Ana Catharina de Seixas Santos Nastri

Fatores genéticos associados ao clareamento
espontâneo e resposta ao tratamento da infecção
pelo vírus da hepatite C

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello
Pinho

São Paulo

2016

Ana Catharina de Seixas Santos Nastri

Fatores genéticos associados ao clareamento
espontâneo e resposta ao tratamento da infecção
pelo vírus da hepatite C

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Ciências em Gastroenterologia
Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello
Pinho

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nastri, Ana Catharina de Seixas Santos

Fatores genéticos associados ao clareamento espontâneo e resposta ao tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C / Ana Catharina de Seixas Santos Nastri. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Polimorfismo de nucleotídeo único 2.Hepatite C 3.Resultado do tratamento 4.Distribuição por raça ou etnia 5.Interferons 6.Marcadores genéticos

USP/FM/DBD-333/16

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos que partiram...

“How I wish you were here”

(David Gilmour, Roger Waters)

AGRADECIMENTOS

À minha família que me construiu e me trouxe até aqui.

Ao meu amado marido Marcio que me ajudou desde sempre e de diversas maneiras, e pela paciência infinita.

Ao Dr João Renato Rebello Pinho, meu orientador, por acreditar até o fim que eu conseguiria chegar lá. Uma pessoa a quem aprendi a admirar e respeitar.

À minha querida amiga Fernanda, um exemplo para mim, pelo imenso incentivo, dedicação e paciência. Tenho certeza de que a fiz sofrer bastante, mas sem ela não teria conseguido chegar até aqui. Sem palavras suficientes para agradecer.

À minha querida amiga Michele, pelo seu apoio, carinho, paciência e ensinamentos.

A todo Departamento de Gastroenterologia que me acolheu muito bem e onde fiz bons amigos.

A todos os meus colegas de trabalho do HC-FMUSP e do CRT/Santa Cruz, enfermeiros, escriturários, recepcionistas, farmacêuticos que me ajudam todos os dias a gostar ainda mais do meu trabalho.

Aos meus queridos, queridos amigos que deixaram o caminho mais leve... Afinal são eles que escolhemos para compartilhar tudo isso e que nos dão algumas de nossas melhores lembranças.

Aos meus amigos Ricardo e Filó, irmão e mãe postiços por minha livre escolha.

Não menos importante, aos meus queridos Arthur (saudades), Merlin e Bor que foram companheiros incansáveis de tantas madrugadas e os melhores relaxantes possíveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Fapesp, pelo suporte financeiro concedido (2010/10.549-1).

EPÍGRAFE

*Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.*

Fernando Pessoa

“Cheshire Puss,” she began, rather timidly, as she did not at all know whether it would like the name: however, it only grinned a little wider. “Come, it’s pleased so far,” thought Alice, and she went on, “Would you tell me, please, which way I ought to walk from here?”

“That depends a good deal on where you want to get to,” said the Cat.

Lewis Carroll. Alice’s Adventures in Wonderland, chapter 6

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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.

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	2
1.1.A hepatite C	2
1.1.1.História natural da doença.....	3
1.1.2 Tratamento.....	4
1.1.3.Vias de transmissão	7
1.2. O vírus da hepatite C.....	8
1.2.1.Mecanismos de entrada e replicação do <i>HCV</i>	11
1.2.2. Ativação do estado antiviral.....	13
1.2.3.Interferons	16
1.2.4. Imunologia na infecção pelo <i>HCV</i>	16
1.2.5. Polimorfismos genéticos associados à evolução clínica da infecção pelo <i>HCV</i> e ao tratamento da HC-C.....	19
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1.Aspectos éticos	26
3.2.Casuística	26
3.3.Coleta das amostras	28
3.4.Extração e quantificação de ácidos nucleicos	28
3.5.Detecção e genotipagem dos SNPs	29
3.6 Ancestralidade genética	30
3.7.Análise de dados.....	31
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES.....	53
7. REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICES	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AIM	<i>Ancestry informative marker</i>
ALT	Alanina aminotransferase
anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
C	Grupo controle
CA	Califórnia
CAPPesq	Comissão de ética para a análise de projetos de pesquisa
CLDN1	Receptor claudina 1
CRT-DST/AIDS	Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS
DAA	<i>Direct-acting antiviral</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DL	Desequilíbrio de ligação
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	<i>Expectation-maximization</i>
EphA2	<i>Ephrin receptor A2</i>
<i>et al.</i>	e outros
EUA	Estados Unidos da América

FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i>
<i>HBV</i>	<i>Hepatitis B virus</i>
HC-C	Hepatite C crônica
HCC	Hepatocarcinoma
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>HCV</i>	<i>Hepatitis C virus</i>
<i>HIV</i>	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>
IFN	Interferon
IFN- α	Interferon α
IFN- β	Interferon β
IFN- γ	Interferon γ
IFN- $\lambda 1$	Interferon $\lambda 1$
IFN- $\lambda 2$	Interferon $\lambda 2$
IFN- $\lambda 3$	Interferon $\lambda 3$
IFN- $\lambda 4$	Interferon $\lambda 4$
IFN- $\lambda R1$	Receptor 1 do IFN- λ
<i>IFNL1</i>	Gene que codifica IFN- $\lambda 1$
<i>IFNL2</i>	Gene que codifica IFN- $\lambda 2$
<i>IFNL3</i>	Gene que codifica IFN- $\lambda 3$
<i>IFNL4</i>	Gene que codifica IFN- $\lambda 4$

IL-10R2	Receptor 2 da interleucina 10
IL28A	Interleucina 28A
IL28B	Interleucina 28B
IL29A	Interleucina 29A
IMT-USP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IP	Inibidor de protease
IQR	<i>Interquartile range</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated gene</i>
ITPA	<i>Inosine triphosphate pyrophosphatase</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KIR	<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>
LD	<i>Lipid droplet</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LVP	<i>Lipoviral particle</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
mDC	<i>Myeloid dendritic cell</i>
NJ	Nova Jersey
NK	<i>Natural killer</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1-like cholesterol uptake receptor</i>
NR	Não-responder
NS	<i>Non-structural</i>
OCLN	Receptor ocludina
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>

ORF	<i>Open reading frame</i>
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
pDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PEG-IFN	Interferon peguilado
PEG-IFN- α 2a	Interferon peguilado α 2a
PEG-IFN- α 2b	Interferon peguilado α 2b
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
r^2	Desequilíbrio de ligação
RAV	<i>Resistance-associated variant</i>
RBV	Ribavirina
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA-HCV	RNA do vírus da hepatite C
RVR	Resposta virológica rápida
RVS	Resposta virológica sustentada
SC	Soroconversão espontânea
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>
SRB1	<i>Scavenger receptor B1</i>
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
STAT2	<i>Signal transducer and activator of transcription 2</i>

TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	<i>T helper 1</i>
Treg	Célula T reguladora
UTR	<i>Untranslated region</i>
VLDL	<i>Very low-density lipoprotein</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

UI/mL	Unidades internacionais/mililitro
kb	kilobase
°C	Graus centígrados
µL	microlitro
nm	nanômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Organização do genoma do <i>HCV</i> e proteínas virais codificadas	9
Figura 2.	Ciclo de replicação de <i>HCV</i>	12
Figura 3.	Respostas IFN tipo I e tipo III na infecção por <i>HCV</i>	15
Figura 4.	Organização genômica dos interferons tipo III em humanos	21
Figura 5.	Distribuição de haplótipos de rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T) e rs368234815 (ΔG/TT)	39
Figura 6.	Frequência do alelo do SNP rs368234815	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Gráfico em barras para a distribuição dos genótipos do SNP rs8099917 (TT, GT, GG) nos quatro grupos estudados	36
Gráfico 2-	Gráfico em barras para a distribuição dos genótipos do SNP rs12979860 (CC, CT, TT) nos quatro grupos estudados	37
Gráfico 3-	Gráfico em barras da distribuição dos genótipos do SNP rs368234815 (TT/TT, TT/ Δ G e Δ G/ Δ G) nos quatro grupos estudados	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Localização dos SNPs analisados	30
Tabela 2-	Características demográficas dos quatro grupos de pacientes estudados – HC-FMUSP e CRT-DST/AIDS	35
Tabela 3-	Análise estatística relacionando os polimorfismos rs8099917, rs12979860 e rs368234815 com a evolução clínica (HC-C ou SC) e a resposta ao tratamento (NR ou RVS) da infecção pelo <i>HCV</i>	38
Tabela 4-	Frequência dos haplótipos dos diferentes polimorfismos nos grupos estudados	40
Tabela 5-	Análise multivariada dos diferentes haplótipos encontrados de acordo com a evolução clínica (HC-C ou SC) e a resposta ao tratamento (NR ou RVS) da infecção pelo <i>HCV</i>	41

