode reduzir a progressão hepática, porém não reduzir a fibrose.

Um grande número de medicamentos tais como o ácido ursodeoxicólico, agentes anti-inflamatórios não-esteróides, timosina-alfa-1 e amantadina, foi avaliado para o tratamento da hepatite C, porém a maioria dos protocolos clínicos não revelou resultados que superasse o tratamento combinado de Interferon (IFN) e Ribavirina (RBV)^[98,99].

Até a década de 1990, a terapia disponível para o tratamento da Hepatite C era o Interferon α , β e γ 2a/b 3 milhões UI, administrado 3 vezes por semana por períodos variáveis^[100]. Em 1998, Consenso Europeu institui o uso de uma terapia combinada – interferon-alfa associado à ribavirina^[101]. Desde 1999, o Ministério da Saúde do Brasil iniciou a distribuição dos medicamentos pela rede do Sistema Único de Saúde (SUS), por meio das Secretarias do Estado de Saúde^[101]. O IFN convencional e a RBV são oriundos da produção nacional, e o interferon alfa-2a e alfa-2b peguilado, molécula que aumenta a

meia vida do medicamento, são importados pelo Ministério da Saúde de diferentes companhias farmacêuticas^[102].

Atualmente, no Brasil, o tratamento é regido pelo protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções de 2011, entretanto estas diretrizes estão para mudar.

Em 2011, o FDA (do inglês – *Food and Drug Administration*) aprovou duas novas medicações para o tratamento da hepatite C. O boceprevir e o telaprevir, ambos inibidores da protease, que combinados separadamente ao interferon peguilado e a ribavirina, mostraram um aumento significativo de resposta virológica sustentada.

Em 25 de Julho de 2011, o boceprevir (Victrelis®) foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sob registro nº 1.0029.0182.001-8, para comercialização no Brasil.

Em 17 de outubro de 2011, o telaprevir (Incivo®) foi aprovado pela ANVISA, sob registro nº 11.236.3400.002-1, para comercialização no Brasil.

Em 25 de julho de 2012, a Portaria nº 20, a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos do Ministério da Saúde, incorpora o uso dos inibidores de protease, telaprevir e boceprevir, no tratamento de hepatite C crônica no SUS.

Atualmente, a indicação para tratamento baseia-se no grau de acometimento hepático observado por exame anátomo-patológico hepático obtido por biópsia, sendo esta dispensada apenas em portadores de coagulopatias congênitas, como insuficiência renal crônica, diagnóstico clínico e laboratorial de cirrose hepática estabelecida e genótipos 2 e 3 com carga viral superior a 600.000 UI/mL^[8].

A escolha pelo tratamento na hepatite crônica deve considerar o risco de progressão da doença, efeitos adversos, presença de comorbidades, tempo de uso dos medicamentos e probabilidade de resposta terapêutica.

O sucesso terapêutico está intimamente ligado a características como: genótipo viral não-1, carga viral baixa (< 600.000UI/mL), baixos graus de fibrose, atividade inflamatória inexistente ou mínima e ausência de

obesidade^[103].Entretanto, alguns autores consideram o genótipo como o mais forte preditor de resposta ao tratamento^[104].

De acordo com a secretaria de Vigilância em Saúde por meio do Protocolo Clínica e diretriz terapêuticas para Hepatite viral C e Coinfecções de 2011^[8], o tratamento para o VHC deve obedecer aos seguintes critérios para sua avaliação(Figura 08):

a) Resposta virológica rápida (RVR): definida como VHC-RNA quantitativo (carga viral) indetectável (abaixo do limite inferior de detecção) na 4ª semana de tratamento;

b) Resposta virológica precoce (RVP): definida como a queda de pelo menos duas escalas logarítmicas (2 Log) ou 100 vezes o valor do VHC-RNA pré-tratamento (RVP parcial), ou sua indetectação na 12ª semana de tratamento (RVP total);

c) Resposta virológica ao final do tratamento (RVF): definida como VHC-RNA indetectável ao final do tratamento;

d) Resposta virológica sustentada (RVS): definida como VHC-RNA indetectável na 24ª semana de seguimento; após o término do tratamento;

e) Recidiva virológica (recidivantes): definida como VHC-RNA indetectável ao final do tratamento e VHC-RNA detectável 24 semanas após o término do tratamento;

f) Respondedor lento: definido como o indivíduo que apresenta RVP parcial (VHC-RNA detectável, porém com queda inferior a 2 Log na 12ª semana) e VHC-RNA indetectável na 24ª semana de tratamento.

g) Não respondedor parcial: definido como o indivíduo que apresenta RVP parcial (VHC-RNA detectável, porém com queda inferior a 2 Log na 12ª semana) e VHC-RNA detectável na 24ª semana de tratamento.

h) Nulo de resposta: definido como o indivíduo que não apresenta pelo menos RVP parcial (queda de pelo menos 2 Log do valor do VHC-RNA pré-tratamento, na 12ª semana de tratamento).

Figura 8 – Tipos de resposta no tratamento da Hepatite C com Interferon Peguilado combinado a Ribavirina

Fonte: Adaptado de Ghant, 2009

Quando a infecção é tratada precocemente, as taxas de RVS alcançam valores superiores a 80% e, em algumas situações, próximos de 98% ^[105].

No Brasil, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, publicado em maio de 2011, preconiza que, para os genótipos 2 e 3, o tratamento deve ser realizado com interferon convencional combinado a ribavirina por 24 semanas, com exceção dos pacientes que apresentam, escore METAVIR $\geq$ F3, manifestações clínicas de cirrose hepática e/ou carga viral superior a 600.000UI/mL, que devem receber tratamento com Interferon peguilado por até 48 semanas. Para o genótipo 1 o tratamento deve ser realizado com interferon peguilado combinado a ribavirina por 48 semanas.

Apesar de estas medicações obterem resultados terapêuticos satisfatórios, muitos pacientes não respondem ao tratamento, ou sabe-se, por exemplo, que pacientes de ascendência Europeia têm uma probabilidade maior de responder ao tratamento do que pacientes de ascendência Africana ^[10,11,106].

Tentativas para explicar as diferenças de resposta ao tratamento ou por que alguns pacientes eliminam o VHC espontaneamente têm sido amplamente pesquisadas. Entre elas destaca-se recentemente o papel dos polimorfismos genéticos.

Os fatores genéticos têm sido cada vez mais aceitos como causa de variações em respostas farmacológicas e imunológicas^[107,108,109].

Vários estudos,*in vitro*, demonstram que o tratamento antiviral também pode induzir ou inibir expressão de centenas de genes^[110,111,112,113,114].

3.8. Interleucina 28B e suas variações

Citocinas desempenham um papel fundamental na modulação do sistema imune inata e adaptativa. Sheppard e cols. (2003) identificaram, a partir da sequência do genoma humano, uma família de três citocinas, designada interleucina 28A (IL-28A), interleucina 28B (IL-28B) e interleucina 29 (IL-29), que são parentes distantes dos interferons (IFNs) tipo I. Descobriram que, como o tipo I do IFNs, a IL-28 e IL-29 são induzidas por uma infecção viral e apresentam atividade antiviral^[115].

No entanto, a IL-28 e IL-29 interagem com um receptor heterodimérica classe II, que consistiu de receptor beta das citocinas IL-10 (IL-10Rbeta).

O gene IL28, localizado no cromossomo 19, codifica a interleucina 28, também conhecida como interferon lambda^[115].

Ge e cols. (2009) realizaram um estudo de associação do genoma humano em mais de 1.600 indivíduos portadores de VHC em tratamento clínico convencional. Eles identificaram um SNP (rs12979860 – C<T) próximo ao gene da IL28B, próximo a subunidade que codifica interferon-3 lambda. Este apresentou uma forte associação com a resposta virológica sustentada (RVS). O genótipo C/C do polimorfismo rs12979860 foi significativamente mais frequente em populações européias do que em africanas. O estudo estimou que tal SNP pudesse explicar cerca de metade da diferença do tratamento entre africano-americanos e os pacientes de ascendência européia^[11].

Com propósito de entender melhor o papel do polimorfismo rs12979860 em relação à infecção pelo VHC, Thomas e cols. (2009) genotiparam 1.008 indivíduos. Em resultado foi observada que a frequência do alelo C foi maior no grupo de pacientes que obtiveram o clearance viral espontaneamente, em ambos os grupos étnicos. Pacientes com o genótipo C/C tinham 3 vezes mais

chances de clarear o VHC em relação aos pacientes de genótipos C/T e T/T^[10]. Ainda, foi observado que o SNP rs12979860 está em forte desequilíbrio de ligação com o SNP rs8103142, que poderia alterar a função do IL28B e explicar a associação, mas testes de diferenças funcionais são necessários para definir o mecanismo biológico. O grupo concluiu que o SNP rs12979860 está tanto associado com a resposta ao tratamento do VHC quanto com o clareamento viral espontâneo^[10].

Este efeito também pode ser observado no trabalho de John Scott e cols. (2011), no qual foi verificada uma queda de carga viral acentuada, nas primeiras 48 horas de tratamento nos pacientes com genótipo C/C do que em pacientes T/T, mostrando que o polimorfismo rs12979860 exerce um efeito antiviral, aumentando a taxa de mortes dos hepatócitos infectados^[116].

A genotipagem de outras populações mostrou que o alelo C é mais frequente na Ásia Oriental, tem uma frequência intermediária na Europa, América do Sul e América Central, e uma frequência menor na África. A Tabela 1 ilustra as frequências dos alelos C/C, C/T e T/T em diferentes populações.^[106,117,118]

Tabela 1 – Frequência dos alelos C/C, C/T e T/T em diferentes estudos.

rs12979860	Etiologia	Doença de Base	Frequência (%)	Referências
C/C	Caucasiana (n=199)	Cirrose	63 (31,7%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=235)	Hepatite C Leve	70 (29,8%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=199)	Cirrose em VHC	63 (31,6%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=75)	Cirrose em VHB	36 (48,0%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=32) e Afro americano (n=9)	CHC	20 (49%)	Cyr D D. e cols. 2011
	Ancestrais Europeus (n=381)	VHC	162 (48,2%)	Thomas D L. e cols. 2009
	Ancestrais Americanos (n=193)	VHC	26 (44,8%)	Thomas D L. e cols. 2009
C/T	Caucasiana (n=199)	Cirrose	102 (51,2%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=235)	Hepatite C Leve	143 (60,8%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=199)	Cirrose em VHC	102 (51,3%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=75)	Cirrose em VHB	35 (46,7%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=32) e Afro americano (n=9)	CHC	18 (44%)	Cyr D D. e cols. 2011
	Ancestrais Europeus (n=381)	VHC	184 (72,2%)	Thomas D L. e cols. 2009
	Ancestrais Americanos (n=193)	VHC	91 (67%)	Thomas D L. e cols. 2009
T/T	Caucasiana (n=199)	Cirrose	34 (17,1%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=235)	Hepatite C Leve	22 (9,4%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=199)	Cirrose em VHC	34 (17,1%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=75)	Cirrose em VHB	4 (5,3%)	Fabris C. e cols. 2011
	Caucasiana (n=32) e Afro americano (n=9)	CHC	3 (7%)	Cyr D D. e cols. 2011
	Ancestrais Europeus (n=381)	VHC	35 (68,6%)	Thomas D L. e cols. 2009
	Ancestrais Americanos (n=193)	VHC	76 (79,2%)	Thomas D L. e cols. 2009

Com o objetivo de identificar mais variações genéticas associadas ao tratamento do VHC, Vijayaprak e cols. (2011) fizeram um estudo de associação do genoma em 293 Australianos, genótipo 1 com RVS validando com uma coorte de replicação independente constituída de 555 indivíduos. Neste trabalho foi relatada uma forte associação entre a RVS e o polimorfismo rs8099917. Os autores sugerem que estes dados possam ser úteis para a predição de resposta à droga.

Fabris e cols. (2011) demonstraram diferenças significativas do rs12979860 entre grupos de pacientes com cirrose, carcinoma hepatocelular, VHC crônica e indivíduos saudáveis. Neste trabalho é possível observar que pacientes com cirrose viral teve uma maior frequência do alelo T em comparação aos pacientes com VHC leve e indivíduos sadios. Além disso, o alelo T foi significativamente mais frequente em pacientes com cirrose viral do que em pacientes com cirrose não viral. O trabalho mostra também que em pacientes com CHC foi verificada uma frequência de 43,5% do alelo T, enquanto em pacientes sem CHC esta foi de 31,0%. Os autores observam que seus dados sugerem uma interação entre o polimorfismo rs12979860 e a ocorrência de CHC principalmente em hepatite C crônica^[119].

Derek e cols. (2011) avaliaram o polimorfismo rs1979860 com a expressão de características quantitativas de proteínas e demonstraram uma associação entre os níveis séricos de globulina transportadora de corticosteróides, principal transportador de cortisol, com o alelo C^[13].

Francis cols.(2010) realizaram um estudo retrospectivo avaliando os efeitos colaterais do tratamento com interferon- α com o polimorfismo do IL28B. O genótipo T/T foi associado com menor apetite, energia, e queixas de sono durante o tratamento, apesar de não ter sido observada relação significativa com o desenvolvimento de transtornos depressivos.

Jeanette e cols. (2010) ressaltam que atualmente as decisões para tratamento em pacientes com hepatite crônica C são baseados em dados clínicos, demográficos e características virológicas dos pacientes e que embora estes possam ser úteis, muitas vezes são falhas em prever a resposta ao tratamento^[117].

MÉTODOS

4. Métodos

Trata-se de um estudo observacional, retrospectivo em amostras de conveniência.

A pesquisa foi desenvolvida no ambulatório de hepatites virais do serviço de gastroenterologia clínica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no laboratório de Investigação Médica 07 (LIM07), no período de 10 de junho de 2011 a 10 de dezembro de 2012.

4.1. Amostra caso

Grupo 1: portadores de hepatite C crônica atendidos no ambulatório de hepatites virais do serviço de Gastroenterologia clínica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Critérios de inclusão:

- Idade superior a 18 anos;
- Diagnóstico comprovado de hepatite C por sorologia e PCR;
- Tratamento com Interferon convencional ou Peguilado combinado a Ribavirina, recebido através do Sistema Único de Saúde (SUS).

Critérios de exclusão:

- Diagnóstico de hepatite B;
- Infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV);
- Tratamento com Interferon convencional ou peguilado combinado a ribavirina pós transplante hepático.

4.2. Amostra controle

Grupo 2: portadores de hepatite C crônica atendidos no ambulatório de hepatites virais do serviço de Gastroenterologia clínica, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Critérios de inclusão:

- Idade superior a 18 anos;
- Diagnóstico comprovado de hepatite C por sorologia e PCR;
- Virgem de tratamento com Interferon convencional ou peguilado combinado a Ribavirina.

Critérios de exclusão:

- Diagnóstico de hepatite B;
- Infecção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV);

Grupo 3: voluntários não doentes, recrutados na Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo HC-FMUSP

Critérios de inclusão:

- Idade superior a 18 anos;
- Acima de 50 quilos, descansado e alimentado.

Critérios de exclusão:

- Estar gripado;
- Gravidez ou suspeita desta;
- Tatuagem realizada nos últimos 12 meses;
- Fatores de risco em geral (vários parceiros sexuais, não usar preservativo e uso drogas injetáveis e/ou inaláveis).

4.3. Comitê de ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisas - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, em sessão de 08/06/11 sob protocolo nº0142/11(Anexo I).

Considerando o avanço técnico-científico recente e suas aplicações na pesquisa em genética humana, esse trabalho foi realizado de acordo com as definições da resolução 411/11 (Anexo II).

4.4. Casuística

Os grupos avaliados nessa pesquisa foram constituídos com amostras de DNA disponíveis em biorepositório disponível no LIM07, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Suzane Kioko Ono, formado no período de 2007 e 2009 para o trabalho “Frequência do alelo UGT1A1*28 (Síndrome de Gilbert) em pacientes portadores de hepatite crônica C e em controles sadios” do então aluno de mestrado Marcelo Moreira Tavares de Souza.

Os pacientes que dispuseram de amostras de sangue foram triados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Em seu retorno ao ambulatório, foram convidados e instruídos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Anexo III.

Para os doadores de sangue foi, solicitado e obtido isenção de novo termo de consentimento livre e esclarecido, através de carta enviada ao Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisas - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. As informações e as amostras referentes aos doadores foram relatadas e utilizadas em bases de dados já descritos no termo do projeto de pesquisa intitulado “Frequência do alelo UGT1A1*28 em pacientes portadores de Hepatite C e em controles sadios” com o número de protocolo: 056/06.

No grupo 1 foram incluídos 270 pacientes portadores de hepatite C crônica, tratados com interferon e ribavirina. Seis pacientes foram excluídos

devido à sorologia positiva para hepatite B e três para HIV. Dois pacientes foram excluídos por tratamento com Interferon e Ribavirina pós transplante hepático. Dezesseis foram excluídos por informações duvidosas no prontuário. Assim o grupo 1 foi composto por 246 pacientes. No grupo 2 foram incluídos 153 pacientes portadores de hepatite C crônicos, virgens de tratamento. Dois foram excluídos por sorologia positiva para hepatite B. Treze foram excluídos por informações duvidosas no prontuário. Assim o grupo 2 foi composto por 138 pacientes. No grupo 3 foram incluídos 250 doadores de sangue. Três foram excluídos por falta de sangue no banco. Sete foram excluídos por falta de informações, no cadastro, sendo este grupo composto por 240 indivíduos.

4.5.Obtenção dos dados

Os pacientes foram submetidos a uma breve entrevista com o objetivo de obter informações como sexo, idade, peso, raça e ancestralidade.

Todos os pacientes do grupo 1 e 2, tiveram o diagnóstico de hepatite C crônica confirmado através de PCR qualitativo.

As biópsias hepáticas e exames de funções hepáticas foram obtidos no prontuário eletrônico consultado no sistema interno do HC-FMUSP (HCnet).