RESUMO

Nastri A.C.S.S. *Fatores genéticos associados ao clareamento espontâneo e resposta ao tratamento da infecção pelo vírus da hepatite C* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

O vírus da hepatite C (*HCV*) é uma importante causa de doença hepática crônica e de complicações associadas, tais como cirrose e hepatocarcinoma (HCC). Fatores virais e do hospedeiro são conhecidos preditores da terapia antiviral. Fatores do hospedeiro preditores da resposta viral sustentada (RVS) foram descobertos por estudos de associação genômica ampla (GWAS), correspondendo a polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *IFNL3* e *IFNL4* (rs8099917, rs12979860 e rs368234815). O objetivo do presente trabalho foi verificar as frequências genotípicas dos SNPs rs8099917, rs12979860 e rs368234815 e avaliar a associação entre estes SNPs e a evolução clínica e a resposta ao tratamento da infecção pelo *HCV* tendo em conta a ancestralidade genética da população estudada. Neste estudo, foi observada a associação dos três polimorfismos tanto com o desfecho clínico quanto com a resposta ao tratamento com interferon peguilado (PEG-IFN) e ribavirina (RBV). Os polimorfismos rs12979860 e rs368234815 foram associados com aumento da sensibilidade (respectivamente 97,7%, IC 95% 87,2-100, e 93,3%, IC 95% 81,3-98,3) e com um maior valor preditivo de uma resposta positiva ao tratamento. Na análise multivariada ajustada por sexo, idade e ancestralidade genética, o haplótipo G/T/ΔG foi relacionado com a não-resposta ao tratamento (OR = 21,09, IC 95% 5,33-83,51; $p < 0,001$) e com uma chance maior de desenvolver infecção crônica (OR = 5,46, IC 95% 2,06-14,46; $p = 0,001$), quando comparado com haplótipo T/C/TT. Estes resultados podem ajudar a ajustar políticas de tratamento para a infecção por *HCV* em populações com tais características genéticas, assim como nos permitem conhecer o perfil genético da nossa população em relação a esses polimorfismos.

Descritores: Polimorfismo de Nucleotídeo Único; Hepatite C; Resultado do Tratamento; Distribuição por Raça ou Etnia; Interferons; Marcadores Genéticos

SUMMARY

Nastri A.C.S.S. *Genetic factors associated with spontaneous clearance and response to treatment of hepatitis C infection* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease and associated complications such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Viral and host factors are known to be predictors for anti-viral therapy. Host factors predictors of sustained viral response (SVR) were discovered by Genome-Wide Association Studies (GWAS), including single nucleotide polymorphisms (SNPs) near or on genes *IFNL3* and *IFNL4* (rs8099917, rs12979860 and rs368234815). The aim of the present work was verify the genotype frequencies of SNPs rs8099917, rs12979860 and rs368234815, and evaluate the association between these SNPs and HCV infection outcome taking into account the genetic ancestry of the population. In this study, there was an association of the three polymorphisms with both clinical outcome and response to treatment with pegylated interferon (PEG-IFN) and ribavirin (RBV). The polymorphisms rs12979860 and rs368234815 showed increased sensitivity (97.7%, 95% CI 87.2-100, and 93.3%, 95% CI 81.3-98.3 respectively) and greater predictive value of a positive response to treatment. In multivariable analysis adjusted by gender, age and genetic ancestry, the haplotype G/T/ Δ G was related to non-response to treatment (OR = 21.09, 95% CI 5.33-83.51; $p < 0.001$) and to a higher chance to develop chronic infection (OR = 5.46, 95% CI 2.06-14.46; $p = 0.001$) when compared to haplotype T/C/TT. These findings may help to adjust our treatment policies for HCV infection in populations with such genetic characteristics, as well as allowing us to get to know the genetic profile of our population for these polymorphisms.

Descriptors: Single Nucleotide Polymorphism; Hepatitis C; Treatment Outcome; Race or Ethnic Group Distribution; Interferons; Genetic Markers

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. A hepatite C

A infecção pelo vírus da hepatite C (*HCV*, *hepatitis C virus*) é alvo de um imenso número de pesquisas científicas nos últimos anos pela grande importância que representa na saúde global e pela alta prevalência em meio à população mundial.

Vários estudos estimando a prevalência global e regional da infecção pelo *HCV* já foram realizados ao longo dos anos. Artigos recentes revisaram as taxas de prevalência que haviam sido determinadas em estudos previamente conduzidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (1). Gower e colaboradores, em 2014, propuseram revisar tanto os dados de soroprevalência - pessoas com sorologia anti-*HCV* positiva - quanto os dados de viremia com ácido ribonucleico do *HCV* (RNA-*HCV*, ribonucleic acid-*HCV*) detectado (2). Esta revisão visava a corrigir os prováveis números superestimados de prevalência da infecção, uma vez que os primeiros estudos consideravam apenas a sorologia anti-*HCV* positiva. Após a revisão dos dados, a prevalência global de anti-*HCV* foi estimada em 2,0% em adultos, caindo para 1,6% quando crianças são incluídas (2, 3). Essas taxas correspondem a um número absoluto de 104 a 115 milhões de pessoas que tiveram contato com o *HCV*. O número global de infectados com viremia detectada foi estimado em 64 a 103 milhões (2, 3). Este número é menor que o anterior, de 2005, que estimava 184 milhões de pessoas com sorologia anti-*HCV* positiva (3).

No Brasil, um grande estudo epidemiológico de prevalência sorológica de anticorpos anti-*HCV* foi realizado entre os anos de 2005 e 2009, com amostras das cinco macrorregiões do país e do Distrito Federal. A prevalência no país

como um todo foi de 1,38% e, na região sudeste, 1,27%, sendo que nesta encontrou-se o maior número absoluto de casos. (4)

1.1.1. História natural da doença

A grande maioria das infecções agudas pelo *HCV* são assintomáticas ou oligossintomáticas, o que dificulta o diagnóstico precoce da infecção. Quando presentes, os sinais e sintomas da hepatite C aguda são os clássicos das hepatites virais: desconforto abdominal, apatia, náuseas e vômitos, icterícia, acolia fecal e colúria.

Estima-se que apenas 20% das infecções agudas são sintomáticas (5). O período de incubação varia entre 4 a 15 semanas, média de 7 semanas (5). Muitas infecções agudas são detectadas apenas pelo aumento de enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com concomitante detecção do RNA viral no sangue do paciente. Tais elevações após procedimentos cirúrgicos, transfusões de hemoderivados, uso de drogas injetáveis ou outro mecanismo de transmissão do *HCV* sinalizam uma possível infecção aguda.

A infecção pelo *HCV* é auto-limitada em 10% a 45% das pessoas (6-8). O restante evolui com infecção crônica. A incidência da infecção aguda pelo *HCV* apresentou um aumento, nos Estados Unidos da América (EUA), de 850 casos em 2010 para 2138 casos em 2013 (9).