Para a coleta de exames bioquímicos foram considerados apenas aqueles realizados em até 3 meses antes e 3 meses depois da data de coleta do sangue. Os pacientes que não tinham exames bioquímicos dentro deste prazo foram considerados sem exames. Para a biópsia hepática não houve limitação de data, sendo consideradas todas as biópsias existentes no sistema. Para os doadores de sangue, grupo 3, não foi possível obter os dados bioquímicos, pois não conseguimos acesso aos dados do banco de sangue do Hemocentro de São Paulo. Todos os diagnósticos referentes ao tipo de resposta virológica foram obtidos por meio da análise do prontuário dos pacientes e comparações de data das retiradas de medicamentos na farmácia do Hospital das Clínicas da FMUSP com PCR qualitativo.

Os pacientes do grupo 1, tratados com interferon e ribavirina, foram classificados e analisados de duas formas.

A primeira forma, os pacientes foram subdivididos em apenas dois grupos:

a) os que alcançaram a resposta virológica sustentada (RVS): após seis meses do término do tratamento o PCR quantitativo para o VHC estava negativo (-) quando em seu prontuário havia a inscrição “RVS”;

b) os pacientes que não alcançaram a resposta virológica sustentada (Não RVS), nas seguintes situações:

- ✓ os que não terminaram o tratamento por eventos adversos, suspensão da medicação por efeitos colaterais, suspensão da medicação por conta própria;
- ✓ os não respondedores;
- ✓ os que apresentaram recaída, quando ao término do tratamento o paciente apresentava PCR qualitativo indetectável (-), porém positivava antes de 6 meses;
- ✓ os não respondedores parciais, quando o PCR tornava-se indetectável durante o tratamento e ao fim deste estavam com PCR qualitativo positivo (+).

A segunda forma buscou analisar o grupo 1 de forma mais minuciosa, subdividindo os pacientes da seguinte forma:

a) com resposta virológica sustentada (RVS): após seis meses do término do tratamento o PCR quantitativo para o VHC continuava indetectável (-), ou quando em seu prontuário havia a inscrição “RVS”;

b) Recaída (Recaída): quando ao término do tratamento o paciente apresentava PCR qualitativo indetectável (-), porém aos 6 meses pós tratamento o PCR positivava;

c) Não respondedor (NR): quando ao término do tratamento estavam com PCR qualitativo positivo (+);

d) Não respondedor parcial: quando o indivíduo que apresenta PCR negativo durante o tratamento e positiva antes do término do tratamento;

e) Tratamento incompleto por efeitos colaterais: quando em prontuário constava tratamento interrompido por efeitos colaterais;

f) Tratamento incompleto: quando no prontuário constava que o paciente parou a medicação por conta própria.

4.6. Processamento das amostras

Foram coletadas amostras de sangue em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

As amostras foram centrifugadas a 13.000g por 10 minutos à temperatura ambiente e separadas em creme leucocitário e plasma, em seguida, foram estocadas em microtubos de 1,5 mililitros (mL) (Axygen®, CA, EUA) em freezer -20°C até o momento da extração do DNA genômico.

Como o objetivo de manter a confidencialidade das amostras e dos dados, tanto os casos como os controles foram codificados. Os casos foram identificados com a sigla BR, seguida do número da amostra. Os controles foram identificados com a sigla BRC, seguida do número da amostra.

4.7. Extração do DNA

O DNA genômico foi isolado a partir de leucócitos utilizando o Kit *QIAmp® DNA Blood mini kit* (Qiagen®, Hilden, Alemanha), de acordo com instruções do fabricante que estão descritas a seguir.

Foram adicionados 200 µL de creme leucocitário equilibrado em temperatura ambiente a um microtubo de 1,5 mL contendo 20 µL de proteinase K e 200 µL de buffer AL, essa solução foi homogeneizada por agitação em Vortex (Vortexgenie®, Bohemia, EUA) por 15 segundos e incubados a 56° C por 10 minutos.

Após breve centrifugação (centrífuga Eppendorf® modelo 5415R, Hamburgo, Alemanha), foram adicionados 200 µL de etanol 100% à amostra e homogeneizado por agitação. Novamente, após breve centrifugação, essa

solução foi transferida para uma coluna contendo sílica e centrifugada por 1 minuto a 5.900 *g*.

O tubo coletor foi descartado em local apropriado. A coluna contendo DNA genômico fixado foi transferida para um novo tubo coletor de 2 mL. Foram adicionados 500 µL de buffer AW1 e centrifugado a 5.900 *g*, novamente por 1 minuto. Foram adicionados 500 µL de buffer AW2 e então centrifugado a 11.000 *g* por 3 minutos. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, estéril, e então adicionados 200 µL de buffer AE a esta. Por fim, a amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugada a 5.900 *g* por 3 min. O resultado da extração de DNA_g foi analisado por eletroforese em gel de agarose e a quantificação das amostras realizada através de comparação da intensidade das bandas com o marcador de peso molecular “DNA Low mass ladder” (Invitrogen[®], Carlsbad, CA) corados com brometo de etídio. Técnica já descrita por Nogueira e cols. (2009)^[120].

4.8. Amplificação do fragmento por PCR Convencional

A técnica de PCR (do inglês - *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase) foi realizada, tendo como fita molde o DNA genômico extraído anteriormente.

Foram empregados iniciadores (Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) correspondentes à região próxima ao gene da IL28B, para amplificação de um segmento de 400 pares de base (pb) (figura 9) tanto para a PCR quanto para o sequenciamento: Iniciador direto F1: 5' GAC GAG AGG GCG TTA GAG CG 3' e Iniciador reverso R2: 5' ATT GAC CCT GAG CCT GCG TT 3'.

Figura 9 - Distância dos iniciadores em relação ao SNP

Os iniciadores foram desenhados a partir da sequência completa do cromossomo 19, clone CTC-246B18, depositada no genbank sob código nº AC011445 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/10799390>), conforme figura 10.

Figura 10—Iniciadores da PCR convencional. Próxima a região promotora do gene IL28B. Iniciadores e SNP destacados, em amarelo e vermelho, respectivamente

Para as reações foi utilizado o termociclador Mastercycler Eppendorf (Eppendorf® Hamburgo, Alemanha).

Condições suficientes para uma reação: 1,2 U de Taq Gold (Applied Biosystem®, EUA); 10 pmolar de iniciadores direto e reverso; 10 pmolar de dNTP (Invitrogen®, Carlsbad, EUA); 1,5 mM de MgCl₂; Tampão 1X; água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para completar 50 uL finais. As seguintes condições foram empregadas para ciclagem:

- 95° C - 5 minutos. Pré-aquecimento da enzima;
 - 95° C - 30 segundos
 - 62° C - 1 minuto
 - 72° C - 1 minuto
- } 40 ciclos

Os produtos de PCR foram estocados a -20°C até o momento da realização do gel de agarose.

4.9. Purificação do fragmento de PCR convencional

Foi utilizado o *kit QIAquick PCR purification kit* (Qiagen®, Valencia, CA). Foram adicionados ao produto de PCR, 225 µL da solução PB. Essa mistura foi então colocada em uma coluna à base de sílica e centrifugada por 1 minuto a 11.000 g em temperatura ambiente. O que se passou para o tubo coletor foi descartado, em local apropriado, e a coluna foi novamente encaixada no tubo coletor. Em seguida, foram aplicados 750 µL da solução PE no centro da coluna e essa mistura centrifugada a 11.000 g por 1 minuto. O que passou pela coluna foi novamente descartado e a coluna colocada em um microtubo estéril de 1,5 mL, devidamente identificado com a codificação da amostra.

Foram adicionados à coluna 40 µL de solução EB (*Elution Buffer*, 10mM Tris-Cl, pH 8,5). Essa mistura foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 11.000 g por 3 minutos. A solução EB deslocou os fragmentos de PCR que estavam na coluna que então ficou ressuspenso na solução de EB. A amostra purificada foi armazenada em freezer -20°C até o momento da reação de sequenciamento.

4.10. Eletroforese

A eletroforese foi usada para a quantificação do DNA genômico, análise do PCR convencional, análise da reação de CTPP e quantificação do produto de PCR purificado.

Foi utilizado cuba de eletroforese horizontal 12,5 cm X 12 cm (Digel, Brasil) e gel de agarose 1,5% (peso/volume) (Invitrogen®, Carlsbad, EUA) para o PCR convencional e 2% para o CTPP, em tampão TBE 10X (tris 108 gramas; 40 mL de EDTA 0,5 M e ácido bórico 55 gramas e H₂O em quantidade suficiente para 1000 mL).

Os géis da PCR convencional foram realizados utilizando 5 µL do produto de PCR, com 1 µL de Blue Juice 10X (Invitrogen®, Carlsbad, EUA) e os géis do CTPP foram realizados utilizando 10 µL do produto da reação, com 1 µL de Blue Juice 10X. As corridas foram realizadas sob uma tensão de 10 V/cm. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio (EtBr) e fotografado com uma câmera fotográfica Olympus C 4000 (Olympus®, Tóquio, Japão) sob luz Ultra Violeta.

O marcador de peso molecular *Low DNA mass ladder* (Invitrogen®, Carlsbad, EUA) foi empregado para a avaliação e quantificação da extração do DNA genômico e do DNA purificado. Para a análise do fragmento de PCR convencional e CTPP, foi utilizado o marcador de 100bp *DNA mass ladder* (Invitrogen®, Carlsbad, EUA).

4.11. Reação de Sequenciamento

Aproximadamente 40 a 50 ng da amostra purificada foi submetida a uma reação de sequenciamento utilizando-se 1,5µl kit Big Dye sequencing v3.1 (Applied Biosystems®), 3,2 picomols de iniciador Direto e Reverso, 3 microlitros de buffer Save money sequencing kit e água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para 10 µl. Realizado no termociclador Mastercycler Eppendorf nas seguintes condições de ciclagem:

95° C - 20''	} 25 ciclos
50° C - 15''	
60° C - 3'	

4.12. Purificação do sequenciamento

Os produtos da reação de sequenciamento foram purificados por método *in house* de precipitação com isopropanol. As reações foram precipitadas com 40 µL de isopropanol a 65 % e submetidas à centrifugação (Eppendorf® modelo 5804R) por 1.500 *g* por 60 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado com 150µL de etanol a 65 % e centrifugado novamente nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o precipitado encubado a 55° C por aproximadamente 40 minutos no termociclador Mastercycler Eppendorf®.

Após a precipitação, as reações de sequenciamento devidamente secas foram ressuspensas em 10 µL de HI-Dltn Formamida (Applied Biosystems®, EUA).

4.13. Sequenciamento dos produtos purificados

As amostras foram aplicadas no sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystem®, Foster City, CA), automático utilizado em parceria com o Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática, LEMB do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo.

As sequências obtidas foram comparadas e analisadas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor^{®[121]} e Codoncode[®] (Codoncode Corporation, versão 1.6.3). O programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), também, foi utilizado para pesquisa em banco de dados ^[122].

4.14. Confronto de dois pares de iniciadores (CTPP)

A amostra de DNAg foi submetida à reação de PCR *multiplex* (CTPP - *confronting two-pair primers* – confronto de dois pares de iniciadores), que tem por princípio o desenho de um par de iniciadores para cada alelo.

Para o primeiro par de iniciadores a base 3' do iniciador reverso(R1) é complementar a base citocina (C) e portanto somente amplifica o genótipo C, gerando um fragmento de 312bp, com o iniciador F1. Para o outro par de iniciadores a base 3' do iniciador direto (F2) é complementar a base timina (T) e portanto somente amplifica o genótipo T, gerando um fragmento de 128bp, com o iniciador R2. Um fragmento de 400bp é gerado pelos iniciadores F1 e R2, sendo este fragmento comum para todas as reações, podendo este ser considerado um controle positivo da reação. (figura 11).

Figura 11 – Princípio da reação de CTPP. A - Em vermelho, iniciadores que irão amplificar fragmentos de 312pb, correspondente ao alelo C. Em azul, iniciadores que irão amplificar fragmentos de 128pb, correspondente ao alelo T. Em lilás, fragmento gerado pelos iniciadores F1 e R2. B – Representação gráfica do resultado esperado no gel de eletroforese.

Os iniciadores foram desenhados com base na mesma sequência do PCR convencional, utilizando os iniciadores pré-estabelecidos, F1 e R2, acrescentando apenas os iniciadores internos, o iniciador reverso 1 (R1): 5' CGA ACC AGG GTT GAA TTG CAC TCC 3' e o iniciador direto 2 (F2): 5' GAG CTC CCC GAA GGC GT 3', conforme apresentado na figura 12.

Figura 12 – Iniciadores da PCR CTPP. Os iniciadores F1 e R1, em azul, amplificam 312 pb, correspondente ao alelo C. Os iniciadores F2 e R2, em amarelo, amplificam 128 pb, correspondente ao alelo T. Os iniciadores F1 e R2 amplificam 400 pb, a partir de ambos os alelos.

Para as reações, foi utilizado o termociclador Mastercycler Eppendorf (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha). As condições suficientes estabelecidas para uma reação foram: 1,2 U de Taq Gold (Applied Biosystem, EUA); 5 pmolar dos iniciadores F1, F2 e R2; 7 pmolar do iniciador R1; 10 pmolar de dNTP (Invitrogen®, Carlsbad, EUA); 5 mM de MgCl₂; Tampão 5X; água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para completar 50 uL finais. Foram empregadas as seguintes condições para ciclagem:

- 95° C - 5 minutos. Pré-aquecimento da enzima;
 - 95° C - 30 segundos
 - 69,2° C - 1 minuto
 - 72° C - 3 minutos
- } 40 ciclos

A análise foi realizada em gel de agarose por meio da diferenciação dos tamanhos de fragmentos, sendo que o genótipo homozigoto C/C apresenta uma banda de 400pb e uma banda de 312pb, o genótipo homozigoto T/T apresenta uma banda de 400pb e uma banda de 128 pb e o genótipo heterozigoto apresenta os 3 tamanhos de banda.

Em todas as reações foram utilizados três controles positivos, sendo uma amostra de cada genótipo (C/C, C/T e T/T) pré genotipadas por sequenciamento.

Para garantir a confiabilidade da técnica de CTPP, as amostras com genótipos determinados por sequenciamento, foram novamente codificadas e genotipadas por PCR CTPP. Após a genotipagem os resultados foram confrontados.

4.15. PCR em Tempo Real

A amostra de DNAg foi submetida a uma reação de PCR em tempo real utilizando a metodologia *Taqman* (Applied Biosystems®). Em resumo, essa metodologia é baseada na atividade 5' nuclease da Taq polimerase que cliva uma sonda de hibridização fluorogênica duplamente marcada, durante a fase de extensão da PCR. Foram empregados iniciadores e sondas específicas (Applied Biosystem®, Foster City, CA), correspondentes à região próxima ao gene da IL28B, de acordo com metodologia descrita por Urban e cols. (2011)^[123]. Iniciador direto 5' GCCTGTCGTGTACTGAACCA 3', iniciador reverso 5' GCGCGGAGTGCAATTCAAC 3', sonda marcada com fluoróforo VIC, 5' TGGTTCGCGCCTTC 3', sonda marcada com fluoróforo FAM, 5' CTGGTTCACGCCTTC 3'. Para as reações, foi utilizado um sistema de PCR em tempo real 7300 (Applied Biosystem®, Foster City, CA). As condições suficientes empregadas para uma reação foram: 1pmolar dos iniciadores direto e reverso; 100nM de sondas marcadas com VIC e FAM; 30ng de DNAg e água MilliQ autoclavada em quantidade suficiente para completar 50 uL finais. As seguintes condições foram empregadas para ciclagem: 50°C por 2 min., 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 min. Em

todas as reações foram utilizados controles negativos e 3 controles positivos, sendo uma amostra de cada genótipo (C/C, C/T e T/T), pré genotipadas por sequenciamento. Cada amostra foi analisada em duplicata.

4.16. Análise estatística

Os dados coletados foram codificadas e digitadas em planilha de dados. As variáveis quantitativas foram expressas como médias e desvios-padrão. Foi utilizado o programa *Statistical Package for Social Sciences (SPSS® EUA)* nas análises estatísticas. Os valores calculados para o p foram bicaudados, sendo considerado estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

Foi utilizado o teste de Qui-quadrado para verificar associações dos grupos com relação ao sexo, idade, raças e genótipos. A comparação de média entre os grupos foi verificada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis seguido do teste *post-hoc* de Tamnhane. Para avaliar a associação dos genótipos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de post-Hoc de Tamhane, uma vez que a amostra não obedeceu os pressupostos de normalidade e homocedasticidade, necessários para a realização de testes paramétricos.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. Padronização da metodologia

5.1.1. Extração de DNA genômico

A concentração média de DNA genômico, obtido pelo método baseado em coluna em sílica foi de 100 ng/uL, quantificado pela comparação com o padrão de massa (Low Mass Ladder – Invitrogen, Carlsbad, California) figura 13.

Figura 13 - Extração de DNA genômico em gel de agarose 1,5%
M – Marcador Low mass DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA)

5.1.2. Análise da reação de PCR convencional

No gel de agarose, a presença do produto amplificado por PCR foi observado, formando um fragmento de 400 bp. Também foi verificada a presença de dímeros de iniciadores.

Em todas as reações, foi realizado um controle negativo (C-) que consistiu dos mesmos reagentes de um PCR normal, porém, sem a presença do DNA genômico(Figura 14).

Figura 14 - PCR da região próxima ao gene da IL28B. **Tamanho do fragmento:** 400 pb (seta). **M:** marcador 100 bp DNA mass ladder. (Invitrogen, Carlsbad, EUA). **C-:** controle negativo, Gel de agarose 1,5% (p/v).

Nota: Nos poços 9 e 10 as amostras não amplificaram.