Formalmente, a infecção crônica é definida pela permanente detecção do RNA viral após 6 meses do contato inicial com o vírus (10). São diversos os fatores que estão associados a uma maior chance de cronicidade da infecção no ser humano (5), como: genótipo que não seja 2 ou 3 (11), maior idade do indivíduo no momento da infecção (principalmente acima dos 50 anos) (12), sexo

masculino (6), etnia e polimorfismos genéticos do hospedeiro, alvos deste estudo (13-17).

A infecção crônica pelo *HCV* ou hepatite C crônica (HC-C) é assintomática ou cursa com alguns sintomas inespecíficos de difícil correlação causal com a doença, como cansaço e depressão. Alguns pacientes ainda apresentam manifestações extra-hepáticas da HC-C. A manifestação mais bem estabelecida é a crioglobulinemia (18).

Outras doenças como líquen plano, diabetes, tireoidites, porfiria cutânea tarda e glomerulonefrite membranoproliferativa foram associadas à infecção pelo *HCV*. Tais fenômenos provavelmente seriam desencadeados pela ativação do sistema imunológico do hospedeiro criando um estado inflamatório sistêmico com ativação de múltiplas citocinas, o que levaria ao surgimento destas desordens clínicas. (19)

As complicações mais temidas da HC-C são a cirrose hepática, a falência hepática e o hepatocarcinoma (HCC), correspondendo às principais causas de óbito relacionadas ao *HCV*. A taxa de pacientes infectados que desenvolvem cirrose hepática, geralmente após 30 anos de HC-C, oscila entre 2% e 30% (5, 20)

Estima-se que o *HCV* seja responsável por um terço dos casos de HCC no mundo e este desenvolve-se em aproximadamente 1-4% dos casos de cirrose hepática (21).

1.1.2. Tratamento

A primeira droga disponível para tratamento do *HCV* foi o interferon (IFN), mais especificamente o IFN- α convencional, ainda em 1986, quando a infecção ainda era denominada hepatite pós-transfusional não-A não-B. Com a

monoterapia com IFN havia em média apenas 6% de resposta virológica sustentada (RVS) ao tratamento (22). A RVS é definida pela ausência de RNA viral detectável por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) seis meses após o término do tratamento.

Apenas em 1998 a ribavirina (RBV) foi liberada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para uso em associação com IFN- α levando ao aumento das chances de resposta virológica ao tratamento (23). Em 2001 foi liberado o primeiro interferon peguilado (PEG-IFN), o PEG-IFN- α 2b (PEG-Intron, Schering) para tratamento da HC-C e no mesmo ano liberou-se sua associação com RBV (24).

Em 2002, o PEG-IFN- α 2a (Pegasys, Genentech) também obteve liberação pelo FDA para tratamento da infecção pelo *HCV* e a associação com RBV. Estes novos medicamentos aumentaram ainda mais a chance de sucesso do tratamento.

Em 2009, ocorreram os primeiros estudos clínicos em humanos com esquemas terapêuticos livres de IFN. Em 13 de maio e 23 de maio de 2011, o FDA liberou, para tratamento de HC-C, o uso das primeiras drogas antivirais de ação direta (DAAs, *direct-acting antivirals*), respectivamente boceprevir e telaprevir, correspondendo aos primeiros inibidores de protease (IPs), em associação com PEG-IFN e RBV. Os IPs bloqueiam a protease viral NS3/4A.

No Brasil, estas drogas foram liberadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 25 de julho de 2011 e 28 de outubro de 2011, respectivamente. Porém, tais drogas, chamadas de IPs de primeira geração, apenas podem ser usadas para *HCV* genótipo 1.

Em 2013, nos EUA, a segunda geração de DAAs iniciou-se com a aprovação do simeprevir, também um IP, para tratamento de *HCV* genótipo 1. Esta nova droga ainda deveria ser usada em conjunto com PEG-IFN e RBV. Em dezembro do mesmo ano, o sofosbuvir, o primeiro inibidor de polimerase, foi aprovado pelo FDA para tratamento de infecção pelo *HCV* para genótipos 1, 2, 3 e 4. Pela primeira vez, poderia ser realizado um tratamento livre de IFN com a associação de sofosbuvir e RBV.

Em 10 de outubro de 2014, houve a liberação da primeira associação de drogas em um único comprimido, a combinação de sofosbuvir e ledipasvir (inibidor de NS5A). Mais tarde, em 6 de novembro do mesmo ano, houve a liberação nos Estados Unidos do uso de simeprevir e sofosbuvir sem IFN e RBV para tratamento de HC-C.

No Brasil, a aprovação dos novos DAAs (simeprevir, daclatasvir e sofosbuvir) para tratamento da hepatite C ocorreu em julho de 2015. Outras drogas em estudo poderão ser aprovadas em um futuro próximo para tratamento de HC-C. Estas últimas terapias trouxeram um grande avanço para o controle da HC-C, porém seu custo ainda é muito elevado para políticas públicas de saúde de diversos países. Os tratamentos para *HCV* com IFN ainda serão utilizados em alguns locais do mundo nos próximos anos.

Alguns fatores de melhor resposta ao tratamento com IFN e RBV são conhecidos, como: etnia (asiáticos e caucasianos), sexo (feminino), idade (<40 anos), genótipo viral (2 e 3), carga viral no início do tratamento (carga viral baixa <600.000 UI/ml), carga viral na quarta semana de tratamento (RNA-*HCV* negativo após 4 semanas de tratamento ou resposta virológica rápida (RVR)), tipo de antígeno leucocitário humano (HLA, *human leukocyte antigen*), grau de

fibrose (fibrose F0, F1 e F2) e polimorfismos nos genes *IFNL3* e *IFNL4*. (17, 25-29)

1.1.3. Vias de transmissão

O *HCV* pode ser transmitido por via parenteral, via sexual e de mãe para filho (transmissão vertical). A via parenteral é sem dúvida a mais importante, sendo a transfusão de hemoderivados o meio preponderante de transmissão. Nos últimos anos este meio de transmissão foi quase totalmente eliminado nos países desenvolvidos com as precauções universais utilizadas nestes procedimentos. Acidentes com materiais perfuro-cortantes também podem transmitir o *HCV* (em 1% a 5% dos casos), lembrando que o inóculo viral é importante neste tipo de transmissão.

O sangue onde não é detectado material genético do vírus dificilmente transmitirá a doença (30, 31). O compartilhamento de material para injeção de drogas tornou-se a principal fonte de infecção nos países desenvolvidos. Em grupos de usuários de drogas ilícitas a prevalência de sorologia anti-*HCV* positiva pode variar de 31% a 98% (21, 32, 33). Em alguns países em desenvolvimento, a reutilização de seringas e agulhas ainda acontece, representando uma importante fonte de transmissão de *HCV* (21). Práticas como tatuagem, colocação de *piercing*, acupuntura, manicure, procedimentos cosméticos e rituais religiosos também podem levar à transmissão do *HCV* (21).

A transmissão através de mucosas é descrita, principalmente, quando há contato de sangue contaminado com a mucosa dos olhos e em usuários de drogas inalatórias ao compartilhar material para inalação (31).

A eficácia da via de transmissão sexual pode ser questionada, porém há várias descrições de transmissões por esta via, principalmente em homens que têm relações sexuais com homens. Por outro lado, casais monogâmicos que possuem sorologias anti-*HCV* divergentes continuaram, após longa data, divergentes para o anti-*HCV* (31, 34).

A taxa de transmissão vertical do *HCV* parece ser muito baixa e sua incidência foi relatada em 3% a 10% (35). O risco de transmissão aumenta em mães infectadas pelo *HIV*, usuárias de drogas e com altos níveis de RNA-*HCV* no sangue (35).