5.1.3. Análise dos sequenciamento obtidos

Para o grupo 1 foram realizadas 246 genotipagens por sequenciamento, para o grupo 2 foram realizadas 138 genotipagens e para o grupo 3, 240 reações.

Os resultados dos sequenciamentos foram analisados visualmente utilizando o programa Bioedit e Codoncode (Codoncode Corporation), na posição 29249 do cromossomo 19, tendo como base a sequência do clone CTC-246B18, depositada no genbank sob código nº AC011445.

Foram encontrados o genótipo homozigoto C/C (figura 15), heterozigoto C/T (figura 16) e homozigoto T/T (figura 17).

Figura 15 - Genótipo homozigoto C/C. Seta indica onde pode ocorrer a transversão de C para T, sendo este pico único de C

Figura 16 – Genótipo heterozigoto C/T. Seta indica onde ocorre a transversão de C para T, tendo este um pico sobreposto ao outro

Figura 17 - Genótipo homozigoto T/T. Seta indica onde pode ocorrer a transversão de C para T, sendo este pico único de T

5.1.4. Análise da reação de CTPP

Para o grupo 1 foram realizadas 246 reações de CTPP, para o grupo 2 foram realizadas 138 reações e para o grupo 3, 240 reações.

A análise foi realizada em gel de agarose através da diferenciação dos tamanhos de fragmentos (figura 18) onde o genótipo homozigoto C/C

apresenta uma banda de 400pb e uma banda de 312pb, o genótipo homozigoto T/T apresenta uma banda de 400pb e uma banda de 128 pb e o genótipo heterozigoto apresenta os 3 tamanhos de banda.

Para todas as reações, foi utilizado um controle negativo (C-) e 3 controles positivos, que consiste em 1 amostra de cada genótipo, determinado por sequenciamento.

Figura 18 – Gel PCR CTPP. Gel de agarose 2,0% (p/v). Os poços 9,10 e 11 representam os controles positivos para os genótipos T/T, C/C e C/T respectivamente. As setas indicam o tamanho de cada fragmento amplificado de acordo com genótipo da amostra.

Nos testes de confiabilidade houve concordância de 100% entre o CTPP, PCR em tempo real e o sequenciamento.

5.1.5. Análise da reação de PCR em Tempo Real

Para o grupo 1 foram realizadas 51/246 reações de PCR em tempo Real, para o grupo 2 foram realizadas 15/138 reações e para o grupo 3 foram realizadas 10 reações de 240 amostras.

Foram encontrados os genótipos homozigoto C/C 21/76, heterozigoto C/T 46/76e homozigoto T/T 9/76.

A análise foi realizada sob a forma gráfica, sendo possível observar cada um dos alelos no eixo x e y.O genótipo C/C, representado pela cor azul, fica

mais próxima do eixo y, o genótipo T/T, representado pela cor vermelha, fica mais próxima do eixo x e o genótipo heterozigoto C/T fica no meio dos dois eixos. Os controles negativos e amostras que não amplificaram, ou seja, que a reação falhou ficam próximas ao ponto 0 do gráfico, conforme figura 19.

Figura 19—Representação gráfica da reação de PCR em tempo real. Os pontos azuis representam o genótipo C/C, os pontos Vermelhos representam o genótipo T/T, os pontos verdes representam o genótipo C/T e os pontos pretos os controles negativos e 1 amostra que não amplificou.

Para todas as reações foram realizadas em duplicata. Foram utilizados 3 controle negativos (C-) e 3 controles positivos, que consiste em 1 amostra de cada genótipo, determinado por sequenciamento.

Nos testes de confiabilidade houve concordância de 100% entre o PCR em tempo real, CTPP e o sequenciamento.

5.1.6. Custos para genotipagem do polimorfismo rs12979860

Este trabalho avaliou os custos diretos da genotipagem do polimorfismo rs12979860, comparando as técnicas de PCR *multiplex* CTPP,

sequenciamento direto e PCR em tempo real (amplamente utilizada para genotipagem de SNPs). Os custos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Custos diretos na genotipagem do polimorfismo rs12979860, pelas técnicas de sequenciamento, PCR CTPP e PCR em tempo real

Descrição das Etapas	Valores por reações					
	Sequenciamento		CTPP		PCR em tempo real	
	Valor Unitário	Tempo	Valor Unitário	Tempo	Valor Unitário	Tempo
Extração DNA genômico	R\$ 8,44	40	R\$ 8,44	40	R\$ 8,44	40
Gel de Agarose	R\$ 7,80	90	R\$ 7,80	90	R\$ 7,80	90
PCR*	R\$ 14,65	150	R\$ 15,00	210	R\$ 45,00	180
Gel de Agarose	R\$ 7,89	90	R\$ 7,99	120	**	**
Purificação	R\$ 7,20	30	**	**	**	**
Gel de Agorase	R\$ 7,80	90	**	**	**	**
Reação de Sequenciamento	R\$ 25,51***	180	**	**	**	**
Corrida Sequenciamento	R\$ 1,41	180	**	**	**	**
Micro tubos	R\$ 5,00	0	R\$ 4,00	0	R\$ 21,75	0
Luvras, <i>típs</i> , água, etc	R\$ 5,00	0	R\$ 4,00	0	R\$ 3,00	0
Total	R\$ 90,70	850	R\$ 47,23	460	R\$ 85,99	310

Fonte: Valores baseados nos orçamentos disponibilizados pelos referidos fornecedores (citados na metodologia) entre os meses de julho e outubro de 2011. (Reagentes cotados em Reais, considerar impostos Brasileiros).

*PCR convencional na genotipagem por sequenciamento, PCR multiplex para o CTPP e PCR em tempo real.

** Etapa não realizada nesta técnica.

Tempo: Minutos gastos para realização de cada etapa.

***O valor considera 2 reações direta e indireta.

Para permitir maior comparação entre as técnicas, na tabela 3 são citados os valores dos equipamentos utilizados na genotipagem deste trabalho.

Tabela 3 – Custos dos equipamentos utilizados nas técnicas de PCR CTPP, sequenciamento e PCR em tempo real

Equipamentos	Aparelhos por técnica		
	Sequenciamento	CTPP	PCR em Tempo Real
	Valor	Valor	Valor
Fluxo Laminar	R\$ 7.000,00	R\$ 7.000,00	R\$ 7.000,00
Cuba de Eletroforese	R\$ 835,00	R\$ 835,00	R\$ 835,00
Fotodocumentador	R\$ 16.000,00	R\$ 16.000,00	R\$ 16.000,00
Centrífuga de micro tubos	R\$ 4.155,00	R\$ 4.155,00	R\$ 4.155,00
Centrífuga de placa	R\$ 18.800,00	**	**
Termociclador	R\$ 30.715,00	R\$ 30.715,00	**
Real Time	**	**	R\$79.310,00
Sequenciador	R\$ 256.470,00	**	**
Total	R\$ 333.975,00	R\$ 58.705,00	R\$ 107.300,00

Fonte: Valores baseados nos orçamentos disponibilizados pelos referidos fornecedores (citados na metodologia).

Notas: 1) Valores cotados em Reais, (impostos Brasileiros incluídos); 2) Foi cotado os aparelhos utilizados na realização deste trabalho, considerando marcas e modelos; 3) Foi considerado os equipamentos utilizados em todas as etapas da genotipagem a partir do extração do DNA. 4) Os valores dos equipamentos, não considera fretes, instalação ou acessórios.

** Equipamento não utilizado nesta técnica.

5.2. Descrição individual dos grupos

5.2.1. Casos (grupo 1)

Foram coletados dados de 246 pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos e tratados no ambulatório de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP(HC-FMUSP), sendo 126 do sexo feminino (51%), com média de idade $53,98 \pm 13,21$ anos e 120 do sexo masculino (48%), com média de idade entre $50,86 \pm 13,23$ anos. A média de idade, para o grupo foi de $52,47 \pm 13,22$ anos.

O genótipo homozigoto C/C foi encontrado em 77/246 (31,3%) dos pacientes. O genótipo heterozigoto C/T foi encontrado em 123/246 (50%) e o genótipo homozigoto T/T encontrado em 46/246 (18,7%) dos pacientes, conforme tabela 4. Não houve associação entre sexo e o polimorfismo rs12979860.

Tabela 4-Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 1

rs12979860	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C/C	39 (31,0)	38 (31,7)	77 (31,3)
C/T	60 (47,6)	63 (52,5)	123 (50,0)
T/T	27 (21,4)	19 (15,8)	46 (18,7)
Total	126 (100)	120 (100)	246 (100)

($p=0,514$)

Quando avaliamos a frequência alélica, verificamos que o alelo C obteve uma frequência de 56,3% (277/492) e o alelo T uma frequência de 43,7% (215/492) conforme tabela 5. Não houve associação entre o sexo e os alelos da mutação rs12979860 ($p = 0,228$).

Tabela 5 - Frequência dos alelos C e T em relação ao sexo

Alelo	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C	138 (54,8)	139 (57,9)	277 (56,3)
T	114 (45,2)	101 (42,1)	215 (43,7)
Total	252 (100)	240 (100)	492 (100)

($p=0,228$)

A raça foi avaliada por meio de auto declaração utilizando-se a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)^[124]. O grupo foi dividido conforme se auto-declararam, durante entrevista, em brancos, pretos, pardos, amarelos e não declarados para os pacientes que negaram a informação ou ficaram confusos em relação à resposta. A tabela 6 apresenta os resultados encontrados.

Na população que se auto-declarou branco, vemos uma maior frequência para o genótipo C/T, 79/170 (46,5%), seguido do genótipo C/C, 62/170 (36,5%). Na população preta, verificamos uma maior frequência do genótipo C/T, 14/26 (53,8%) seguido do genótipo T/T, 8/26 (30,8%). Na população parda, houve uma predominância do alelo C/T, 27/45 (62,8%). Entretanto, não houve associação entre o polimorfismo rs12979860 e raça no grupo 1.

Tabela 6 - Frequência dos genótipos versus classificação de raça (grupo 1)

Genótipos	Branco (%)	Preto (%)	Pardo (%)	Amarelo (%)	Não declarado (%)	Total (%)
C/C	62 (36,5)	4 (15,4)	8 (18,6)	3 (60,0)	0	77 (31,3)
C/T	79 (46,5)	14 (53,8)	27 (62,8)	1 (20,0)	2 (100)	123 (50,0)
T/T	29 (17,1)	8 (30,8)	8 (18,6)	1 (20,0)	0	46 (18,7)
Total	170 (69,1)	26 (10,6)	45 (17,5)	5 (2,0)	2 (0,8)	246 (100)

(p=0,077)

O grupo 1 foi avaliado para o grau de fibrose, analisados conforme biópsia hepática. Na tabela 7 é possível verificar que a maioria dos pacientes tratados encontram-se entre o grau 3 e 4 de fibrose, 82/246 (33,33%), seguidos pelos pacientes com grau 2, 64/246 (26,02%). Não houve relação do polimorfismo rs12979860 com o grau de fibrose.

Tabela 7 – Frequência do genótipo rs12979860 com o grau de fibrose hepática

BX	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	Total (%)
Grau 0 e 1	13 (16,9)	19 (15,4)	12 (26,1)	44 (17,87)
Grau 2	20 (26,0)	30 (24,4)	14 (30,4)	64 (26,02)
Grau 3 e 4	27 (35,1)	40 (32,5)	15 (32,6)	82 (33,33)
CHC	3 (3,9)	1 (0,8)	1 (2,2)	5 (2,03)
BX não realizada	14 (18,2)	33 (26,8)	4 (7,8)	51 (20,74)
Total	77 (31,3)	123 (50,0)	46 (18,7)	246 (100)

BX: Biópsia hepática

(p=0,223)

Os genótipos do VHC foram agrupados conforme tabela 8. A frequência do genótipo 1 (não subgenotipado) foi de 23/246 (9,3%), para o genótipo 1a a frequência foi de 41/246 (16,7%), para o genótipo 1b a frequência foi de 74/246 (30,1%), para o genótipo 2 a frequência foi de 6/246 (2,4%), para o genótipo 3 a frequência foi de 56/246 (22,8%), para o genótipo 4 a frequência foi de 2/246 (0,8%) e 44/246 (17,9%) não realizou genotipagem para o VHC. Não foi encontrado os demais genótipos em nossa população. Não houve relação do polimorfismo rs12979860 com genótipo do vírus da hepatite C.

Tabela 8– Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação ao genótipo do VHC

genótipo VHC	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	Total (%)
Não realizado	15 (19,5)	18 (14,6)	11 (23,9)	44 (17,9)
1 (não subgenotipado)	5 (6,5)	16 (13,0)	2 (4,3)	23 (9,3)
1a	10 (13,0)	24 (19,5)	7 (15,2)	41 (16,7)
1b	21 (27,3)	37 (30,1)	16 (34,8)	74 (30,1)
2	1 (1,3)	3 (2,4)	2 (4,3)	6 (2,4)
3	24 (31,2)	24 (19,5)	8 (17,4)	56 (22,8)
4	1 (1,5)	1 (0,8)	0	2 (0,8)
5				
Total	77 (31,3)	123 (50,0)	46 (18,7)	246 (100)

($p = 0,407$)

5.2.1.1. Primeira análise do grupo 1 em relação à resposta ao tratamento

A relação dos genótipos do vírus da hepatite C com a resposta ao tratamento é apresentado na tabela 9. Os genótipos 1 (não subgenotipados, 1a e 1b) representam 57,32% da população, seguido pelo genótipo 3 com 22,76% da população.

Verificamos que o genótipo 3 está associado à resposta virológica sustentada, o genótipo 1 (não subgenotipado), genótipo 1a e 1b estão em maior frequência no grupo de pacientes não respondedores.

Tabela 9 – Relação do genótipo do VHC com a tipo de resposta ao tratamento da hepatite C

Genótipo VHC	RVS (%)	Não RVS (%)	Total (%)
Não realizado	5 (8,20)	35 (18,92)	40 (16,26)
1 (não subgenotipado)	2 (3,28)	23 (12,43)	25 (10,16)
1a	6 (9,83)	35 (18,92)	41 (16,67)
1b	19 (31,14)	56 (30,27)	75 (30,49)
2	3 (4,92)	4 (2,16)	7 (2,85)
3	25 (40,98)	31 (16,76)	56 (22,76)
4	1 (1,64)	1 (0,54)	2 (0,81)
Total	61 (24,8)	185 (75,2)	246 (100)

Nota: RVS – Resposta virológica sustentada; Não RVS – Pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada.

($p = 0,005$)

Quando analisamos o grau de fibrose com a resposta de tratamento verificamos que os pacientes com grau 0 e 1 de fibrose tem maior número de não resposta virológica 39/44 (88,64%). Os pacientes com grau 2 tem 23/64 (35,94%) de resposta virológica sustentada e 41/64 (64,06%) de não resposta virológica. Os pacientes com grau 3 e 4 de fibrose tem 21/82 (25,61%) de RVS e 61/82 (74,39%) de não RVS. Todos os pacientes com CHC 5/5 (100,0%) não tiveram RVS, conforme tabela 10.

Tabela 10 – Resposta ao tratamento em relação ao grau de fibrose

BX	RVS (%)	Não RVS (%)	Total (%)
Grau 0 e 1	5 (11,36)	39 (88,64)	44 (100)
Grau 2	23 (35,94)	41 (64,06)	64 (100)
Grau 3 e 4	21 (25,61)	61 (74,39)	82 (100)
CHC	0	5 (100)	5 (100)
BX não realizada	12 (23,53)	39 (76,47)	51 (100)
Total	61 (24,80)	185 (75,20)	246 (100)

Nota: RVS – Resposta virológica sustentada; Não RVS – Pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada.
($p=0,037$).

Quanto à frequência do polimorfismo rs12979869 em relação à resposta ao tratamento, os pacientes com resposta virológica sustentada apresentaram uma frequência de 33/61 (54,1%) para o genótipo C/C, de 21/61 (34,4%) para o genótipo C/T e 7/61 (11,5%) para o genótipo T/T.

Os pacientes não respondedores apresentaram uma frequência de 44/185 (23,8%) para o genótipo C/C, de 102/185 (55,1%) para o genótipo C/T e de 39/185 (21,1%) para o genótipo T/T.

Os não respondedores estão associados ao genótipo C/T ($p = 0,002$) e ao genótipo T/T ($p = 0,001$) quanto comparados com o grupo de RVS. Os genótipos C/T e T/T não apresentaram associação entre si, conforme tabela 11.

Tabela 11 – Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação à resposta ao tratamento

Genótipos	RVS (%)	Não RVS(%)	Total (%)
C/C	33 (54,1)	44 (23,8)	77 (31,3)
C/T	21 (34,4)	102 (55,1)	123 (50,0)
T/T	7 (11,5)	39 (21,1)	46 (18,7)
Total	61 (24,8)	185 (75,2)	246 (100)

Nota: RVS – Resposta virológica sustentada; Não RVS – Pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada.
($p < 0,001$)

Ao analisar a frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação à resposta ao tratamento notamos que o alelo C está associado à resposta virológica sustentada, conforme tabela 12.

O alelo C encontra-se presente em 87/122 (71,3%) dos pacientes com RVS e em 190/370 (51,4%) dos pacientes não respondedores. Já o alelo T encontra-se presente em 35/122 (28,7%) dos pacientes com RVS e em 180/370 (48,6%) dos pacientes não respondedores.

Tabela 12 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação à resposta ao tratamento

Alelo	RVS (%)	Não RVS(%)	Total (%)
C	87 (71,3)	190 (51,4)	277 (56,3)
T	35 (28,7)	180 (48,6)	215 (43,7)
Total	122 (24,8)	370 (75,2)	492 (100)

Nota: RVS – Resposta virológica sustentada; Não RVS – Pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada.
($p < 0,001$)

Analisando a idade dos pacientes e a resposta ao tratamento não encontramos associação no grupo 1. Os pacientes com resposta virológica sustentada encontram-se em maior grupo na faixa etária de 41 aos 50 anos com 21/61 (34,4%), seguidos da faixas etárias de 31 aos 40, 51 aos 60 e 61 aos 70 com 7/61 (11,5%). Os pacientes não respondedores encontraram-se em maior número na faixa etária de 51 aos 60 anos com 60/185 (32,4%), seguidos da faixa etária de 41 aos 50 com 49/185 (26,5%) e dos pacientes com 61 aos 70 anos com 44/185 (23,8%), conforme tabela 13.

Tabela 13 – Faixa etária em relação à resposta ao tratamento

Intervalos	RVS (%)	Não RVS (%)	Total (%)
18 aos 30	5 (8,2)	7 (3,8)	12 (4,9)
31 aos 40	7 (11,5)	15 (8,1)	22 (8,9)
41 aos 50	21 (34,4)	49 (26,5)	70 (28,5)
51 aos 60	7 (11,5)	60 (32,4)	81 (32,9)
61 aos 70	7 (11,5)	44 (23,8)	51 (20,7)
71 aos 80	0	9 (4,9)	9 (3,7)
81 aos 90	0	1 (0,5)	1 (0,4)
Total	61 (24,8)	185 (75,2)	246 (100)

Nota: RVS – Resposta virológica sustentada; ;Não RVS – Pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada.

($p=0,119$).

5.2.1.2. Segunda análise do grupo 1 em relação à resposta ao tratamento

Quando verificamos o grau de fibrose utilizando a resposta de tratamento, notamos que não há associação entre os parâmetros, conforme tabela 14. Os pacientes com resposta virológica sustentada tem maior frequência de grau 2, 23/61 (37,7%), seguidos do graus 3 e 4, 21/61 (34,4%). Os pacientes que tiveram recaída após o término do tratamento tem maior frequência de graus 3 e 4 de fibrose, 12/38 (31,6%), sendo que 8/38 (21,1%) não realizaram biópsia hepática. No grupo dos pacientes não respondedores houve uma maior homogeneidade quando ao grau de fibrose sendo que o graus 3 e 4 apresentaram uma frequência de 37/115 (32,2%), seguidos dos graus 0 e 1 e grau 2, ambos com 26/115 (22,6%), nesse grupo 22/115 (19,1%) não realizaram biópsia hepática. No grupo que apresentou efeitos colaterais os graus 3 e 4 tiveram uma frequência de 11/25 (44,0%), seguidos do grau 2 com 5/25 (20,0%) e 7/25 (28,0%) não realizaram biópsia.

Tabela 14 – Resposta ao tratamento em relação ao grau de fibrose

Genótipos	RVS (%)	Recaída (%)	NR (%)	Efeitos Colaterais (%)	NR Parcial (%)	Tratamento Incompleto (%)	Total (%)
Grau 0 e 1	5 (8,2)	9 (23,70)	26 (22,6)	2 (8,0)	0	0	44 (17,9)
Grau 2	23 (37,7)	8 (21,1)	26 (22,6)	5 (20,0)	2 (66,7)	1 (25,0)	64 (26,0)
Grau 3 e 4	21 (34,4)	12 (31,6)	37 (32,2)	11 (44,0)	1 (33,3)	1 (25,0)	82 (33,3)
CHC	0	1 (2,6)	4 (3,5)	0	0	1 (25,0)	5 (2,0)
BX não realizada	12 (19,7)	8 (21,1)	22 (19,1)	7 (28,0)	0	2 (50,0)	51 (20,7)
Total	61 (24,8)	38 (15,4)	115 (46,7)	25 (10,2)	3 (1,2)	4 (1,6)	246 (100)

Nota: RVS: Resposta virológica ao fim do tratamento com resposta virológica sustentada; NR: não respondedor.
($p=0,235$)

Quanto a frequência do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento, vemos que os pacientes com resposta virológica sustentada tem 33/61 (54,1%) de frequência para o genótipo C/C, 21/61 (34,4%) de frequência para o genótipo C/T e 7/61 (11,5%) de frequência para o genótipo T/T. Os pacientes negativos ao fim do tratamento, porém com recaída tem 12/38 (31,6%) de frequência para o genótipo C/C, 20/38 (52,6%) para o genótipo C/T e 6/38 (15,8%) para o genótipo T/T.

Os pacientes não respondedores tem 25/115 (21,7%) de frequência para o genótipo C/C, 64/115 (55,7%) para o genótipo C/T e 26/115 (22,6%) para o genótipo T/T. Os pacientes que apresentaram efeitos colaterais tem 3/25 (12,0%) de frequência para o genótipo C/C, 15/25 (60,0%) para o genótipo C/T e 7/25 (28,0%) para o genótipo T/T.

Os pacientes com *breakthoug* tiveram 1/3 (33,3%) de frequência para o genótipo C/C e 2/3 (66,7%) para o genótipo C/T. Os pacientes que não completaram o tratamento tiveram 3/4 (75,0%) de frequência para o genótipo C/C e 1/4 (25,0%) para o genótipo C/T. Há associação entre o genótipo C/C e a resposta virológica sustentada, conforme tabela 15.

Tabela 15 – Frequência do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento

Genótipos	RVS (%)	Recaída (%)	NR (%)	Efeitos Colaterais (%)	NR Parcial (%)	Tratamento Incompleto (%)	Total (%)
C/C	33 (54,1)	12 (31,6)	25 (21,7)	3 (12,0)	1 (33,3)	3 (75,0)	77 (31,3)
C/T	21 (34,4)	20 (52,6)	64 (55,7)	15 (60,0)	2 (66,7)	1 (25,0)	123 (50,0)
T/T	7 (11,5)	6 (15,8)	26 (22,6)	7 (28,0)	0	0	46 (18,7)
Total	61 (24,8)	38 (15,4)	115 (46,7)	25 (10,2)	3 (1,2)	4 (1,6)	246 (100)

Nota: RVS: Resposta virológica ao fim do tratamento com resposta virológica sustentada; NR: não respondedor

($p=0,001$).

Quando analisamos a frequência do alelo do polimorfismo rs12979860 com a resposta ao tratamento, verificamos que não há associação entre os parâmetros, conforme observado para tabela 16. Os pacientes com resposta virológica sustentada apresentam frequência de 87/127 (68,5%) para o alelo C e 35/127 (31,5%) de frequência para o alelo T. Os pacientes com recaída tem frequência de 44/76 (57,9%) para o alelo C e 32/76 (42,1%) para o alelo T. Os pacientes não respondedores tem frequência de 114/230 (49,6%) para o alelo C e 116/230 (50,4%) para o alelo T. Os pacientes que apresentaram efeitos colaterais tem frequência de 21/50 (42,0%) para o alelo C e 29/50 (58,0%) para o alelo T. Os pacientes não respondedores parciais tem frequência de 4/6 (66,7%) para o alelo C e 2/6 (33,3%) para o alelo T. Os pacientes que não completaram o tratamento tem frequência de 7/8 (87,5%) para o alelo C e 1/8 (12,5%) para o alelo T.

Tabela 16 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento

Genótipos	RVS (%)	Recaída (%)	NR (%)	Efeitos Colaterais (%)	NR Parcial (%)	Tratamento Incompleto (%)	Total (%)
C	87 (68,5)	44 (57,9)	114 (49,6)	21 (42,0)	4 (66,7)	7 (87,5)	277 (56,3)
T	35 (31,5)	32 (42,1)	116 (50,4)	29 (58,0)	2 (33,3)	1 (12,5)	215 (43,7)
Total	127 (24,8)	76 (15,4)	230 (46,7)	50 (10,2)	6 (1,2)	8 (1,6)	492 (100)

Nota: RVS: Resposta virológica ao fim do tratamento com resposta virológica sustentada; NR: não respondedor.

($p=0,999$)

5.2.2. Controle (grupo 2)

Foram coletados dados de 138 pacientes portadores de hepatite C crônica atendidos no ambulatório de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP(HC-FMUSP), sendo, 75 (54,3%) do sexo feminino, com média de idade $50,72 \pm 13,23$ anos e 63 (45,7%), do sexo masculino, com média de idade entre $50,91 \pm 13,19$ anos. A média de idade do grupo foi de $50,81 \pm 13,21$ anos.

O grupo 2 foi composto por pacientes virgens de tratamento e foram assim classificados quando não foram encontradas informações sobre uso de interferon e ribavirina em seus prontuários; pacientes assintomático sem critérios para o tratamento; contra-indicação em decorrência de transtornos mentais, co-infecções, hepatopatia descompensada, etc; e recusa do paciente ao tratamento.

O genótipo C/C foi encontrado em 41/138 (29,7%) dos portadores crônicos de hepatite C. O genótipo heterozigoto C/T foi encontrado em 71/138 (51,4%) e o genótipo T/T encontrado em 26/138 (18,8%), conforme tabela 17.

Tabela 17 -Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 2.

rs12979860	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C/C	22 (29,3)	19 (30,2)	41 (29,7)
C/T	35 (46,7)	36 (57,1)	71 (51,4)
T/T	18 (24,0)	8 (12,7)	26 (18,8)
Total	75 (54,3)	63 (45,7)	138 (100)

($p = 0,217$)

Ao analisarmos a frequência alélica do polimorfismo rs12979860 em relação a resposta ao tratamento, notamos que não há associação dos alelos com o polimorfismo, conforme tabela 18. O alelo C encontra-se presente em 153/276 (55,4%) dos pacientes. Já o alelo T encontra-se presente 123/276 (44,6%) dos pacientes.

Tabela 18 – Frequência alélica do polimorfismo rs129979860.

Alelo	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C	79 (51,6)	74 (59,5)	153 (55,4)
T	71 (48,4)	52 (40,5)	123 (44,6)
Total	150 (54,3)	126 (45,7)	276 (100)

($p=0,375$)

A raça foi avaliada igualmente ao grupo 1. Os pacientes que se auto-declararam brancos (81/138) (58,7%) tem 28/81 (34,6%) de frequência do genótipo C/C, 42/81 (51,9%) do genótipo C/T e 11/81 (13,6%) do genótipo T/T. Os pacientes pretos tem 1/18 (5,6%) de frequência para o polimorfismo C/C, 10/18 (55,6%) para o polimorfismo C/T e 7/18 (38,9%) para o polimorfismo T/T. Os pacientes auto-declarados pardos tem 10/35 (28,6%) de frequência para o genótipo C/C, 18/35 (51,4%) para o genótipo C/T e 7/35 (20,0%) para o genótipo T/T. O grupo 2 tem apenas dois pacientes auto-declarados amarelos sendo 1/2 (50,0%) do genótipo C/C e 1/2 (50,0%) para o genótipo C/T.

Apenas pacientes não souberam ou não declaram sua raça. Sendo 1/2 (50,0%) do genótipo C/C e 1/2 (50,0%) do genótipo T/T. Não houve associação entre o genótipo e o polimorfismo, conforme tabela 19.

Tabela 19 - Frequência dos genótipos versus classificação de raça

Genótipos	Branco (%)	Preto (%)	Pardo (%)	Amarelo (%)	Não declarado (%)	Total (%)
C/C	28 (34,6)	1 (5,6)	10 (28,6)	1 (50,0)	1 (50,0)	41 (29,7)
C/T	42 (51,9)	10 (55,6)	18 (51,4)	1 (50,0)	0	71 (51,4)
T/T	11 (13,6)	7 (38,9)	7 (20,0)	0	1 (50,0)	26 (18,8)
Total	81 (58,7)	18 (13,0)	35 (25,4)	2 (1,4)	2 (1,4)	138 (100)

($p=0,138$)

Para o grau de fibrose os pacientes foram divididos conforme grupo 1, conforme tabela 20. Grau 0 e 1 de fibrose estão em maior frequência no grupo de pacientes não tratados 58/138 (42,0%), seguidos por pacientes que não realizaram biópsia hepática 56/138 (40,6%). Não houve associação entre o grau de fibrose e o polimorfismo rs12979860.

Tabela 20 – Frequência do polimorfismo rs12979860 versus o grau de fibrose em biópsia hepática (grupo 2)

Biópsia	C/C	C/T	T/T	Total
Grau 0 e 1	15 (36,6)	28 (39,4)	15 (57,7)	58 (42,0)
Grau 2	2 (4,9)	3 (4,2)	1 (3,8)	6 (4,3)
Grau 3 e 4	5 (12,2)	8 (11,3)	0	13 (9,4)
CHC	1 (2,4)	2 (2,8)	2 (7,7)	5 (3,6)
BX não realizada	18 (43,9)	30 (42,3)	8 (30,8)	56 (40,6)
Total	41 (29,7)	71 (51,4)	26 (18,8)	138 (100)

(p=0,509)

A tabela 21 apresenta a frequência do polimorfismo rs12979860 em relação ao genótipo do vírus da hepatite C. O genótipo 1, não subgenotipados, 14/138 (10,1%) apresentou 4/41 (9,8%) de genótipo C/C, 7/71 (11,5%) do genótipo C/T e 3/26 (11,54%) genótipo T/T. O subgenótipo 1a, 24/138 (17,4%), apresentou 8/41 (19,5%) do genótipo C/C, 11/71 (15,5%) do genótipo C/T e 5/26 (19,2%) T/T. O subgenótipo 1b, 50/138 (36,2%), apresentou 14/41 (24,1%) do genótipo C/C, 25/71 (35,2%) do genótipo C/T e 11/26 (42,30%) do genótipo T/T. Apenas um paciente é genótipo 2, 1/138 (0,7%) e este é ao genótipo C/T. O genótipo 3, 21/138 (15,2%), apresentou 8/41 (19,5%) do genótipo C/C, 12/71 (16,9%) do genótipo C/T e 1/26 (3,8%) do genótipo T/T. O genótipo 4, 3/138 (2,2%) apresentou 1/41 (2,4%) do genótipo C/C e 2/71 (2,8%) do genótipo T/T.(p=0,509).O genótipo 5 não foi encontrado nessa população.

Tabela 21 – Frequência do polimorfismo rs12979860 versus o genótipo do vírus da hepatite C (grupo 2)

genótipo VHC	C/C	C/T	T/T	Total
Não realizado	6 (14,6)	13 (18,3)	6 (23,1)	25 (18,1)
1 (não subgenotipado)	4 (9,8)	7 (9,9)	3 (11,5)	14 (10,1)
1a	8 (19,5)	11 (15,5)	5 (19,2)	24 (17,4)
1b	14 (24,1)	25 (35,2)	11 (42,3)	50 (36,2)
2	0	1 (1,4)	0	1 (0,7)
3	8 (19,5)	12 (16,9)	1 (3,8)	21 (15,2)
4	1 (2,4)	2 (2,8)	0	3 (2,2)
5	0	0	0	0
Total	41 (29,7)	71 (51,4)	26 (18,8)	138 (100)

(p=0,925)

5.2.3. Controle (grupo 3)

Foram coletados dados de 240 doadores voluntários na Fundação Pró-sangue do Hospital das Clínicas da USP, sendo 98 (40,8%) do sexo feminino, com média de idade $33,04 \pm 10,85$ anos e 142 (59,2%) do sexo masculino, com média de idade $35,32 \pm 10,89$ anos. A média de idade do grupo foi de $34,40 \pm 10,89$ anos. O genótipo C/C foi encontrado em 105/240 (43,8%) dos doadores. O genótipo heterozigoto C/T foi encontrado em 100/240 (41,7%) e o genótipo T/T encontrado em 35/240 (14,6%) (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequência dos genótipos, C/C, C/T e T/T encontrados no Grupo 3

rs12979860	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C/C	41 (41,8)	64 (45,1)	105 (43,8)
C/T	40 (40,8)	60 (42,3)	100 (41,7)
T/T	17 (17,3)	18 (12,7)	35 (14,6)
Total	98 (40,8)	142 (59,2)	240 (100)

($p = 0,596$)

Foi realizada análise dos alelos em relação ao sexo. O alelo C apresentou uma frequência de 122/196 (62,2%) para o sexo feminino e 188/284 (66,2%) para o sexo masculino. O alelo T apresentou uma frequência de 74/196 (37,8%) para o sexo feminino e de 96/284 (33,8%) para o sexo masculino, conforme tabela 23. Não houve associação da frequência alélica com o sexo no grupo 3.

Tabela 23 - Frequência alélica em relação ao sexo

Alelo	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
C	122 (62,2)	188 (66,2)	310 (64,6)
T	74 (37,8)	96 (33,8)	170 (35,4)
Total	196 (40,8)	284 (59,2)	480 (100)

($p = 0,428$)

A raça foi avaliada conforme classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). O grupo foi dividido conforme se auto-

declararam em brancos, pretos, pardos, amarelos e não declarados para os doadores que negaram a informação ou ficaram confusos em relação à resposta. Os doadores auto-declarados brancos tiveram uma frequência de 73/154 (47,4%) para o genótipo C/C, 64/154 (41,6%) para o genótipo C/T e de 17/154 (11,0%) para o genótipo T/T. Os doadores auto-declarados pretos tiveram uma frequência de 13/35 (37,1%) para o genótipo C/C, 14/35 (40,0%) e 8/35 (22,9%) para o genótipo T/T.

Os doadores auto-declarados pardos tiveram uma frequência de 14/43 (32,6%) para o genótipo C/C, 20/43 (46,5%) para o genótipo C/T e de 9/43 (20,9%) para o genótipo T/T.

Apenas 4 doadores são da raça amarela sendo estes genótipo C/C.

Dos doadores que não declararam sua raça 1/4 (25,0%) é genótipo C/C, 2/4 (50,0%) são genótipo C/T e 1/4 (25,0%) genótipo T/T.

Não houve associação da raça com o genótipo do polimorfismo rs12979860, conforme tabela 24.