1.2. O vírus da hepatite C

O *HCV* pertence ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae*, possui genoma RNA fita simples, polaridade positiva com aproximadamente 9,6-kb. As partículas virais medem de 50nm a 80nm de diâmetro. O genoma é composto de regiões não traduzidas (UTRs, *untranslated regions*) 5' e 3' margeando uma longa sequência de fase de leitura aberta (ORF, *open reading frame*), a qual é traduzida a partir de uma sequência especializada de RNA, chamada sítio interno de entrada ao ribossomo (IRES, *internal ribosome entry site*) que se ligará ao ribossomo do hospedeiro (Figura 1). A poliproteína resultante produzirá as proteínas estruturais *core*, E1 e E2 e as não-estruturais (NS, *non-structural*) p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. (36)

Figura 1. Organização do genoma do HCV e proteínas virais codificadas.

O genoma do HCV, que consiste de uma única fase de leitura aberta de 9,6-kb com duas regiões não traduzidas (UTR, *untranslated region*) nas extremidades, denominadas 5'-UTR e 3'-UTR, é traduzido usando um sítio interno de entrada ao ribossomo (IRES, *internal ribosome entry site*) para produzir uma poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. Proteases celulares e virais medeiam a clivagem proteolítica da poliproteína em três proteínas estruturais (*core*, E1 e E2) e as proteínas não estruturais p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B. Os sítios clivados pela peptidase de sinal celular, pela peptidase de peptídeo-sinal e pela protease NS3 / NS4A são assinalados por setas azuis e verdes e cabeças de seta vermelhas, respectivamente, e o sítio autoproteolítico NS2 / NS3 é indicado por uma seta vermelha. As proteínas *core*, E1 e E2 formam o vírion. As proteínas NS2 e P7 participam da montagem das partículas virais. As proteínas NS3, NS4B e NS5A são essenciais tanto para a replicação quanto para a montagem viral, e as proteínas NS4A e NS5B têm função na replicação viral. O trato poli-U/UC localizado na extremidade 3'-UTR também é representado

Devido à alta variabilidade genética, o *HCV* é classificado em sete genótipos (com aproximadamente 30% de variação na sequência genética), sendo o sétimo genótipo descrito no Canadá, em 2007, a partir de uma amostra de sangue de um indivíduo originário da República Democrática do Congo. (37)

Desde 1989, quando o *HCV* foi identificado (38) como o causador da afecção clínica hepatite pós-transfusional não-A não-B (34), a ciência avançou muito com relação a métodos diagnósticos, à fisiopatogenia da doença e principalmente às opções terapêuticas. O único modelo animal para o estudo da infecção pelo *HCV* são os chimpanzés, principalmente usados para estudos de vacinas contra *HCV* e sobre imunidade adaptativa do hospedeiro.

Estudos com camundongos enxertados com hepatócitos humanos também são utilizados, porém com utilidade limitada (25). Uma grande dificuldade foi desenvolver modelos experimentais de cultura celular para *HCV*. Em 1999, finalmente foi identificada uma linhagem de células selecionadas de um hepatoma humano que foi promissora para a montagem de um sistema de replicação de uma cepa de *HCV* genótipo 1; esta linhagem é conhecida como Huh-7 (39).

Em 2003, estudos para elucidar o mecanismo de entrada viral na célula e possíveis anticorpos neutralizantes para estes alvos foram possíveis utilizando as glicoproteínas virais E1 e E2 montadas em partículas de lentivírus. (40) Em 2005, conseguiu-se reproduzir uma cultura celular com partículas infectantes de *HCV*, a partir de uma cepa JFH1 de genótipo 2a e células Huh-7 (41), o que gerou uma grande contribuição para o entendimento do ciclo viral do *HCV* e a identificação de possíveis alvos terapêuticos. Atualmente já é possível obter

sistemas eficientes de replicação viral *in vivo* utilizando cepas de genótipo 1a, 2a e 2b (42, 43).

1.2.1. Mecanismos de entrada e replicação do HCV

As glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, são as principais responsáveis pela entrada do vírus nas células do hospedeiro. Sabe-se que o HCV está fortemente ligado a lipoproteínas de baixa densidade, VLDL e LDL (44, 45). As apolipoproteínas como ApoE, ApoB, ApoA1, ApoC1, ApoC2 e ApoC3 também podem estar associadas às partículas virais formando assim a partícula lipoviral (LVP, *lipoviral particle*) (46, 47).

O primeiro contato do vírus com o hepatócito dá-se na superfície basolateral desta célula onde ocorre a ligação das glicoproteínas virais e/ou ApoE com os proteoglicanos de heparan-sulfato syndecan-1 ou syndecan-4 ou receptor SRB1 (*scavenger receptor B1*) (41). A entrada do vírus na célula envolve os receptores celulares tetraspanina CD81, proteínas de *tight junction* claudina-1 (CLDN1) e ocludina (OCLN). O papel de cada um destes receptores não está totalmente esclarecido. Entretanto, indícios sugerem que a proteína CD81 tem papel essencial no ciclo viral quando liga-se a aminoácidos da glicoproteína E2 (Figura 2).

Além destes receptores, outras moléculas da membrana celular estão envolvidas na internalização do vírus, como o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR, *epidermal growth factor receptor*), o receptor de efrina A2 (EphA2, *ephrin receptor A2*) e o receptor NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol uptake receptor*).

Modificado de Wong MT, *et al.* Cell Mol Immunol. 2016;13(1):11-35

Figura 2. Ciclo de replicação de HCV. O HCV LVP (partícula lipoviral do HCV) tem sua superfície revestida por ApoB e ApoE, que são representadas na figura por listras azuis e verdes, respectivamente. O LVP liga-se ao SRB1 e ao CD81 e em seguida interage com CLDN1 e OCLN. A entrada do vírus na célula prossegue através de endocitose mediada por receptor na superfície da célula. Em seguida à internalização, o envelope viral funde-se com a membrana endossomal sob pH ácido, e o genoma viral é desrevestido e liberado para o citoplasma. O RNA viral é traduzido no retículo endoplasmático (RE) para produzir a poliproteína, que é subsequentemente transformada em proteínas estruturais e não estruturais. Proteínas virais não-estruturais, em conjunto com fatores do hospedeiro, formam uma rede membranosa onde ocorre a replicação do RNA viral. A montagem da partícula do HCV mais provavelmente inicia-se próximo ao RE e a gotículas lipídicas (LDs, *lipid droplets*), onde a proteína do core e o RNA viral acumulam-se. Finalmente, as partículas de HCV são secretadas para o meio extracelular através da via secretora

Os receptores CD81 e CLDN1 formam um complexo que é internalizado juntamente com o vírus. O vírus adentra o citoplasma através de um processo dependente do transporte retrógrado intracelular (48). O vírus é então transportado pelas proteínas Rab5a para os endossomas recentes ao longo das fibras de estresse actina, onde a fusão do vírus com a membrana endossomal parece ocorrer. Após a fusão, o genoma viral é liberado para o citoplasma onde ocorrerá a tradução do genoma e produção das proteínas virais.

A tradução do genoma viral que ocorre no retículo endoplasmático (RE) rugoso resultará na produção de uma poliproteína a qual será clivada dando origem às proteínas virais estruturais e não-estruturais (complexo NS). As proteínas do complexo NS, excetuando-se a NS2, induzem um rearranjo nas membranas intracelulares formando uma rede membranosa próximo ao núcleo celular, rica em lipídeos, onde ocorrerá a fase final da replicação e montagem da partícula viral (49, 50).

1.2.2. Ativação do estado antiviral

Na infecção pelo *HCV*, vírus e hospedeiro mantêm um estado homeostático onde o organismo controla estreitamente a replicação viral para que não leve o hospedeiro à morte.

Após a infecção, o RNA viral, através dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), é detectado pelos receptores de reconhecimento de padrão celular (PRRs, *pattern recognition receptors*) do hospedeiro. As moléculas denominadas gene induzível por ácido retinóico I (RIG-I, *retinoic acid inducible gene I*), receptores

toll-like (TLR, *toll-like receptors*) endossomais e gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA5, *melanoma differentiation-associated gene 5*) são consideradas PRRs. Os PRRs recrutam proteínas adaptadoras, que desencadeiam uma cascata de sinalização culminando na produção de IFN tipo I e tipo III pela célula infectada (Figura 3a,b) (51).