Tabela 24 – Frequência dos genótipos versus classificação de raça (grupo3)

Genótipos	Branco (%)	Preto (%)	Pardo (%)	Amarelo (%)	Não declarado (%)	Total (%)
C/C	73 (47,4)	13 (37,1)	14 (32,6)	4 (100)	1 (25,0)	105 (43,8)
C/T	64 (41,6)	14 (40,0)	20 (46,5)	0	2 (50,0)	100 (41,7)
T/T	17 (11,0)	8 (22,9)	9 (20,9)	0	1 (25,0)	35 (14,6)
Total	154 (64,2)	35 (14,6)	43 (17,9)	4 (1,7)	4 (1,7)	240 (100)

($p=0,138$)

5.3. Comparação dos grupos

Há relação entre genótipo e os grupos, conforme resultados descritos na tabela 25. No grupo de portadores de hepatite C crônicos, tratados com interferon e ribavirina (grupo 1) vemos uma frequência de 77/246 (31,3%) do genótipo C/C, 123/246 (50,0%) do genótipo C/T e 46/246 (18,7%) do genótipo T/T. No grupo de portadores de hepatite C crônicos e virgens de tratamento (grupo 2) verificamos uma frequência de 41/138 (29,7%) do genótipo C/C, 71/138 (51,4%) do genótipo C/T e 26/138 (18,8%) do genótipo T/T.

No grupo de doadores de sangue verificamos uma frequência de 105/240 (43,8%) do genótipo C/C, 100/240 (41,7%) do genótipo C/T e 35/240 (14,6%) do genótipo T/T.

O grupo 1 tem maior frequência do genótipo C/T ($p = 0,002$) e do genótipo T/T ($p=0,002$) quando comparado com grupo 3. Comparando os grupos, verificamos que o grupo 2 também tem maior frequência do genótipo C/T ($p = 0,029$) e do genótipo T/T ($p = 0,005$) quando comparado com o grupo 3. O grupo 1 e 2 não têm associação entre si.

Tabela 25 – Frequência do polimorfismo rs12979860 entre os grupos

Genótipo	Hepatite C com medicação	Hepatite C sem medicação	Doadores de sangue	Total
C/C	77 (31,3)	41 (29,7)	105 (43,8)	223 (35,7)
C/T	123 (50,0)	71 (51,4)	100 (41,7)	294 (47,1)
T/T	46 (18,7)	26 (18,8)	35 (14,6)	107 (17,1)
Total	246 (39,4)	138 (22,1)	240 (38,5)	624 (100)

($p = 0,026$).

Ao analisar a frequência alélica do polimorfismo vemos que o grupo 1 tem 277/492 (56,3%) do alelo C e 215/492 (43,7%) do alelo T.

O grupo 2 apresenta uma frequência de 153/276 (55,4%) para o alelo C e de 123/276 (44,6%) para o alelo T.

O grupo 3 apresenta uma frequência de 310/480 (64,6%) para o alelo C e 170/480 (35,4%) para o alelo T.

O alelo C está mais frequente no grupo de doadores de sangue, quando comparado aos grupos de pacientes com hepatite C crônica, conforme resultados da tabela 26, porém não há associação entre os grupos e a frequência alélica.

Tabela 26 – Frequência alélica do polimorfismo rs12979860 entre os grupos 1,2 e 3

Genótipo	Hepatite C com medicação	Hepatite C sem medicação	Doadores de sangue	Total
C	277 (56,3)	153 (55,4)	310 (64,6)	740 (59,3)
T	215(43,7)	123(44,6)	170 (35,4)	508 (40,7)
Total	492 (39,4)	276 (22,1)	480 (38,5)	1248 (100)

($p= 0,995$)

Para analisar a distribuição da raça entre os grupos, analisamos os genótipos separadamente. Nos pacientes portadores de hepatite C tratados (grupo 1) e com genótipo C/C a raça branca tem frequência de 62/77 (80,5%), a raça preta tem frequência de 4/77 (5,2%), a raça parda tem frequência de 8/77 (10,4%) e a raça amarelo 3/77 (3,9%). Nos pacientes portadores de hepatite C virgens de tratamento (grupo 2) genótipo C/C, a raça branca mostrou uma frequência 28/41 (68,3%), a raça preta tem frequência de 1/41 (2,4%), a raça parda tem 10/41 (24,4%), a raça amarela tem 1/41 (2,4%). Nos doadores de sangue (grupo 3) com o genótipo C/C, a raça branca apresentou uma frequência de 73/105 (69,5%), a raça preta uma frequência de 13/105 (12,4%), a raça parda 14/105 (13,3%) e a raça amarela uma frequência de 4/105 (3,8%). Não houve associação das raças com os grupos nos pacientes e doadores com genótipo C/C, conforme tabela 27.

Tabela 27 – Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo C/C

Raça	Hepatite C com medicação (%)	Hepatite C sem medicação (%)	Doadores de sangue (%)	Total
Branco	62 (80,5)	28 (68,3)	73 (69,5)	163 (73,1)
Preto	4 (5,2)	1 (2,4)	13 (12,4)	18 (8,1)
Pardo	8 (10,4)	10 (24,4)	14 (13,3)	32 (14,3)
Amarelo	3 (3,9)	1 (2,4)	4 (3,8)	8 (3,6)
Não declarado	0	1 (2,4)	1 (1,0)	2 (0,9)
Total	77 (34,5)	41 (18,4)	105 (47,1)	223 (100)

(p=0,176)

Nos pacientes portadores de hepatite C tratados (grupo 1) e com genótipo C/T a raça branca tem frequência de 79/123 (64,2%), a raça preta tem frequência de 14/123 (11,4%), a raça parda tem frequência de 27/123 (22,0%) e a raça amarelo 1/123 (0,8%). Nos pacientes portadores de hepatite C virgens de tratamento (grupo 2) genótipo C/T, a raça branca mostrou uma frequência 42/71 (59,2%), a raça preta tem frequência de 10/71 (26,3%), a raça parda tem 18/71 (25,4%) e a raça amarela tem 1/71 (1,4%). Os doadores de sangue (grupo 3) genótipo C/T, a raça branca apresentou uma frequência de 64/100 (64,0%), a raça preta uma frequência de 14/100 (14,0%), a raça parda 20/100

(20,0%) e a raça amarela não teve representação neste grupo. Não houve associação das raças com os grupos nos pacientes e doadores com genótipo C/T, conforme tabela 28.

Tabela 28 - Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo C/T

Raça	Hepatite C com medicação (%)	Hepatite C sem medicação (%)	Doadores de sangue (%)	Total
Branco	79 (64,2)	42 (59,2)	64 (64,0)	185 (62,9)
Preto	14 (11,4)	10 (26,3)	14 (14,0)	38 (12,9)
Pardo	27 (22,0)	18 (25,4)	20 (20,0)	65 (22,1)
Amarelo	1 (0,8)	1 (1,4)	0	2 (0,7)
Não declarado	2 (1,6)	0	2 (2,0)	4 (1,4)
Total	123 (41,8)	71 (24,1)	100 (34,0)	294 (100)

($p=0,880$)

Nos pacientes portadores de hepatite C tratados (grupo 1) e com genótipo T/T a raça branca tem frequência de 29/46 (63,0%), a raça preta tem frequência de 8/46 (17,4%), a raça parda tem frequência de 8/46 (17,4%) e a raça amarelo 1/46 (2,2%).

Nos pacientes portadores de hepatite C virgens de tratamento (grupo 2) genótipo T/T, a raça branca mostrou uma frequência 11/26 (42,3%), a raça preta tem frequência de 7/26 (26,9%), e a raça parda tem 7/26 (26,9%).

Os doadores de sangue (grupo 3) genótipo T/T, a raça branca apresentou uma frequência de 17/35 (48,3%), a raça preta uma frequência de 8/35 (22,9%), a raça parda 9/35 (25,7%) e a raça amarela não teve representação neste grupo. Não houve associação das raças com os grupos nos pacientes e doadores com genótipo T/T, conforme tabela 29.

Tabela 29 - Comparação entre os grupos versus raça para o genótipo T/T

Raça	Hepatite C com medicação (%)	Hepatite C sem medicação (%)	Doadores de sangue (%)	Total
Branco	29 (63,0)	11 (42,3)	17 (48,3)	57 (53,3)
Preto	8 (17,4)	7 (26,9)	8 (22,9)	23 (21,5)
Pardo	8 (17,4)	7 (26,9)	9 (25,7)	24 (22,4)
Amarelo	1 (2,2)	0	0	1 (0,9)
Não declarado	0	1 (3,8)	1 (2,9)	2 (1,9)
Total	46 (43,0)	26 (24,3)	35 (32,7)	107 (100)

(p=0,632)

Quanto analisamos o grau de fibrose em relação aos grupos vemos uma associação entre grau de fibrose e o grupo 1 e 2, conforme descrito na tabela 30. O grupo 1 está associado aos graus 2, 64/246 (26,0%), e aos graus 3 e 4, 82/246 (33,3%), quando comparados ao grupo 2, pacientes virgens de tratamento. O grupo 2, virgens de tratamento está associado aos graus 0 e 1, 58/138 (42,0%) e aos pacientes que não realizaram BX, 56/138 (40,6%).

Os pacientes com CHC não se associaram aos grupos.

Tabela 30 – Grau de fibrose dos grupos 1 e 2

Grau de Fibrose	Hepatite C com medicação (%)	Hepatite C sem medicação (%)	Total
0 e 1	44 (17,9)	58 (42,0)	102 (26,6)
2	64 (26,0)	6 (4,3)	70 (18,2)
3 e 4	82 (33,3)	13 (9,4)	95 (24,7)
CHC	5 (2,0)	5 (3,6)	10 (2,6)
BX não realizada	51 (20,7)	56 (40,6)	107 (27,9)
Total	246 (64,1)	138 (35,9)	384 (100)

(p< 0,001)

DISCUSSÃO

6. Discussão

Nosso estudo, por ser retrospectivo, possibilitou observar o tratamento da hepatite crônica C realizado no Serviço de Gastroenterologia Clínica do HC-FMUSP nos últimos 15 anos, tanto com interferon convencional como interferon peguilado. Mas ressalta-se que alguns pacientes foram excluídos por falta de informações, limitando o número dos casos.

A infecção pelo vírus da hepatite C está associada a morbidade, mortalidade e grande impacto econômico, não só no Brasil, mas em todo mundo.

Quando os pacientes recebem terapia com Interferon e Ribavirina nem sempre a resposta virológica sustentada é alcançada.

Recentemente os inibidores da protease, boceprevir e telaprevir, foram aprovados e inseridos na conduta de tratamento, disponível no relatório de recomendação da comissão nacional de incorporação de tecnologia no SUS – CONITEC – 01 de julho 2012^[125]. Embora extremamente eficaz, as terapias recentemente aprovados são também acompanhados por efeitos secundários e custos adicionais consideráveis no orçamento público. Entender o equilíbrio entre custos e efetividade é fundamental para a tomada de decisões sobre a melhor utilização desses novos agentes, especialmente para os sistemas de saúde limitados pelo aumento de custos.

O polimorfismo rs12979860 tem sido amplamente estudado em todo o mundo. Diversos estudos demonstraram grande associação entre a resposta ao tratamento e o genótipo da IL28B ^[10,11,106,117].

O Projeto Genoma Humano (PGH) permitiu diversas discussões desde 1991^[126,127,128]. Entre seus objetivos o PGH, buscou a melhoria e simplificação dos métodos de diagnóstico de doenças genéticas, otimização das terapêuticas e prevenção de doenças multifatoriais. Nesse sentido Brockett e Tankersley (1997) alertam que os cientistas deveriam imaginar as consequências morais da aplicação comercial de testes genéticos^[129].

Analisar o genoma completo do indivíduo ainda não é uma conduta de rotina na prática clínica, mas as análises de polimorfismos têm se tornado cada

vez mais importante na prática para o diagnóstico, acompanhamento e tratamento de doenças.

Vendo a importância da genotipagem do polimorfismo rs12979860 não só no acompanhamento do paciente com hepatite C crônica, mas também para melhor condução do tratamento, nosso trabalho buscou desenvolver uma técnica para genotipagem mais rápida e com baixo custo, cumprindo com nossa responsabilidade científica para o desenvolvimento da tecnologia e pesquisa em nosso país.

A técnica de CTPP foi apresentada por Hamajima e colaboradores em 2000, com propósito de ser mais simples que o PCR-RFLP, porém mantendo o baixo custo ^[130]. Nosso trabalho adaptou e padronizou a técnica com sucesso para o SNP rs12979860, mostrado na figura 20. O PCR *multiplex*, oferece um método rápido, eficaz e com baixo custo, sendo uma alternativa conveniente para a genotipagem da IL28B.

Todas as amostras foram genotipadas por PCR CTPP e confirmadas por sequenciamento direto. Como a técnica de PCR em tempo real é amplamente utilizada nos laboratórios internacionais, genotipamos uma pequena parcela das amostras para comparação de custo e tempo de realização.

Em nosso estudo, além da comparação entre a técnica de CTPP com sequenciamento e PCR em tempo real, que apresentou 100% de especificidade e sensibilidade, foi demonstrado também que o custo direto entre as metodologias é discrepante, sendo o CTPP mais vantajoso para ser utilizado em grandes rotinas.

Analizamos somente o custo direto dos reagentes, pois o cálculo de custos indiretos tornou-se inviável por se tratar de um laboratório de pesquisa, entretanto se tivéssemos considerado o custo dos equipamentos, manutenção e mão de obra a diferença entre os custos das metodologias seria ainda mais discrepante, considerando que a técnica de PCR CTPP utiliza apenas um termociclador e um conjunto de eletroforese, depois do DNAg extraído.

Na tabela 19 apresentamos os valores dos equipamentos utilizados neste trabalho. E apesar de citar o valor bruto, desconsiderando o valor de

frete, acessórios e instalação, é possível notar a grande diferença de custo entre os equipamentos.

Devemos lembrar também que a manutenção de um termociclador é mais acessível e barata que de um sequenciador, que precisa ter os capilares trocados periodicamente, e no caso de um aparelho de PCR em tempo real, este deve ser calibrado de 6 em 6 meses.

Dessa forma observamos que a PCR CTPP permite a inserção da genotipagem, no setor público, a um baixo custo, acrescentando uma informação para tomada de decisão na terapêutica, podendo contribuir assim com a diminuição dos custos do tratamento de maneira geral.

O ônus econômico, do tratamento para a hepatite C crônica, se estende além dos custos com medicamentos, médicos e profissionais relacionados. Se incluirmos os custos com tratamento dos efeitos colaterais e cuidados da enfermagem, o custo do tratamento pode aumentar significativamente.

Em relação aos grupos estudados, a frequência do alelo C encontrada na população de pacientes com hepatite crônica C tratados com interferon foi de 56,3% (Tabela 5). Na população de pacientes com hepatite crônica C, virgens de tratamento foi de 55,4% (Tabela 18). Na população de doadores, a frequência do alelo C verificada foi de 64,6% (Tabela 23).

Quando analisamos a frequência alélica observamos que o alelo C é mais frequente no grupo de doadores de sangue ($p = 0,995$), e apesar de não ter significância estatística (tabela 27), observamos que nossa metodologia excluiu os possíveis clareadores virais, pois a população doadora de sangue possui maior frequência do alelo C.

Quando analisamos a frequência genotípica entre os grupos (tabela 26), notamos que o genótipo C/T e T/T estão associados aos grupos 1 e 2, pacientes com hepatite C crônica tratados com interferon e virgens de tratamento, respectivamente, em relação ao grupo de doadores de sangue. O que está de acordo com o trabalho de Ge e colaboradores (2009)^[11] que mostra claramente o fator protetor que o alelo C exerce em relação à hepatite C, levando ao clareamento viral espontâneo. Na nossa metodologia a

frequência do alelo C no grupo 1 e 2 foi menor por serem uma população crônica, desta forma excluindo os possíveis clareadores espontâneos.

Os resultados encontrados na população de pacientes com hepatite C crônica, tratados com interferon foi de 31,3% para o genótipo C/C, 50,0% para o genótipo C/T e 18,7% para o genótipo T/T (tabela 4). Na população de pacientes com hepatite C crônica, virgens de tratamento foi de 29,7% para o genótipo C/C, de 51,4% para o genótipo C/T e de 18,8% para o genótipo T/T (tabela 17). Na população de doadores a frequência foi de 43,8% para o genótipo C/C, de 41,7% para o genótipo C/T e de 14,6% para o genótipo T/T (tabela 22).

Os resultados encontrados, em relação à frequência genotípica, corroboram com os encontrados na literatura para o genótipo C/C que variou de 29,8% a 49% e para o genótipo C/T que variou de 44% a 72%. O genótipo T/T foi encontrado na literatura com uma variação de 5,3% a 79,2%, de frequência na população caucasiana e de descendentes africanos, respectivamente^[10,11,13,119,131].

Pena e colaboradores (2011) relatam uma predominância europeia na população brasileira, com proporções que variaram de 60,6% no nordeste a 77,7% no sul do país^[132]. Seus achados podem explicar a baixa frequência do genótipo T/T em nosso meio, sendo este mais frequente em africanos^[10].

No Brasil o grande problema dos estudos com polimorfismos, que possuam alguma relação com a raça, é a heterogeneidade que a população brasileira possui. Pena e colaboradores (2011) demonstram em seus trabalhos que o brasileiro é sempre uma mistura de europeu, africano e ameríndio^[132]. A grande questão é a porcentagem que cada indivíduo tem de cada etnia, sendo necessária uma complexa genotipagem para realizar tal discriminação. Pena relata que cada indivíduo brasileiro é sempre único, chegando ser impossível agrupar a etnia no Brasil, e que devemos não mais considerar o brasileiro com uma mistura de etnias e começar a considerar uma nova etnia.

Alguns trabalhos relatam uma relação da resposta ao tratamento com a etnia. Além disso, descendentes europeus respondem com mais frequência ao tratamento do que descendentes africanos^[133,134]. No trabalho de Thomas e

colaboradores (2009) existe uma relação da raça com o polimorfismo, onde a frequência do alelo C é maior em descendentes europeus do que em africanos^[10].