Ao ligarem-se aos receptores na superfície celular, os IFNs tipo I e tipo III promovem a ativação da Janus quinase (JAK, *Janus kinase*). Uma vez ativada, a JAK fosforilada recruta os fatores de transcrição conhecidos como transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STATs, *signal transducers and activators of transcription*), localizados no citoplasma da célula (Figura 3c) (51). Estes fatores levam à síntese de mais de 300 genes estimulados por IFN, os ISGs (*interferon-stimulated genes*) que bloqueiam a replicação viral em diversas fases do ciclo viral. Estes genes são expressos geralmente após uma infecção viral ou após o tratamento com IFN. Devido ao grande número de ISGs e suas diferentes modulações na resposta inata, a relação vírus-hospedeiro alcança uma enorme complexidade. Novos ISGs são constantemente adicionados a esta lista e a total compreensão de suas funções está longe de ser atingida.

Modificado de Shin EC, *et al.* Nat Rev Immunol. 2016;16(8):509-23

Figura 3. Respostas IFN tipo I e tipo III na infecção por HCV. a) O RNA HCV é reconhecido pelo RIG-I, pelo MDA5 e pelo TLR3 em hepatócitos infectados, resultando na indução de IFN-λ, IFN-β e outras citocinas pró-inflamatórias. As células dendríticas plasmocitoides (pDCs, *plasmacytoid dendritic cells*) reconhecem exossomos contendo RNA HCV que são liberadas de hepatócitos infectados e respondem produzindo IFNs tipo I. A protease NS3-NS4A HCV (representada por tesouras na figura) cliva MAVS e TRIF, um mecanismo para interferir na resposta IFN. Entretanto, IFNs ainda são produzidos, e os genes estimulados por IFN (ISGs) são induzidos nos hepatócitos infectados. b) Quando os IFNs tipo I e tipo III ligam-se aos seus receptores, o ISGF3 – constituído de STAT1, STAT2 e IRF9 – induz a expressão de ISGs. Na fase crônica, a expressão de ISGs é mantida por ISGF3 não-fosforilado (U-ISGF3). c) O ISG15, expressado nas células infectadas por HCV, estabiliza a proteína USP18, a qual bloqueia os sinais transmitidos pelos receptores de IFN-α/β. Em consequência, as células infectadas pelo HCV tornam-se irresponsivas ao IFN-α exógeno, incluindo o tratamento com PEG-IFN-α

1.2.3. Interferons

Interferons são citocinas que medeiam a resposta imune do hospedeiro contra infecções por microorganismos, principalmente virais. Os mamíferos possuem três classes de IFNs: tipo I (IFN- α e IFN- β), tipo II (IFN- γ) e tipo III (IFN- λ s). Os IFNs tipo I e III induzem uma forte reação antiviral e imunomodulatória na resposta inata. Porém, enquanto quase todas as células nucleadas respondem ao IFN tipo I, a ação do IFN tipo III está restrita a somente alguns tipos celulares com alto grau de exposição à infecções virais, como mucosa intestinal e epitélio respiratório (52). Também a produção e a liberação de IFN tipo III ocorrem em poucos tipos celulares tais como hepatócitos, epitélio intestinal e células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) (53). São quatro atualmente os IFN- λ s, e seus receptores são heterodímeros compostos de duas cadeias: uma cadeia de alta afinidade, a IFN- λ R1, e uma cadeia de baixa afinidade, a IL-10R2, que é compartilhada com outras citocinas (53).

1.2.4. Imunologia na infecção pelo HCV

A resposta imune do hospedeiro à infecção pelo HCV constitui-se da resposta imune inata e da resposta imune adaptativa.

Após o reconhecimento do vírus pelo hospedeiro, as células infectadas produzem IFN tipo I (α , β) e tipo III (λ) com a consequente indução dos ISGs (51). Isso corresponde a uma tentativa de criar um ambiente antiviral e controlar a infecção, polarizando a resposta imune para uma resposta tipo Th1 (*T helper* 1). Curiosamente, foi constatado que os principais interferons produzidos pelas

células do fígado infectadas pelo *HCV* são os IFN- λ s e não os IFNs tipo I (54). Concomitantemente à produção de ISGs, o RNA viral continua a ser detectado, o que mantém uma suprarregulação (*up-regulation*) destes genes. Porém, vários estudos mostraram que altos níveis de ISGs estavam associados a uma pior resposta ao tratamento com PEG-IFN e RBV (55, 56) e piores taxas de resolução espontânea da infecção. Sung *et al.* sugerem que a manutenção elevada da expressão de alguns ISGs (ISG15) levaria a um estado de refratariedade ao PEG-IFN (57).

Na fase da resposta imune inata, as principais células no fígado são as células NK (*natural killer-cells*), que desempenham um papel importante no controle da infecção. Estudos genéticos demonstraram que associações de HLA-C e haplótipos dos genes KIR (*killer-cell immunoglobulin-like receptor*) - KIR2DL3 - estão associados à resolução espontânea da infecção pelo *HCV* (58). As DCs têm um papel importante na resposta imune inata em razão de sua interação com células NK. As BDCA3⁺ DCs, que correspondem a uma subpopulação de DCs, são importante fonte de IFN- λ s (59, 60).

As DCs migram para os órgãos-alvo de infecções onde inflamação e apoptose estão ocorrendo. Uma vez nestes locais, as DCs podem apresentar uma função tanto supressora quanto exacerbadora destas condições imunológicas. A função dos dois grupos principais das DCs, mielóides e plasmocitóides (respectivamente mDCs e pDCs, *myeloid dendritic cells* e *plasmacytoid dendritic cells*) na infecção pelo *HCV* ainda é controversa. Durante a infecção crônica pelo *HCV*, verifica-se que mDCs e pDCs estão funcionalmente prejudicadas (61). Este comprometimento funcional das DCs está associado com o fenômeno de exaustão de células T CD8⁺ (62).

Não se sabe ao certo o motivo pelo qual a resposta imune adaptativa contra o *HCV* demora algumas semanas para se estabelecer.

Sabe-se que a resposta de células T CD4⁺ é indispensável para o desenvolvimento de uma resposta de células T CD8⁺ efetiva contra a infecção pelo *HCV* (63). A resposta efetiva à infecção pelo *HCV* depende de uma forte e sustentada reação destas duas populações celulares. Foi demonstrado que, em casos de cronicidade da infecção, células T CD4⁺ *HCV*-específicas estão funcionalmente comprometidas (64). Estudos mostram que as células CD4⁺ têm um papel primordialmente regulatório durante a infecção, enquanto as células T CD8⁺ *HCV*-específicas são primordialmente efetoras (63, 65). Células T CD8⁺ estão diretamente envolvidas na inflamação do fígado induzida pelo *HCV* (66).

Em determinado estudo de Pestka *et al.*, os anticorpos produzidos contra proteínas estruturais e não-estruturais do *HCV* não apresentaram nenhuma atividade antiviral relevante (67). Apenas uma pequena porção mostrou-se capaz de inibir a ligação ou entrada do vírus na célula. Porém, o controle da infecção viral foi observado na ausência destes anticorpos neutralizantes e em pessoas com agamaglobulinemia.

De acordo com um conceito imunológico denominado exaustão de células T, as células T antígeno-específicas tornam-se hiporresponsivas ao estímulo antigênico contínuo, diminuindo sua proliferação e a produção de citocinas, quando há exposição contínua a grandes quantidades de proteínas virais, o que resulta na persistência da infecção viral. Atualmente, vários estudos apontam como um dos indutores da exaustão de células T a expressão da molécula proteína de morte celular programada (PD-1, *programmed cell death protein 1*) em células T CD8⁺ *HCV*-específicas (68, 69). Nakamoto *et al.*

sugeriram que a via PD-1 ou de seu ligante PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) poderia ser um novo alvo terapêutico contra o *HCV*, uma vez que se verificou restauração, *in vitro*, da resposta de células T CD8+ *HCV*-específicas na presença de anticorpos contra o PD-L1 (70).