Em nosso trabalho utilizamos a metodologia do IBGE de auto-declaração, considerando a cor da pele, porém não achamos relação do polimorfismo rs12979860 com a raça em nenhum dos 3 grupos estudados (tabelas 5, 18 e 23). O que pode tanto ser erro na auto-declaração como a confirmação da teoria de Pena que o brasileiro necessita de uma classificação diferente da já utilizada.

No trabalho de Alves-Silva J e colaboradores (2000), é possível observar que o DNA mitocondrial tem maior porcentagem de ascendência africana e ameríndia^[135]. Já no trabalho de Carvalho-Silva e colaboradores (2001) observamos que as ascendências paternas provêm, com maior frequência do europeu (principalmente Portugêses)^[136]. Com base nesses trabalhos podíamos esperar uma relação do alelo C com o sexo masculino e do alelo T com o sexo feminino, entretanto em nosso estudo não houve relação do polimorfismo rs12979860 com o sexo nos 3 grupos estudados.

Até o ano de 2010 o genótipo do vírus da hepatite C era considerado o maior preditor de resposta pré-tratamento. Trabalhos como de Hadziyannis e cols. (2004)^[137] e McHutchison e cols. (1998)^[138] relatam que o genótipo 1, tem forte relação com a não resposta.

Em nosso trabalho verificamos uma maior frequência de pacientes não respondedores ($p = 0,005$) com genótipo 1 (que não temos informações do subgenótipo) e genótipo 1a, assim como o genótipo 3 está associado a resposta virológica sustentada, associação observada também por Poynard e cols., (1998)^[139], Manns e cols., (2001)^[140] e Fried e cols., (2002)^[141].

O genótipo 2, quase não encontrado em nossa população, de acordo com Fried (2002) tem uma relação com a melhor resposta ao tratamento da hepatite C. A frequência dos genótipos encontrados em nossos grupos, corroboram com as frequências descritos por Campiotto e cols., em 2005, na população brasileira^[142]. Os genótipos 6, 7, 8 e 9 não foram encontrados nesta amostra, como esperado.

Sendo 56,1% de nossos pacientes genótipo 1, foi esperado um grande número de não respondedores e uma maior frequência do alelo T em nosso meio.

Quando analisamos o grau de fibrose em relação à resposta ao tratamento observou-se um grande número de pacientes com grau 0 e 1 de fibrose que receberam tratamento. Este fato nos levou buscar informações mais precisas que justificariam o tratamento, uma vez que o protocolo clínico do Ministério da Saúde, atualmente, determina grau de fibrose maior ou igual a 2 como critério de inclusão.

Dos 44 pacientes grau 0 e 1 tratados, 19 receberam tratamento até o ano de 2002, quando então a portaria em vigor, nº 639 de 21 de julho de 2000, que também abrange as portarias SAS/MS nº 17, de 22 de janeiro de 1997 e GM/MS nº 1.464, de 22 de dezembro de 1999, determinava que para receber o tratamento com interferon e ribavirina um dos critérios seria, ter realizado, nos últimos 12 meses, biópsia hepática onde tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e/ou fibrose. Entretanto a portaria abria exceções para pacientes que tenha contra-indicações para a realização de biópsia hepática, podendo estes ser incluídos no protocolo sem evidências histológicas de lesão hepática.

A portaria nº 863, 4 de novembro de 2002, determinava como critério de inclusão, ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde tenha sido evidenciada atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir ou atividade portal ou peri-septal grau 2 da classificação da Sociedade Brasileira de Patologia) e/ou presença de fibrose de moderada a intensa (maior ou igual a F1 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia).

Dos 16 pacientes tratados entre 2002 e 2007, apenas 1 paciente é grau 0 de fibrose, sendo os 15 pacientes restantes, grau 1, pelas classificações da Sociedade Brasileira de Patologia, estando assim dentro dos critérios para com a portaria em vigor.

A portaria Nº 34, de 28 de Setembro de 2007, determinava como critério de inclusão, ter realizado, nos últimos 24 meses, biópsia hepática onde tenham

sido evidenciadas as seguintes características: a) Atividade necro-inflamatória de moderada a intensa (maior ou igual a A2 pela classificação Metavir ou atividade portal ou peri-septal grau 2 ou maior pela classificação da Sociedade Brasileira de Patologia) e; b) Presença de fibrose de moderada a intensa (maior ou igual a F2 pelas classificações Metavir ou Sociedade Brasileira de Patologia).

Dos 9 pacientes tratados sob critérios da portaria 34/2007, todos foram tratados com interferon peguilado e ribavirina, porém não analisamos todos os dados clínicos (manifestações extra-hepáticas do VHC), que poderiam justificar o tratamento.

Em nosso trabalho não foi encontrado associação do polimorfismo rs12979860 com taxas de progressão da fibrose, resultado também encontrado por Marabita e cols., em 2011^[143].

Os pacientes com hepatite C crônica, virgens de tratamento, tiveram uma menor proporção de fibrose graus 2, 3 e 4, em relação aos pacientes com hepatite C crônica tratados (tabela 31), que por sua vez tem menor proporção de, graus 0 e 1 de fibrose, critério de não tratamento pelo Ministério da Saúde.

Este trabalho, retrospectivo, selecionou os pacientes que já haviam recebido tratamento pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Esta abordagem selecionou os pacientes já triados quando aos critérios de exclusão e inclusão de acordo com a portaria vigente no momento do tratamento, portanto as variáveis quantitativas, como idade e dosagem do interferon peguilado de acordo com o peso do paciente, já haviam sido ajustadas a estes pacientes.

Quanto à relação do polimorfismo rs12979860 com a resposta ao tratamento da hepatite C com interferon, a literatura relata forte associação do alelo C com a resposta virológica sustenta^[10,11,13].

Atualmente as decisões de tratar ou não um paciente com hepatite C crônica, são baseados em dados clínicos, demográficos e características virológicas do paciente. Embora estes dados sejam de extrema importância, estas características, pré-tratamento, não são exatas, quando para prever a resposta ao tratamento, principalmente no genótipo 1, mais frequente no Brasil.

Esse trabalho confirma a associação do genótipo T/T com a não resposta ao tratamento padrão (interferon combinado a ribavirina), como foi observado por Ge e cols. (2009) e Thomaz e cols. (2009)^[10,11]. O genótipo T/T foi associado ($p = 0,002$) aos não respondedores.

A associação do tipo de resposta ao tratamento da hepatite C crônica com um único polimorfismo é uma descoberta surpreendente.

A genotipagem do polimorfismo rs12979860, usada em conjunto com os indicadores já utilizados, como o genótipo do VHC, grau de fibrose e idade pode fornecer poder discriminatório para identificar prováveis não respondedores ao tratamento.

No entanto, deve-se considerar que, apesar das complexas características de susceptibilidade mostradas pela hepatite C, esta doença, em sua maioria, não causa risco de morte imediata, podendo o paciente viver por mais de 30 anos de forma assintomática. Esta observação nos leva a pensar que não há uma intensa pressão seletiva sobre a doença, o que levanta várias questões biológicas que se relacionam com as propriedades antivirais e sua relação com o interferon. Portanto, a investigação de IL28B é de grande importância e deve continuar a ser amplamente realizada.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

No presente estudo foi possível concluir que:

- 1) O ensaio *multiplex* PCR CTPP, descrito neste trabalho, detecta em uma única reação os genótipos C/C, C/T, e T/T, do polimorfismo rs12979860.
- 2) O ensaio *multiplex* PCR CTPP permite a rápida genotipagem do polimorfismo rs12979860. É reprodutível em laboratórios com mínima estrutura e não necessita de equipamentos especiais e caros, tornando-se assim um procedimento relativamente barato e acessível. O método de PCR-CTPP pode ser usado em grande rotinas e também é adequado para a genotipagem de um pequeno número de amostras.
- 3) A frequência do polimorfismo rs12979860 nos portadores de hepatite C, acompanhados no hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, tratados e não tratados é de 30,73% (118/384) para o genótipo C/C, de 50,52% (194/384) para o genótipo C/T e de 18,75% (72/384) para o genótipo T/T.
- 4) Os pacientes não respondedores estão associados ao genótipo C/T ($p = 0,002$) e ao genótipo T/T ($p = 0,002$).

ANEXOS

8. Anexos

Anexo I – Documento de aprovação Cappesq.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/06/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0142/11**, intitulado: **"FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO NO GENE IL28B EM PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA E EM CONTROLES SADIOS"**, apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Sra. Suzane Kioko Ono-Nita**

Pesquisador (a) Executante: **Camila da Silva Ferreira**

Co-autores: **Paulo Dominguez Nasser, Msc. Marcelo M. Tavares de Souza, Msc. Helena Scavone Paschoale, Ana Maria da Silva Sousa, Rodrigo Abreu Martins, Prof. Dr. Flair José Carrilho.**

CAPPesq, 09 de Junho de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo II – Resolução 441, de 12 de maio de 2011**RESOLUÇÃO CNS Nº 441, DE 12 DE MAIO DE 2011.**

O Plenário do Conselho Nacional de Saúde, em sua Ducentésima Vigésima Primeira Reunião Ordinária, realizada nos dias 11 e 12 de maio de 2011, no uso de suas competências regimentais e atribuições conferidas pela Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, pela Lei nº 8.142, de 28 de dezembro de 1990, e pelo Decreto nº 5.839, de 11 de julho de 2006, e

Considerando a necessidade de atualizar a complementação da regulamentação da Resolução CNS nº 196/96 no que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa;

Considerando a importância da utilização de material biológico humano para o desenvolvimento das ciências da saúde;

Considerando os subsídios advindos do Sistema EP/CONEP e a experiência acumulada na análise dos projetos de pesquisas que envolvem material biológico humano;

Considerando a necessidade de ser observada a proteção dos Direitos Humanos, das liberdades fundamentais e do respeito à dignidade humana na coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano, resolve:

Art. 1º Aprovar as seguintes diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores:

1. Para os efeitos desta Resolução, considera-se:

I - Biobanco: coleção organizada de material biológico humano e informações associadas, coletado e armazenado para fins de pesquisa, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade e gerenciamento institucional, sem fins comerciais;

II - Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e sob gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais;

III - Material Biológico Humano: espécimes, amostras e alíquotas de material original e seus componentes fracionados;

IV - Projeto de Pesquisa: documento em que é descrita a pesquisa em seus aspectos fundamentais, incluindo informações relativas ao sujeito da pesquisa, detalhamento a respeito dos métodos que serão utilizados para a coleta e tratamento das amostras biológicas, qualificação dos pesquisadores e instâncias responsáveis;

V - Protocolo de Desenvolvimento: documento no qual são definidos a constituição de um Biobanco, seus responsáveis e seus aspectos fundamentais, como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) a ser utilizado; as informações relativas ao sujeito e às amostras; e as etapas de coleta, processamento, armazenamento, distribuição e descarte de material biológico humano; e

VI - Sujeito da pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, associadas ao armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório ou Biobanco.

2. Sempre que houver previsão de armazenamento de material biológico humano, no País ou no exterior, visando à possibilidade de utilização em investigações futuras, além do cumprimento dos requisitos da Resolução CNS nº 196/96 e complementares, devem ser apresentados:

I - justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura;

II - consentimento do sujeito da pesquisa, autorizando a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano;

III - declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP); e

Anexo II – Resolução 441, de 12 de maio de 2011 (continuação)

IV - regulamento aprovado pela instituição depositária destinado à constituição e ao funcionamento do banco de material biológico humano.

3. No caso de Biobanco:

I - o Regulamento corresponde ao seu Protocolo de Desenvolvimento, devendo ser primeiramente analisado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando aprovado, ser necessariamente avaliado e receber parecer final da CONEP;

II - o Protocolo de Desenvolvimento é necessário para o credenciamento do Biobanco, devendo ser apresentado no momento de sua proposição e avaliado de acordo com os prazos de tramitação estabelecidos no Sistema CEP/CONEP; e

III - o Biobanco deve conter um sistema seguro de identificação, que garanta o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos dados dos sujeitos da pesquisa, para fornecimento de informações do interesse destes ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

IV - quando houver alteração da titularidade da responsabilidade pelo Biobanco, tal fato deve ser prontamente comunicado ao Sistema CEP/CONEP; e

V - os Biobancos estão sujeitos à inspeção sanitária pelos órgãos competentes.

4. No caso de Biorrepositório, as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano devem estar explicitadas no Projeto de Pesquisa respectivo, devendo seu Regulamento ser apreciado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando for o caso, pela CONEP, segundo atribuições definidas na Resolução CNS nº 196/96 e complementares.

5. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento e utilização de material biológico humano em Biobanco é formalizado através de TCLE, por meio do qual o sujeito da pesquisa deve se manifestar expressamente quanto às seguintes alternativas, excludentes entre si:

I - necessidade de novo consentimento a cada pesquisa; e

II - dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

a) O TCLE deve conter referência aos tipos de informação que poderão ser obtidos nas pesquisas futuras, a partir da utilização do material biológico humano armazenado, para fins de conhecimento e decisão autônoma do sujeito.

b) O TCLE deve conter a garantia expressa da possibilidade de acesso pelo sujeito da pesquisa, inclusive a(s) forma(s) de contato para tal, ao conhecimento dos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico e às orientações quanto às suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando aplicável, a qualquer tempo.

c) O TCLE pode conter manifestação expressa da vontade do sujeito da pesquisa quanto à cessão dos direitos sobre o material armazenado aos sucessores ou outros por ele indicado, em caso de óbito ou condição incapacitante.

d) O TCLE deve informar ao sujeito que os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir de pesquisas poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

e) O TCLE pode conter referência à autorização de descarte do material armazenado e às situações nas quais o mesmo é possível.

6. O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrepositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

7. A transferência do material biológico humano armazenado entre Biobancos ou Biorrepositórios, da própria ou de outra instituição, deve ser comunicada ao sujeito da pesquisa, sempre que possível ou, na impossibilidade, deve ser apresentada justificativa ao Sistema CEP/CONEP.

8. O sujeito da pesquisa deve ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biobanco ou do Biorrepositório, quando for o caso.

9. O material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório é do sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional.

I - O gerenciamento do material biológico humano armazenado em Biobanco cabe à instituição e no caso de Biorrepositório ao pesquisador responsável.

Anexo II – Resolução 441, de 12 de maio de 2011 (continuação)

10. O sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta.

I - A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo sujeito da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

11. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biobanco é indeterminado, sendo a manutenção de seu credenciamento subordinada ao atendimento das normas vigentes.

I - A cada cinco anos, contados a partir da sua constituição, ou a qualquer tempo, por solicitação da CONEP, a instituição responsável pelo Biobanco deve apresentar relatório de atividades do período ao Sistema CEP/CONEP, constando, obrigatoriamente, o número de sujeitos incluídos no período e a relação de pesquisas que utilizaram amostras armazenadas.

II - O descarte do material biológico humano armazenado em Biobanco pode ocorrer:

- a) pela manifesta vontade do sujeito da pesquisa;
- b) devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade;
- c) por iniciativa da instituição; e
- d) pela dissolução do Biobanco.

III - Nas hipóteses previstas nas alíneas "c" e "d", são obrigatórias:

a) a oferta formal do material armazenado a, no mínimo, duas instituições de pesquisa que possuam Biobanco e a apresentação comprovada da recusa; e

b) a submissão da decisão institucional e da destinação do material biológico ao CEP, que as encaminhará para avaliação da CONEP.

12. O prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos.

I - Renovações da autorização de armazenamento são permitidas mediante solicitação do pesquisador responsável, ao CEP, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material durante o período.

II - Ao final do período de realização da pesquisa, o material biológico humano armazenado em Biorrepositório pode:

- a) permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS;
- b) ser transferido formalmente para outro Biorrepositório ou Biobanco, mediante aprovação dos CEP e das instituições envolvidas; e
- c) ser descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o TCLE, respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do sujeito da pesquisa.

13. No caso de pesquisa envolvendo mais de uma instituição deve haver acordo firmado entre as instituições participantes, contemplando formas de operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório, inclusive a possibilidade de dissolução futura da parceria e a consequente partilha e destinação dos dados e materiais armazenados, conforme previsto no TCLE.

I - É necessário explicitar o tipo e a quantidade dos materiais compartilhados, informando sua destinação após a utilização.

14. No caso de constituição ou participação em banco de material biológico humano no exterior, devem ser obedecidas as normas nacionais e internacionais para remessa de material e ser apresentado o regulamento da instituição destinatária para análise do Sistema CEP/CONEP quanto ao atendimento dos requisitos desta Resolução.

I - O pesquisador e instituição brasileiros devem ter direito ao acesso e à utilização, em pesquisas futuras, do material biológico humano armazenado no exterior, não necessariamente das amostras por ele depositadas pelo pesquisador, garantida, no mínimo, a proporcionalidade da participação.

II - O direito de acesso e utilização compreende as amostras, informações associadas e resultados incorporados ao banco, obtidos em pesquisas aprovadas pelo Sistema CEP/CONEP.

III - Os direitos relativos ao material biológico humano armazenado no exterior não podem ser considerados exclusivos de Estado ou instituição.

IV - A utilização de amostras de brasileiros armazenadas no exterior somente poderá se realizar se observado o art. 5º desta Resolução e com a participação de pesquisador e/ou instituição brasileiros.

Anexo II – Resolução 441, de 12 de maio de 2011 (continuação)

V - A instituição destinatária no exterior deve comprometer-se a respeitar a legislação brasileira, em especial a vedação do patenteamento e da utilização comercial de material biológico humano.

15. Sobre a utilização de amostras de material biológico humano armazenado:

I - as amostras armazenadas podem ser utilizadas em novas pesquisas aprovadas pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP;

II - os projetos de pesquisas que pretendam utilizar amostras armazenadas devem incluir:

a) justificativa para utilização do material;

b) cópia do TCLE empregado quando da coleta do material, contendo autorização de armazenamento e possível utilização futura em pesquisa, se o armazenamento ocorreu a partir da homologação da Resolução CNS nº 196/96; e

c) TCLE específico para nova pesquisa ou a solicitação de sua dispensa, conforme disposto no art. 5ª desta Resolução.