Outro componente celular presente na reação imune ao *HCV* são as células T reguladoras (Tregs). Estas células são capazes de suprimir atividade de células NK, DCs e células T *HCV*-específicas. Sua presença aumentada no fígado teria o objetivo de diminuir o dano hepático colateral à infecção. Seu papel na resposta imune ao *HCV* não está totalmente elucidado (71).

1.2.5. Polimorfismos genéticos associados à evolução clínica da infecção pelo *HCV* e ao tratamento da HC-C

Estudos de associação genômica ampla (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) podem identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) associados a doenças ou manifestações clínicas de interesse dentro de um grupo de indivíduos e sua distribuição em diferentes populações, que podem prever riscos para determinadas doenças. O projeto HapMap é um esforço mundial que objetiva mapear variações genéticas no genoma humano e entender como estas se distribuem entre diferentes populações de diversas partes do mundo (72).

A definição moderna de polimorfismo genético abriga o conceito de que o fenótipo causado por homozigose de um SNP com uma frequência de 1% tem uma frequência na população de 1 em 10000 indivíduos (73). Aqueles com frequência menor que 1% são considerados como patogênicos ou potencialmente patogênicos e em geral referidos pelo termo “mutações”. O

polimorfismo mais comum é o de mutação em uma única base na sequência de ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*) que substitui um nucleotídeo por outro, sendo conhecido como SNP.

Um destes estudos GWAS que foi bem sucedido correlacionou determinados polimorfismos genéticos à resposta ao tratamento da HC-C com IFN e RBV. Em 2009, alguns estudos mostraram que variantes alélicas no gene da interleucina 28B (*IL28B*), correspondendo aos SNPs rs12979860 genótipo CC e rs8099917 genótipo TT, estão associados com RVS quando pacientes com HC-C são tratados com PEG-IFN e RBV (13, 14, 16). Vários outros estudos confirmaram e reproduziram estes achados (74, 75). Entretanto, houve algumas diferenças nos resultados conforme a etnia da população estudada, onde o SNP rs8099917 teve maior papel preditor de resposta em pacientes asiáticos quando comparado ao rs8099917 (16, 76). Estes dois SNPs encontram-se no cromossomo 19 em forte desequilíbrio de ligação (DL) (Figura 4).

Em 2012, o HUGO (*Human Genome Organisation*) *Nomenclature Committee* modificou a nomenclatura oficial dos genes *IL29*, *IL28A* e *IL28B*, que passaram a ser denominados *IFNL1*, *IFNL2*, *IFNL3*, respectivamente. As proteínas transcritas por estes genes são designadas IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 (77).

Em 2013, Prokunina-Olsson *et al.* postularam a descoberta de um novo polimorfismo dinucleotídeo (ss469415590, Δ G/TT), localizado entre o *IFNL3* e o *IFNL2*, no éxon 1 do gene *IFNL4* (17). Esta variante genética posteriormente foi denominada rs368234815. Neste mesmo estudo foi constatado que o SNP

rs12979860 está localizado no íntron 1 do gene *IFNL4*, sendo mais corretamente denominado *IFNL4* rs12979860 (Figura 4).

Cromossomo humano 19q13.13-2

Modificado de Wack A, et al. Nature Immunology. 2015;16:802-8

Figura 4. Organização genômica dos interferons tipo III em humanos.

A expressão do gene *IFNL4* é definida por uma variante dinucleotídeo de deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) hereditário, denominada *IFNL4*-ΔG/TT (agora rs368234815, originalmente ss469415590) (17).

A presença da variante *IFNL4*-ΔG permite a transcrição do *IFNL4* e a produção de um novo interferon, IFN-λ4, pela presença de uma ORF que não pode ser decodificada em indivíduos homozigotos *IFNL4*-TT, uma vez que este alelo altera a ORF e não permite que esta seja transcrita (17). O genótipo *IFNL4*-ΔG está associado com uma resposta pior do hospedeiro ao tratamento com PEG-IFN e RBV e com a cronicidade da infecção pelo HCV (17, 78).

Noureddin *et al.* evidenciaram que o genótipo *IFNL4-ΔG* está associado com altos níveis de ISGs na infecção crônica pelo *HCV* e que grande quantidade de ISG15 nestes pacientes é fortemente associado à expressão de IFN-λ4 (Figura 3c) (79).

Uma vez reconhecida a importância do polimorfismo do gene *IFNL3* como fator preditor de resposta a tratamento, tentou-se elucidar o papel do IFN produzido por este gene na resolução da infecção pelo *HCV*.

Estudos descrevendo frequências alélicas e genotípicas de rs12979860, rs8099917 e rs368234815, particularmente este último, são escassos no Brasil, e não há estudos relacionando os haplótipos destes três polimorfismos com resposta ao tratamento e resolução espontânea da infecção pelo *HCV*. Devido às dimensões continentais e à história da colonização brasileira, grande variação étnica é encontrada no nosso meio, resultante de intensa miscigenação.

Como as relações causais entre fatores genéticos e desfechos clínicos da infecção pelo *HCV* têm intrínseca a questão étnica, populações com características étnicas particulares devem ser incluídas em estudos para que se confirmem ou não as relações propostas anteriormente pela literatura. Com o objetivo de estudar a frequência dos SNPs acima citados em indivíduos infectados pelo *HCV* genótipo 1 com diferentes cursos clínicos da infecção em uma população miscigenada, visamos comparar nossos resultados com os dados da literatura mundial. Teríamos o mesmo perfil de resultado de estudos realizados com populações caucasianas, afrodescendentes ou ameríndias? As relações causais dos SNPs com os diversos desfechos clínicos manter-se-iam os mesmos?

Objetivo

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar a frequência dos genótipos e haplótipos dos SNPs rs12979860, rs8099917 e rs368234815 (localizados no cromossomo 19q13) de indivíduos infectados pelo *HCV* genótipo 1 estratificados de acordo com seu perfil de marcadores genéticos de ancestralidade.

Objetivo Específico:

Analisar a associação entre os genótipos e haplótipos dos SNPs estudados com o curso clínico da infecção:

- Resolução espontânea da infecção pelo *HCV*
- RVS ao tratamento da HC-C
- Não-resposta ao tratamento da HC-C

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Os participantes voluntários incluídos neste estudo foram indivíduos com antecedentes de infecção pelo *HCV* encaminhados ao Ambulatório de Hepatites do Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS (CRT-DST/AIDS), ao Ambulatório de Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e ao Ambulatório da Divisão de Clínica das Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP que concordaram em participar estando cientes dos riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq HC-FMUSP protocolo nº 0462/11 em 23/11/2011).

3.2. Casuística

Os participantes deste estudo foram selecionados e subdivididos em quatro grupos de acordo com os seguintes critérios:

Grupo 1 – Soroconversão espontânea (SC) - 51 indivíduos com histórico de resolução espontânea da infecção pelo *HCV* - caracterizado pela ausência de RNA viral detectável por PCR, simultaneamente à detecção de anticorpos anti-*HCV* por ensaio imunoenzimático (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) em ao menos dois momentos distintos, com pelo menos

seis meses de intervalo entre os testes, segundo a rotina laboratorial do serviço envolvido. Os resultados positivos obtidos no teste ELISA foram confirmados pelo teste de Imunoblot em tiras (CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SAI, CHIRON, Emeryville, CA, EUA).

Grupo 2 – Resposta virológica sustentada (RVS) - 49 pacientes com infecção crônica pelo HCV (genótipo 1) e RVS ao tratamento com IFN convencional ou PEG-IFN associado com RBV - os pacientes com infecção crônica foram caracterizados por sorologia positiva para HCV (detecção de anticorpos anti-HCV no teste ELISA de 3ª geração) e pela detecção de RNA viral por técnica de PCR. A RVS é definida pela ausência de RNA viral detectável por técnica de PCR seis meses após o término do tratamento.

Grupo 3 – Não-respondedores (NR) - 45 pacientes com infecção crônica pelo HCV (genótipo 1) e não-respondedores ao tratamento com PEG-IFN associado com RBV, isto é, com RNA viral detectável na 24ª semana de tratamento.

Grupo 4 – Controle (C) - 157 pacientes sem infecção pelo HCV, pelo HIV ou pelo vírus da hepatite B (HBV).

Os indivíduos com sorologia positiva para HIV e o HBV foram excluídos do estudo. Os casos foram selecionados de maneira retrospectiva e prospectiva.

Todos os pacientes do grupo 2 e 3 apresentavam dados de fibrose hepática obtidos por biópsia do fígado antes do tratamento (no máximo nos 24 meses que precederam o tratamento), exceto para pacientes com diagnóstico clínico-laboratorial e ultrassonográfico de cirrose hepática. Sinais ultrassonográficos de cirrose incluem: heterogeneidade ecotextural do

parênquima hepático, irregularidade ou nodulação da superfície hepática (sensibilidade de 88% e especificidade de 82% a 95%) (80), atrofia/hipertrofia segmentar hepática, dilatação da veia porta, veia colaterais portossistêmicas, fluxo portal hepatofugal, esplenomegalia e ascite, além de outros sinais de hipertensão portal. (80) Não foi possível obter dados de RNA-*HCV* de todos os pacientes, pois a informação não estava disponível para todos.

3.3. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, *ethylenediamine tetraacetic acid*) (BD Vacutainer® Blood Collection Tube, NJ, EUA). As amostras coletadas foram encaminhadas ao laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-USP) para a realização das técnicas de biologia molecular.

3.4. Extração e quantificação de ácidos nucleicos

A extração de DNA foi feita utilizando o QIAamp DNA® Blood mini kit (Qiagen®, Hilden, Alemanha), tendo sido seguidas as orientações do fabricante. O DNA foi eluído em 50 µL de tampão de eluição e armazenado a -80°C até o momento do uso. Para a quantificação de DNA foi utilizado o fluorímetro Qubit (Fluorometer. Qubit® 2.0. Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

3.5. Detecção e genotipagem dos SNPs

A partir do DNA extraído, foram detectados e genotipados os SNPs: rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T) e rs368234815 (TT/ Δ G), localizados no braço longo do cromossomo 19. Para a realização da detecção e genotipagem desses polimorfismos, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Foram utilizados ensaios pré-desenhados TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Entretanto, para os SNPs rs12979860 e rs368234815, o ensaio foi customizado, ou seja, a sequência do gene contendo o polimorfismo de interesse foi enviada ao fabricante e a partir dela foram desenhados os iniciadores e as sondas (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, EUA).

Esses ensaios baseiam-se na amplificação e detecção de alelos específicos em amostras de DNA genômico. Durante a etapa de amplificação, a enzima Taq DNA polimerase amplifica o DNA utilizando iniciadores específicos, e as sondas TaqMan® MGB, ligadas ao DNA alvo, são degradadas durante a extensão das fitas de DNA. A partir desse momento, as sondas passam a emitir um sinal de fluorescência, que é detectada pelo equipamento. Uma vez que as sondas são alelo-específicas e apresentam fluorescências distintas, a diferenciação dos alelos dá-se pela cor emitida. Os ensaios utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Localização dos SNPs analisados

GENE	CROMOSSOMO	POSIÇÃO	POLIMORFISMO	CÓDIGO DO ENSAIO
<i>IFNL3</i>	19q13.13	rs8099917	T/G	C_11710096_10 [*]
<i>IFNL4</i>		rs12979860	C/T	customizado
		rs368234815	ΔG/TT	customizado

*código Applied Biosystems

3.6. Ancestralidade genética

Em populações com miscigenação recente, ocorre uma estratificação populacional, na qual a proporção do material genético dos ancestrais de cada subpopulação varia entre os indivíduos dessa população. Para avaliar a composição destas populações, o método utilizado foi a associação estruturada. Ele usa um conjunto de marcadores genéticos para estimar a ancestralidade genética do indivíduo, e então testa essa associação com correção para mistura genética de cada indivíduo (81).

Um painel de 48 marcadores de ancestralidade (AIMs, *ancestry informative markers*) foi usado para distinguir populações continentais, especificamente europeus, africanos (sub-saarianos) e nativos americanos. O protocolo utilizado foi o mesmo descrito anteriormente por Santos *et al.* (2010), brevemente descrito a seguir (82). Os marcadores foram genotipados usando um seqüenciador automático de DNA (ABI PRISM1 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) e analisados utilizando o programa GeneMapper1 ID v3.2 (Applied Biosystems). A identificação dos alelos foi realizada com referência ao padrão ABIGS LIZ-500 (Applied Biosystems). O controle de qualidade para cada alelo

foi garantido pela análise simultânea de uma amostra de controle de tamanho conhecido.

3.7. Análise de dados

A análise estatística foi realizada utilizando o programa R Foundation for Statistical Computing (versão 2.15.3, R Development Core Team 2008, Viena, Áustria). As análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis e os resultados foram apresentados em forma gráfica para melhor interpretação das informações mais relevantes.

A análise das frequências dos alelos utilizou o teste qui-quadrado (χ^2) com 1 grau de liberdade e alfa 5%.

Para analisar a hipótese de associação entre cada SNP e resultado da evolução clínica do HCV foram usados os seguintes métodos estatísticos: teste χ^2 e teste exato de Fisher com correção de Holm.

As populações dos grupos foram submetidas ao teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE, *Hardy-Weinberg equilibrium*) e de DL.

As variáveis quantitativas foram expressas utilizando mediana com intervalo interquartil (IQR, *interquartile range*), e as variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de frequência (percentual). As frequências das características demográficas foram comparadas entre os grupos utilizando o teste χ^2 e teste exato de Fisher com correção de Holm (83). As frequências genotípicas para todos os polimorfismos investigados foram testados quanto a consistência por meio dos testes de HWE e o DL (valor r^2). As análises foram realizadas também com a correção de Holm (83). Os SNPs foram testados

comparando a presença de duas cópias do alelo menor *versus* uma cópia ou nenhuma (modelo recessivo). Um modelo de logística multivariada ajustada por idade, sexo e etnia foi aplicado para os genótipos e haplótipos. Para os haplótipos, o algoritmo de maximização das expectativas (EM, *expectation-maximization*) foi utilizado, considerando uma frequência mínima de 1% e satisfeito o pressuposto do HWE (84). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R Foundation for Statistical Computing (versão 3.1.2, R Development Core Team 2014, Viena, Áustria) e um valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

4. RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos um total de 302 indivíduos, divididos em quatro grupos (Tabela 2). A população estudada mostrou-se homogênea em relação à variável idade ($p=0,298$), com medianas de 45 (35-52,5), 48 (40-57) e 45 (35-52) nos grupos SC, RVS e NR, respectivamente. Quanto ao sexo, também houve homogeneidade entre os grupos, com predomínio do sexo feminino nos grupos SC, RVS e NR, 56,9%, 59,2% e 57,9%, respectivamente ($p=0,679$).

Em relação à análise dos marcadores de ancestralidade (Tabela 2), a contribuição de marcadores genéticos europeus foi dominante em todos os três grupos. No entanto, o grupo SC apresentou menor frequência destes marcadores quando comparado com o grupo RVS ($p=0,003$). A maioria da população de RVS e o grupo NR mostram perfil Metavir com fibrose grau 0 a 2, sem diferenças estatísticas. No entanto, foi observada uma diferença significativa entre o perfil Metavir com fibrose de grau 3-4 ($p=0,037$).