III - quando fundamentada a impossibilidade de obtenção do consentimento específico para a nova pesquisa, mediante opção do sujeito em ser consultado a cada pesquisa, cabe ao CEP autorizar, ou não, a utilização do material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório.

16. A legislação brasileira veda o patenteamento e a utilização comercial de material biológico humano armazenado em Biobancos e Biorrepositórios.

17. Os Biobancos constituídos a partir da homologação desta Resolução deverão adequar-se à mesma e os constituídos anteriormente terão o prazo de um ano para sua regularização, contado a partir da data de homologação.

I - a regularização prevista no art. 17 será objeto de análise e aprovação pelo Sistema CEP/CONEP.

18. Fica revogada a Resolução CNS nº 347, de 13 de janeiro de 2005, publicada no Diário Oficial da União nº 47, de 10 de março de 2005.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Presidente do Conselho Nacional de Saúde

Homologo a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, nos termos do Decreto nº 5.839, de 11 de julho de 2006.

ALEXANDRE ROCHA SANTOS PADILHA
Ministro de Estado da Saúde

Anexo III – 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: **“Frequência do Polimorfismo no gene IL28B em pacientes portadores de Hepatite C crônica e em controles sadios”**

2. PESQUISADORES: Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita, Camila S. Ferreira
 CARGO/FUNÇÃO: Prof. Doutor responsável pela pesquisa, pesquisadora executante/aluna,
 INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: CRM nº 68066
 UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto Central - Disciplina de Gastroenterologia Clínica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (continuação)

1.*Desenho do estudo e objetivo(s):* Você está sendo convidado para participar de um estudo que tem por objetivo analisar a frequência do polimorfismo rs12979860, localizado no gene IL28B, na população portadora do vírus da hepatite C (VHC), bem como em pacientes doadores de sangue, analisar a relação deste polimorfismo com a resposta ao tratamento para hepatite C e padronizar os métodos utilizados na identificação desse polimorfismo.

2.*Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:* Se você concordar em participar voluntariamente, será solicitado que responda a um breve questionário, com o objetivo de obter informações como sexo, idade, raça e ascendência, presença de doenças e co-morbidades, também será colhido uma amostra de sangue para realização de exames. Tudo que será estudado no seu sangue está relacionado ao tratamento para hepatite C. Não há procedimentos ou exames experimentais e não será feito nada com você que não seja rotina, habitual.

3.*Relações dos procedimentos rotineiros e como são realizados:* Coleta de sangue venoso por punção periférica da veia do antebraço.

4.*Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3:* Desconforto relativo à necessidade de vir para a consulta médica e exames, que, entretanto estão exatamente de acordo com a rotina do ambulatório. Riscos referentes à colheita de sangue por punção venosa, ou seja, risco de formar um hematoma ou mancha roxa no lugar da picada para retirada de quantidade necessária de sangue.

5.*Benefícios para o participante:* Um possível benefício seria a identificação de que você é portador da alteração que pode estar relacionada a uma resposta favorável ao tratamento para hepatite C, podendo assim ajudar na direção de seu tratamento e acompanhamento clínico. Entretanto trata-se de um estudo experimental e não há garantia dos benefícios que possam

Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (continuação)

resultar da sua participação neste estudo, mas o conhecimento adquirido neste estudo pode beneficiar outras pessoas.

6. *Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar:* Não há.

7. Garantia de acesso: Toda a equipe de pesquisa estará a sua inteira disposição, a qualquer tempo, para esclarecer qualquer dúvida sobre riscos ou benefícios relacionados em qualquer etapa do estudo. O principal investigador é a Dra Suzane Kioko Ono-Nita que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 9º andar, no telefone 11-3069-7830. 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

8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Além disso, garantimos que não sofrerá qualquer discriminação no seu seguimento, sendo acompanhado no ambulatório de Gastroenterologia Clínica do ICHCFMUSP, conforme rotina do serviço.

9. Direito de confidencialidade: Você tem direito à privacidade. Toda informação obtida neste estudo que eventualmente possa ser identificada com seu nome, deverá permanecer confidencial, tanto quanto possível. Seu nome não será revelado em quaisquer relatórios ou publicações resultantes deste estudo.

10. Você tem o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Caso você deseje saber o resultado dos exames, estes ficarão disponíveis para que possam ser retirados pelo seu médico.

11. Despesas e compensações: O acesso ao projeto é de forma voluntária. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não

Anexo III – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (continuação)

há compensação financeira relacionada à sua participação. Não se prevê indenizações nos custos do projeto.

12. A equipe de pesquisa se compromete em utilizar os materiais colhidos somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Frequência do Polimorfismo no gene IL28B em pacientes portadores de Hepatite C crônica e em controles sadios”**.

Eu discuti com a Dra Suzane Kioko Ono-Nita 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.

Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura da testemunha

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.

----- Data ____/____/____

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

1. Ono-Nita Sk, Nita Me, Carrilho Fj (2006) Hepatitis C: Facts In Numbers. *Arq Gastroenterol* 43: 71-72.
2. Choo Ql, Kuo G, Weiner Aj, Overby Lr, Bradley Dw, et al. (1989) Isolation Of A Cdna Clone Derived From A Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* 244: 359-362.
3. Seeff Lb (2002) Natural History Of Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 36: S35-46.
4. Mendes Ls, Nita Me, Ono-Nita Sk, Mello Es, Da Silva Lc, et al. (2008) Prognostic Factors For Progression of Liver Structural Lesions In Chronic Hepatitis C Patients. *World J Gastroenterol* 14: 2522-2528.
5. Strauss E (2001) [Hepatitis C]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 69-82.
6. Farci P, Alter Hj, Wong D, Miller Rh, Shih Jw, et al. (1991) A Long-Term Study of Hepatitis C Virus Replication In Non-A, Non-B Hepatitis. *N Engl J Med* 325: 98-104.
7. Alter Mj (2007) Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection. *World J Gastroenterol* 13: 2436-2441.
8. Ministério da Saúde - (2011) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para Hepatite Viral C e Coinfecções. In: Dst Aehv, Editor. Brasília - Df: Maio De 2011.
9. Bacon Br, Mchutchison Jg (2007) Into The Light: Strategies For Battling Hepatitis C. *Am J Manag Care* 13 Suppl 12: S319-326.
10. Thomas Dl, Thio Cl, Martin Mp, Qi Y, Ge D, Et al. (2009) Genetic Variation In Il28b And Spontaneous Clearance Of Hepatitis C Virus. *Nature* 461: 798-801.
11. Ge D, Fellay J, Thompson Aj, Simon Js, Shianna Kv, Et al. (2009) Genetic Variation In Il28b Predicts Hepatitis C Treatment-Induced Viral Clearance. *Nature* 461: 399-401.
12. Chevaliez S, Hezode C, Soulier A, Costes B, Bouvier-Alias M, Et al. High-Dose Pegylated Interferon-Alpha And Ribavirin In Nonresponder Hepatitis C Patients And Relationship With Il-28b Genotype (Syren Trial). *Gastroenterology* 141: 119-127.
13. Cyr Dd, Lucas Je, Thompson Jw, Patel K, Clark Pj, Et al. Characterization Of Serum Proteins Associated With Il28b Genotype Among Patients With Chronic Hepatitis C. *Plos One* 6: E21854.
14. Eurich D, Boas-Knoop S, Ruehl M, Schulz M, Carrillo Ed, Et al. Relationship Between The Interleukin-28b Gene Polymorphism And The Histological Severity Of Hepatitis C Virus-Induced Graft Inflammation And The Response To Antiviral Therapy After Liver Transplantation. *Liver Transpl* 17: 289-298.

15. Xu H, Guo LI, He LI, Chen Y, Liu K, Et al. [Association Of Interleukin 28b Polymorphisms With Response To Pegylatedinterferon Plus Ribavirin Therapy For Chronic Hepatitis C]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 43: 855-859.
16. Kozlowski P, Pogorzelska J, Lapinski Tw, Kowalczyk O, Niklinski J, Et al. [The Occurrence Of Hcv Genotypes And Single Polynucleotide Polymorphisms Of Rs12979860 Among Hcv Infected Patients In Northeastern Poland]. *Przegl Epidemiol* 66: 335-339.
17. Pinho Jrr (2003) O Vírus Da Hepatite C. In: Silva Lc, Editor. *Hepatites Agudas Crônicas*. São Paulo: Sarvier. Pp. 26-35.
18. Shukla Dd, Hoyne Pa, Ward Cw (1995) Evaluation Of Complete Genome Sequences And Sequences Of Individual Gene Products For The Classification Of Hepatitis C Viruses. *Arch Virol* 140: 1747-1761.
19. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Et al. (2005) Production Of Infectious Hepatitis C Virus In Tissue Culture From A Cloned Viral Genome. *Nat Med* 11: 791-796.
20. Choo Ql, Richman Kh, Han Jh, Berger K, Lee C, Et al. (1991) Genetic Organization And Diversity Of The Hepatitis C Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2451-2455.
21. Lyra Ac, Fan X, Di Bisceglie Am (2004) Molecular Biology And Clinical Implication Of Hepatitis C Virus. *Braz J Med Biol Res* 37: 691-695.
22. Moradpour D, Penin F, Rice Cm (2007) Replication Of Hepatitis C Virus. *Nat Rev Microbiol* 5: 453-463.
23. Simmonds P, Smith Db, Mcomish F, Yap Pl, Kolberg J, Et al. (1994) Identification Of Genotypes Of Hepatitis C Virus By Sequence Comparisons In The Core, E1 And Ns-5 Regions. *J Gen Virol* 75 (Pt 5): 1053-1061.
24. Simmonds P (1994) Variability Of Hepatitis C Virus Genome. *Curr Stud Hematol Blood Transfus*: 12-35.
25. Simmonds P (1995) Variability Of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 21: 570-583.
26. Simmonds P, Alberti A, Alter Hj, Bonino F, Bradley Dw, Et al. (1994) A Proposed System For The Nomenclature Of Hepatitis C Viral Genotypes. *Hepatology* 19: 1321-1324.
27. Purcell R (1997) The Hepatitis C Virus: Overview. *Hepatology* 26: 11s-14s.
28. Zein Nn (2000) Clinical Significance Of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clin Microbiol Rev* 13: 223-235.
29. Roggendorf M, Meisel H, Viazov S (2000) Natural History Of Hepatitis C. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 Suppl 1: 189-192.

30. Alter HJ, Seeff LB (2000) Recovery, Persistence, And Sequelae In Hepatitis C Virus Infection: A Perspective On Long-Term Outcome. *Semin Liver Dis* 20: 17-35.
31. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Et al. (1992) The Natural History Of Community-Acquired Hepatitis C In The United States. The Sentinel Counties Chronic Non-A, Non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 327: 1899-1905.
32. Zuckerman AJ (1993) Viral Hepatitis. *Transfus Med* 3: 7-19.
33. Silva LC (2003) Aspectos Peculiares E História Natural Da Hepatite C In: Silva LC, Editor. *Hepatitis Agudas Crônicas*. 3º Ed. São Paulo. Pp. 208-219.
34. Harris HE, Ramsay ME, Andrews N, Eldridge KP (2002) Clinical Course Of Hepatitis C Virus During The First Decade Of Infection: Cohort Study. *Bmj* 324: 450-453.
35. Uriz J, Briz R (2004) [Natural History Of Hepatitis C Virus Infection]. *An Sist Sanit Navar* 27 Suppl 2: 51-58.
36. Lupsor M, Badea R, Stefanescu H, Grigorescu M, Sparchez Z, Et al. (2008) Analysis Of Histopathological Changes That Influence Liver Stiffness In Chronic Hepatitis C. Results From A Cohort Of 324 Patients. *J Gastrointest Liver Dis* 17: 155-163.
37. Fernandez I, Rubio R, Lumberras C (2002) Hepatitis C In HIV-Infected Patients--Therapeutic Approach. *Clin Microbiol Infect* 8: 80-84.
38. De Mitri MS, Poussin K, Baccarini P, Pontisso P, D'errico A, Et al. (1995) HCV-Associated Liver Cancer Without Cirrhosis. *Lancet* 345: 413-415.
39. Chang KM (2003) Immunopathogenesis Of Hepatitis C Virus Infection. *Clin Liver Dis* 7: 89-105.
40. Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, Gibo Y, Yoshizawa K, Et al. (1990) Interrelationship Of Blood Transfusion, Non-A, Non-B Hepatitis And Hepatocellular Carcinoma: Analysis By Detection Of Antibody To Hepatitis C Virus. *Hepatology* 12: 671-675.
41. Kawatani T, Suou T, Tajima F, Ishiga K, Omura H, Et al. (2001) Incidence Of Hepatitis Virus Infection And Severe Liver Dysfunction In Patients Receiving Chemotherapy For Hematologic Malignancies. *Eur J Haematol* 67: 45-50.
42. Booth JC, Brown JI, Thomas HC (1995) The Management Of Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Gut* 37: 449-454.
43. Alter MJ, Mast EE (1994) The Epidemiology Of Viral Hepatitis In The United States. *Gastroenterol Clin North Am* 23: 437-455.
44. Alter MJ (1994) Transmission Of Hepatitis C Virus--Route, Dose, And Titer. *N Engl J Med* 330: 784-786.

45. Datta Sd, Armstrong Gl, Roome Aj, Alter Mj (2003) Blood Exposures And Hepatitis C Virus Infections Among Emergency Responders. *Arch Intern Med* 163: 2605-2610.
46. Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O (2000) Intrafamilial Transmission Of Hepatitis C Virus: A Systematic Review. *J Viral Hepat* 7: 93-103.
47. Carrilho Fj, Clemente C (2003) *Epidemiologia Hepatites Agudas E Crônicas*; Sarivier, Editor. São Paulo.
48. Sartori M, La Terra G, Aglietta M, Manzin A, Navino C, Et al. (1993) Transmission Of Hepatitis C Via Blood Splash Into Conjunctiva. *Scand J Infect Dis* 25: 270-271.
49. Ippolito G, Puro V, Petrosillo N, De Carli G, Micheloni G, Et al. (1998) Simultaneous Infection With Hiv And Hepatitis C Virus Following Occupational Conjunctival Blood Exposure. *Jama* 280: 28.
50. Coelho Hsm (1997) Detecção De Anticorpos Contra O Vírus Da Hepatitis C Na Prevenção Da Infecção Pós-Transfusional Pelo Vírus Da Hepatite C. Rio De Janeiro: Universidade Federal Do Rio De Janeiro. 127 P.
51. Bacchetti P, Tien Pc, Seaberg Ec, O'brien Tr, Augenbraun Mh, Et al. (2007) Estimating Past Hepatitis C Infection Risk From Reported Risk Factor Histories: Implications For Imputing Age Of Infection And Modeling Fibrosis Progression. *Bmc Infect Dis* 7: 145.
52. Cdc Cfscap- (2008) Surveillance For Acute Viral Hepatitis. In: Report Mmamw, Editor. United States. Pp. 1-25.
53. Ministério da Saúde (2011) Boletim Epidemiológico – Hepatites Virais. In: Departamento De Dst Aehv, Editor. Brasília - Df.
54. Chiaramonte M, Stroffolini T, Lorenzoni U, Minniti F, Conti S, Et al. (1996) Risk Factors In Community-Acquired Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Case-Control Study In Italy. *J Hepatol* 24: 129-134.
55. Keiserman Dr, Both Ct, Mattos Aa, Remiao J, Alexandre Co, Et al. (2003) Intrafamilial Transmission Of Hepatitis C Virus In Patients With Hepatitis C And Human Immunodeficiency Virus Coinfection. *Am J Gastroenterol* 98: 878-883.
56. Mastromatteo Am, Rapaccini Gl, Pompili M, Ursino S, Romano-Spica V, Et al. (2001) Hepatitis C Virus Infection: Other Biological Fluids Than Blood May Be Responsible For Intrafamilial Spread. *Hepatogastroenterology* 48: 193-196.
57. Mok J, Pembrey L, Tovo Pa, Newell Ml (2005) When Does Mother To Child Transmission Of Hepatitis C Virus Occur? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 90: F156-160.

58. Zanetti Ar, Tanzi E, Romano L, Zuin G, Minola E, Et al. (1998) A Prospective Study On Mother-To-Infant Transmission Of Hepatitis C Virus. *Intervirology* 41: 208-212.
59. Ruiz-Extremera A, Salmeron J, Torres C, De Rueda Pm, Gimenez F, Et al. (2000) Follow-Up Of Transmission Of Hepatitis C To Babies Of Human Immunodeficiency Virus-Negative Women: The Role Of Breast-Feeding In Transmission. *Pediatr Infect Dis J* 19: 511-516.
60. England K, Thorne C, Newell MI (2006) Vertically Acquired Paediatric Coinfection With Hiv And Hepatitis C Virus. *Lancet Infect Dis* 6: 83-90.
61. Akahane Y, Kojima M, Sugai Y, Sakamoto M, Miyazaki Y, Et al. (1994) Hepatitis C Virus Infection In Spouses Of Patients With Type C Chronic Liver Disease. *Ann Intern Med* 120: 748-752.
62. Alter Mj, Coleman Pj, Alexander Wj, Kramer E, Miller Jk, Et al. (1989) Importance Of Heterosexual Activity In The Transmission Of Hepatitis B And Non-A, Non-B Hepatitis. *Jama* 262: 1201-1205.
63. Terrault Na (2002) Sexual Activity As A Risk Factor For Hepatitis C. *Hepatology* 36: S99-105.
64. Nakashima K, Kashiwagi S, Hayashi J, Noguchi A, Hirata M, Et al. (1992) Sexual Transmission Of Hepatitis C Virus Among Female Prostitutes And Patients With Sexually Transmitted Diseases In Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol* 136: 1132-1137.
65. Ndimbie Ok, Kingsley La, Nedjar S, Rinaldo Cr (1996) Hepatitis C Virus Infection In A Male Homosexual Cohort: Risk Factor Analysis. *Genitourin Med* 72: 213-216.
66. Thomas DI, Zenilman Jm, Alter Hj, Shih Jw, Galai N, Et al. (1995) Sexual Transmission Of Hepatitis C Virus Among Patients Attending Sexually Transmitted Diseases Clinics In Baltimore--An Analysis Of 309 Sex Partnerships. *J Infect Dis* 171: 768-775.
67. Tengan Fm, Eluf-Neto J, Cavaleiro Np, Barone Aa (2001) Sexual Transmission Of Hepatitis C Virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 43: 133-137.
68. De Carvalho-Mello Im, Filho Je, Gomes-Gouvea Ms, De Mello Malta F, De Queiroz At, Et al. Molecular Evidence Of Horizontal Transmission Of Hepatitis C Virus Within Couples. *J Gen Virol* 91: 691-696.
69. Aaron S, McMahan Jm, Milano D, Torres L, Clatts M, Et al. (2008) Intranasal Transmission Of Hepatitis C Virus: Virological And Clinical Evidence. *Clin Infect Dis* 47: 931-934.
70. Alter Mj (2002) Prevention Of Spread Of Hepatitis C. *Hepatology* 36: S93-98.

71. (2004) Global Burden Of Disease For Hepatitis C - Gbd. In: Pharmacology Tjoc, Editor. Pp. 20-29.
72. Shepard Cw, Finelli L, Alter Mj (2005) Global Epidemiology Of Hepatitis C Virus Infection. *Lancet Infect Dis* 5: 558-567.
73. Frank C, Mohamed Mk, Strickland Gt, Lavanchy D, Arthur Rr, Et al. (2000) The Role Of Parenteral Antischistosomal Therapy In The Spread Of Hepatitis C Virus In Egypt. *Lancet* 355: 887-891.
74. Parslow Tg (2004) *Imunologia Médica*; Koogan G, Editor. Rio De Janeiro.
75. Lamonaca V, Missale G, Urbani S, Pilli M, Boni C, Et al. (1999) Conserved Hepatitis C Virus Sequences Are Highly Immunogenic For Cd4(+) T Cells: Implications For Vaccine Development. *Hepatology* 30: 1088-1098.
76. Gerlach Jt, Diepolder Hm, Jung Mc, Gruener Nh, Schraut Ww, Et al. (1999) Recurrence Of Hepatitis C Virus After Loss Of Virus-Specific Cd4(+) T-Cell Response In Acute Hepatitis C. *Gastroenterology* 117: 933-941.
77. Rehermann B, Chisari Fv (2000) Cell Mediated Immune Response To The Hepatitis C Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 242: 299-325.
78. Diepolder Hm, Gerlach Jt, Zachoval R, Hoffmann Rm, Jung Mc, Et al. (1997) Immunodominant Cd4+ T-Cell Epitope Within Nonstructural Protein 3 In Acute Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 71: 6011-6019.
79. Danta M, Dusheiko Gm (2008) Acute Hcv In Hiv-Positive Individuals - A Review. *Curr Pharm Des* 14: 1690-1697.
80. Nelson Dr (2001) The Immunopathogenesis Of Hepatitis C Virus Infection. *Clin Liver Dis* 5: 931-953.
81. Prado Ib, Nakhle Mc, Silva Lc (2003) *Imunopatogenia Das Hepatites Agudas E Crônicas*. In: Silva Lc, Editor. *Hepatites Agudas Crônicas*. 3 Ed. São Paulo: Sarvier. Pp. 99-106.
82. Abbas Ak, Janeway Ca, Jr. (2000) Immunology: Improving On Nature In The Twenty-First Century. *Cell* 100: 129-138.
83. Flint M, Mckeating Ja (2000) The Role Of The Hepatitis C Virus Glycoproteins In Infection. *Rev Med Virol* 10: 101-117.
84. Rehermann B (2000) Intrahepatic T Cells In Hepatitis B: Viral Control Versus Liver Cell Injury. *J Exp Med* 191: 1263-1268.
85. Silva Lc, Granato Cfh (2003) Importância E Uso Clínico Dos Marcadores Virais E Sorológicos. In: Silva Lc, Editor. *Hepatites Agudas E Crônicas*. 3 Ed. São Paulo: Sarvier. Pp. 60-78.

86. Zibert A, Dudziak P, Schreier E, Roggendorf M (1997) Characterization Of Antibody Response To Hepatitis C Virus Protein E2 And Significance Of Hypervariable Region 1-Specific Antibodies In Viral Neutralization. *Arch Virol* 142: 523-534.
87. Kobayashi M, Tanaka E, Matsumoto A, Ichijo T, Kiyosawa K (1997) Antibody Response To E2/Ns1 Hepatitis C Virus Protein In Patients With Acute Hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 12: 73-76.
88. Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Et al. (1992) Detection Of Hepatitis C Virus By Polymerase Chain Reaction And Response To Interferon-Alpha Therapy: Relationship To Genotypes Of Hepatitis C Virus. *Hepatology* 16: 293-299.
89. Orland Jr, Wright TI, Cooper S (2001) Acute Hepatitis C. *Hepatology* 33: 321-327.
90. Villano Sa, Vlahov D, Nelson Ke, Cohn S, Thomas DI (1999) Persistence Of Viremia And The Importance Of Long-Term Follow-Up After Acute Hepatitis C Infection. *Hepatology* 29: 908-914.
91. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Et al. (2000) The Outcome Of Acute Hepatitis C Predicted By The Evolution Of The Viral Quasispecies. *Science* 288: 339-344.
92. Nakamura I, Imawari M (2000) Cellular Immune Response In Hcv Infection. *J Gastroenterol* 35: 881-889.
93. Lechner F, Gruener Nh, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Et al. (2000) Cd8+ T Lymphocyte Responses Are Induced During Acute Hepatitis C Virus Infection But Are Not Sustained. *Eur J Immunol* 30: 2479-2487.
94. Lai Me, Mazzoleni Ap, Argioli F, De Virgilis S, Balestrieri A, Et al. (1994) Hepatitis C Virus In Multiple Episodes Of Acute Hepatitis In Polytransfused Thalassaemic Children. *Lancet* 343: 388-390.
95. Ferenci P, Stauber R, Steindl-Munda P, Gschwantler M, Fickert P, Et al. (2001) Treatment Of Patients With Chronic Hepatitis C Not Responding To Interferon With High-Dose Interferon Alpha With Or Without Ribavirin: Final Results Of A Prospective Randomized Trial. Austrian Hepatitis Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13: 699-705.
96. Davis GI (1999) Combination Treatment With Interferon And Ribavirin For Chronic Hepatitis C. *Clin Liver Dis* 3: 811-826.
97. Silva Lcd (2003) Hepatite Agudas E Crônicas. São Paulo: Sarvier. 424 P.
98. Brillanti S, Levantesi F, Masi L, Foli M, Bolondi L (2000) Triple Antiviral Therapy As A New Option For Patients With Interferon Nonresponsive Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 32: 630-634.

99. Manns Mp, Cornberg M, Wedemeyer H (2001) Current And Future Treatment Of Hepatitis C. *Indian J Gastroenterol* 20 Suppl 1: C47-51.
100. Alves Av, De Azevedo Ap, Perin C, Ramos Gz, Brandao Ab, Et al. (2003) [Interferon-Alpha And Ribavirin Therapy On Chronic Hepatitis C Virus Infection: The Experience Of Rio Grande Do Sul State Health Department, Brazil]. *Arq Gastroenterol* 40: 227-232.
101. Acras Rn, Pedroso MI, Caum Lc, Pisani Jc, Amarante Hm, Et al. (2004) [The Sustained Response Rates For Chronic Hepatitis C Patients Undergoing Therapy With The Several Interferons And Ribavirins Supplied By Brazilians Health Ministry Is Comparable To Those Reported In The Literature]. *Arq Gastroenterol* 41: 3-9.
102. Shepherd J, Brodin H, Cave C, Waugh N, Price A, Et al. (2004) Pegylated Interferon Alpha-2a And -2b In Combination With Ribavirin In The Treatment Of Chronic Hepatitis C: A Systematic Review And Economic Evaluation. *Health Technol Assess* 8: Iii-Iv, 1-125.
103. Andriulli A, Mangia A, Iacobellis A, Ippolito A, Leandro G, Et al. (2008) Meta-Analysis: The Outcome Of Anti-Viral Therapy In Hcv Genotype 2 And Genotype 3 Infected Patients With Chronic Hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 28: 397-404.
104. Stephanos J (2004) Peginterferon-2a And Ribavirin Combination Therapy In Chronic Hepatitis C - A Randomized Study Of Treatment Duration And Ribavirin Dose. *Ann Intern Med* 140: 346-335.
105. Wedemeyer H, Manns Mp (2002) [Acute Hepatitis C--Therapy With Interferon Alpha-2b]. *Internist (Berl)* 43: 1477-1478.
106. Montes-Cano Ma, Garcia-Lozano Jr, Abad-Molina C, Romero-Gomez M, Barroso N, Et al. Interleukin-28b Genetic Variants And Hepatitis Virus Infection By Different Viral Genotypes. *Hepatology* 52: 33-37.
107. Andersson T, Flockhart Da, Goldstein Db, Huang Sm, Kroetz DI, Et al. (2005) Drug-Metabolizing Enzymes: Evidence For Clinical Utility Of Pharmacogenomic Tests. *Clin Pharmacol Ther* 78: 559-581.
108. Shah Rr (2005) Pharmacogenetics In Drug Regulation: Promise, Potential And Pitfalls. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1617-1638.
109. Ng Pc, Zhao Q, Levy S, Strausberg RI, Venter Jc (2008) Individual Genomes Instead Of Race For Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther* 84: 306-309.
110. Der Sd, Zhou A, Williams Br, Silverman Rh (1998) Identification Of Genes Differentially Regulated By Interferon Alpha, Beta, Or Gamma Using Oligonucleotide Arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 15623-15628.

111. De Veer Mj, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Et al. (2001) Functional Classification Of Interferon-Stimulated Genes Identified Using Microarrays. *J Leukoc Biol* 69: 912-920.
112. Taylor Mw, Grosse Wm, Schaley Je, Sanda C, Wu X, Et al. (2004) Global Effect Of Peg-Ifn-Alpha And Ribavirin On Gene Expression In Pbmcs In Vitro. *J Interferon Cytokine Res* 24: 107-118.
113. Tan H, Derrick J, Hong J, Sanda C, Grosse Wm, Et al. (2005) Global Transcriptional Profiling Demonstrates The Combination Of Type I And Type II Interferon Enhances Antiviral And Immune Responses At Clinically Relevant Doses. *J Interferon Cytokine Res* 25: 632-649.
114. Taylor Mw, Tsukahara T, Brodsky L, Schaley J, Sanda C, Et al. (2007) Changes In Gene Expression During Pegylated Interferon And Ribavirin Therapy Of Chronic Hepatitis C Virus Distinguish Responders From Nonresponders To Antiviral Therapy. *J Virol* 81: 3391-3401.
115. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Et al. (2003) IL-28, IL-29 And Their Class II Cytokine Receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4: 63-68.
116. Scott J, Holte S, Urban T, Burgess C, Coppel E, Et al. IL28b Genotype Effects During Early Treatment With Peginterferon And Ribavirin In Difficult-To-Treat Hepatitis C Virus Infection. *J Infect Dis* 204: 419-425.
117. McCarthy Jj, Li Jh, Thompson A, Suchindran S, Lao Xq, Et al. Replicated Association Between An IL28b Gene Variant And A Sustained Response To Pegylated Interferon And Ribavirin. *Gastroenterology* 138: 2307-2314.
118. Hayashi K, Katano Y, Honda T, Ishigami M, Itoh A, Et al. Association Of Interleukin 28b And Mutations In The Core And NS5A Region Of Hepatitis C Virus With Response To Peg-Interferon And Ribavirin Therapy. *Liver Int.*
119. Fabris C, Falletti E, Cussigh A, Bitetto D, Fontanini E, Et al. IL-28b Rs12979860 C/T Allele Distribution In Patients With Liver Cirrhosis: Role In The Course Of Chronic Viral Hepatitis And The Development Of HCC. *J Hepatol* 54: 716-722.
120. Nogueira Ja, Ono-Nita Sk, Nita Me, Souza Mm, Carmo Ep, Et al. (2009) The 249ser Mutation Of TP53 Has High Prevalence And Is Correlated With Larger And More Poorly Differentiated Hepatocellular Carcinomas In Brazilian Patients. *Bmc Cancer* 9: 204.
121. Hall Ta (1999) Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor And Analysis Program For Windows 95/98/NT
Nucl Acids Symp Ser 41: 95- 8

122. Altschul Sf Gw, Miller W, Myers Ew, Lipman Dj (1990) Basic Local Alignment Search Tool J Mol Biol 5;215(3):403-10
123. Urban Tj, Thompson Aj, Bradrick Ss, Fellay J, Schuppan D, Et al. Il28b Genotype Is Associated With Differential Expression Of Intrahepatic Interferon-Stimulated Genes In Patients With Chronic Hepatitis C. Hepatology 52: 1888-1896.
124. Ibge Ibdgee- (2006) Distribuição Da População Em Idade Ativa Por Cor Ou Raça.Pp.http://Www.Ibge.Gov.Br/Home/Presidencia/Noticias/Noticia_Visualiza.Php?Id_Noticia=737.
125. Ministério da Saúde (2012) Inibidores De Protease (Boceprevir E Telaprevir) Para O Tratamento Da Hepatite Crônica C. In: Secretaria De Ciência Teie, Editor. Relatório De Recomendação Da Comissão Nacional D. Brasília - Df
126. Greely Ht (2001) Human Genome Diversity: What About The Other Human Genome Project? Nat Rev Genet 2: 222-227.
127. Brady T (1995) The Ethical Implications Of The Human Genome Project For The Workplace. Int J Appl Philos 10: 47-56.
128. Pellerin C (1994) Ethical, Legal, And Social Issues Of The Human Genome Project: What To Do With What We Know. Environ Health Perspect 102: 58-59.
129. Brockett Pl, Tankersley Es (1997) The Genetics Revolution, Economics, Ethics, And Insurance. J Bus Ethics 16: 1661-1676.
130. Hamajima N, Saito T, Matsuo K, Kozaki K, Takahashi T, Et al. (2000) Polymerase Chain Reaction With Confronting Two-Pair Primers For Polymorphism Genotyping. Jpn J Cancer Res 91: 865-868.
131. Lotrich Fe, Loftis Jm, Ferrell Re, Rabinovitz M, Hauser P Il28b Polymorphism Is Associated With Both Side Effects And Clearance Of Hepatitis C During Interferon-Alpha Therapy. J Interferon Cytokine Res.
132. Pena Sd, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro Jp, Hutz Mh, Et al. The Genomic Ancestry Of Individuals From Different Geographical Regions Of Brazil Is More Uniform Than Expected. Plos One 6: E17063.
133. Daniel S (2005) Chronic Hepatitis C Treatment Patterns In African American Patients: An Update. Am J Gastroenterol 100: 716-722.
134. Shiffman Ml, Mihasa Aa, Millwala F, Sterling Rk, Luketic Va, Et al. (2007) Treatment Of Chronic Hepatitis C Virus In African Americans With Genotypes 2 And 3. Am J Gastroenterol 102: 761-766.
135. Alves-Silva J, Da Silva Santos M, Guimaraes Pe, Ferreira Ac, Bandelt Hj, Et al. (2000) The Ancestry Of Brazilian Mtdna Lineages. Am J Hum Genet 67: 444-461.

136. Carvalho-Silva Dr, Santos Fr, Rocha J, Pena Sd (2001) The Phylogeography Of Brazilian Y-Chromosome Lineages. *Am J Hum Genet* 68: 281-286.
137. Hadziyannis Sj, Sette H, Jr., Morgan Tr, Balan V, Diago M, Et al. (2004) Peginterferon-Alpha2a And Ribavirin Combination Therapy In Chronic Hepatitis C: A Randomized Study Of Treatment Duration And Ribavirin Dose. *Ann Intern Med* 140: 346-355.
138. Mchutchison Jg, Gordon Sc, Schiff Er, Shiffman Ml, Lee Wm, Et al. (1998) Interferon Alfa-2b Alone Or In Combination With Ribavirin As Initial Treatment For Chronic Hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339: 1485-1492.
139. Poynard T, Marcellin P, Lee Ss, Niederau C, Minuk Gs, Et al. (1998) Randomised Trial Of Interferon Alpha2b Plus Ribavirin For 48 Weeks Or For 24 Weeks Versus Interferon Alpha2b Plus Placebo For 48 Weeks For Treatment Of Chronic Infection With Hepatitis C Virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (Ihit). *Lancet* 352: 1426-1432.
140. Manns Mp, Mchutchison Jg, Gordon Sc, Rustgi Vk, Shiffman M, Et al. (2001) Peginterferon Alfa-2b Plus Ribavirin Compared With Interferon Alfa-2b Plus Ribavirin For Initial Treatment Of Chronic Hepatitis C: A Randomised Trial. *Lancet* 358: 958-965.
141. Fried Mw, Shiffman Ml, Reddy Kr, Smith C, Marinos G, Et al. (2002) Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin For Chronic Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 347: 975-982.
142. Campiotto S, Pinho Jr, Carrilho Fj, Da Silva Lc, Souto Fj, Et al. (2005) Geographic Distribution Of Hepatitis C Virus Genotypes In Brazil. *Braz J Med Biol Res* 38: 41-49.
143. Marabita F, Aghemo A, De Nicola S, Rumi Mg, Cheroni C, Et al. Genetic Variation In The Interleukin-28b Gene Is Not Associated With Fibrosis Progression In Patients With Chronic Hepatitis C And Known Date Of Infection. *Hepatology* 54: 1127-1134.