Tabela 2 - Características demográficas dos quatro grupos de pacientes estudados – HC-FMUSP e CRT-DST/AIDS

	Soroconversão espontânea (SC) n= 51	Resposta Viroológica Sustentada (RVS) n=49	Não-respondedor (NR) n=45	Controle saudável (C) n=157	p valor
Idade, mediana (IQR)	45 (35-52,5)	48 (40-57)	45 (35-52)	39 (30-51)	0.006 [#]
Gênero, n(%)					
Feminino	29 (56,9%)	29 (59,2%)	26 (57,8%)	80 (51%)	0.679
Masculino	22 (43,1%)	22 (48,8%)	19 (42,2%)	77 (49%)	
Marcador de ancestralidade, mediana (IQR)					
Europeu	0,64 (0,47-0,76)	0,75 (0,71-0,87)	0,76 (0,56-0,87)	0.74 (0.78-0.61)	0.003*
Ameríndio	0,12 (0,04-0,17)	0,08 (0,05-0,14)	0,07 (0,04-0,12)	0.07 (0.04-0.16)	0.379
Africano	0,18 (0,08-0,37)	0,12 (0,04-0,18)	0,11 (0,05-0,3)	0.10 (0.04-0.22)	0.002*
Genótipo do <i>HCV</i>		1	1		
Fibrose hepática (Metavir), n(%)					
F0-F2		33 (67,3%)	34 (75,6%)		0.037
F3-F4		16 (32,7%)	11 (24,4%)		

IQR= intervalo Interquartil;

*SC vs RVS;[#] RVS vs C; *P*<0.05

Nos gráficos 1, 2 e 3 estão representadas as distribuições dos genótipos dos SNPs rs8099917, rs12979860 e rs368234815, respectivamente, nos quatro grupos estudados de acordo com a evolução clínica e a resposta ao tratamento.

Em relação ao SNP rs8099917, o genótipo TT foi aquele de maior frequência nos grupos SC, RVS e C (84,3%, 71,4% e 65%, respectivamente) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Gráfico em barras para a distribuição dos genótipos do SNP rs8099917 (TT, GT, GG) nos quatro grupos estudados - HC-FMUSP e CRT-DST/AIDS

Quanto ao SNP rs12979860, o genótipo CC foi o de maior frequência nos grupos SC e RVS (64,7% e 49%, respectivamente). Apenas um indivíduo apresentou este genótipo no grupo NR (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Gráfico em barras para a distribuição dos genótipos do SNP rs12979860 (CC, CT, TT) nos quatro grupos estudados - HC-FMUSP e CRT-DST/AIDS

Em relação ao SNP rs368234815, o genótipo TT/TT foi o mais frequente nos grupos SC e RVS, com frequências de 66,7% e 49%, respectivamente (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Gráfico em barras da distribuição dos genótipos do SNP rs368234815 (TT/TT, TT/ Δ G e Δ G/ Δ G) nos quatro grupos estudados - HC-FMUSP e CRT-DST/AIDS

Na população controle, a frequência do alelo rs8099917-T foi 81% e a do alelo rs8099917-G, 19%. Para o alelo dominante rs12979860-C, a frequência encontrada foi 63%, e 39% para o alelo T. O alelo rs368234815-TT apresentou frequência de 64% e o alelo rs368234815-ΔG, frequência de 36%.

O DL entre rs12979860 e rs368234815 é forte em todos os grupos (SC, $r^2 = 0,94$; RVS, $r^2 = 0,76$; NR, $r^2 = 0,77$; C, $r^2 = 0,88$). Os genótipos GT e TT (rs8099917), CT e TT (rs12979860) e TT/ΔG e ΔG/ΔG (rs368234815) estão relacionados com uma maior chance de infecção crônica e não-resposta ao tratamento (Tabela 3). Os genótipos CT e TT (rs12979860) são os que estão mais associados a doença crônica (OR = 47,7, IC 95% 5,49-414,42, $p < 0,001$) e com não-resposta terapêutica (OR = 5,15, IC 95% 2,25-11,8; $p < 0,001$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise estatística relacionando os polimorfismos rs8099917, rs12979860 e rs368234815 com a evolução clínica (HC-C ou SC) e a resposta ao tratamento (NR ou RVS) da infecção pelo HCV

Fator	HC-C vs SC		NR vs RVS	
	OR (IC 95%)	<i>p</i> valor	OR (IC 95%)	<i>p</i> valor
rs8099917				
TT	1		1	
GT/GG	4,99 (1,99-12,54)	0,001	10,78 (3,63-32,06)	<0,001
rs12979860				
CC	1		1	
CT/TT	5,15 (2,25-11,8)	<0,001	47,7 (5,49-414,42)	<0,001
rs368234815				
TT/TT	1		1	
TT/ΔG ou ΔG/ΔG	4,72 (2,07-10,77)	<0,001	14,84 (3,57-61,68)	<0,001

NR: Não-respondedores ; RVS: Resposta virológica sustentada; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; $P < 0.05$

HC-C: Hepatite C crônica SC: Soroconversão espontânea

Sete diferentes haplótipos foram encontrados (Figura 5), e cinco deles foram observados com uma frequência superior a 1% (Tabela 4).

Figura 5. Distribuição de haplótipos de rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T) e rs368234815 (ΔG/TT). RVS: resposta virológica sustentada; SC: soroconversão espontânea; NR: não-respondedores; C: controle

O haplótipo G/T/ΔG é o mais frequente no grupo NR (40%), apesar do fato de o HWE não ter sido observado neste grupo ($p=0,03$). Nos grupos SC e RVS, o haplótipo T/C/TT é o mais frequente (frequências de 78% e 69%, respectivamente).

Tabela 4 - Frequência dos haplótipos dos diferentes polimorfismos nos grupos estudados

Fator	rs8099917	rs12979860	rs368234815	Frequência do haplótipo
NR	G	T	ΔG	0,40
	T	C	ΔG	0,02
	T	C	T	0,35
	T	T	ΔG	0,19
	T	T	T	0,03
RVS	G	T	ΔG	0,14
	T	C	ΔG	0,03
	T	C	T	0,69
	T	T	ΔG	0,11
	T	T	T	0,02
SC	G	T	ΔG	0,07
	G	T	T	0,01
	T	C	T	0,78
	T	T	ΔG	0,14
C	G	T	ΔG	0,18
	T	C	T	0,62
	T	T	ΔG	0,17
	T	T	T	0,02

NR: não-respondedores; RVS: resposta virológica sustentada; SC: soroconversão espontânea; C: controle

Na análise multivariada ajustada por sexo, idade e ancestralidade genética, o haplótipo G/T/ ΔG está relacionado com a não-resposta ao tratamento (OR = 21,09, IC 95% 5,33-83,51; $p < 0,001$) e a uma maior chance de

desenvolver infecção crônica (OR = 5,46, IC 95% 2,06-14,46; $p=0,001$), quando comparado com haplótipo T/C/TT (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise multivariada dos diferentes haplótipos encontrados de acordo com a evolução clínica (HC-C ou SC) e a resposta ao tratamento (NR ou RVS) da infecção pelo HCV

Fator	rs8099917	rs13979860	rs368234815	OR (IC 95%)	<i>p</i> valor
	T	C	T	1	
HC-C vs SC	G	T	ΔG	5,46 (2,06-14,46)	0,001
	T	T	ΔG	1,88 (0,84-4,21)	0,129
	T	C	T	1	
NR vs RVS	G	T	ΔG	21,09 (5,33-83,51)	<0,001
	T	C	ΔG	0,38 (0,05-3,19)	0,378
	T	T	ΔG	4,96 (1,1-22,45)	0,041
	T	T	T	4,15 (0,34-50,35)	0,267

NR: Não-respondedores ; RVS: Resposta virológica sustentada; OR: *Odds ratio*; IC: Intervalo de confiança; $P<0.05$, ajustado para sexo, idade e etnia

HC-C: Hepatite C crônica SC: Soroconversão espontânea

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou em uma população residente na cidade de São Paulo, Brasil, que os haplótipos rs8099917-T/G, rs12979860-C/T e rs368234815-ΔG/TT estão associados à soroconversão espontânea e à resposta ao tratamento da infecção pelo *HCV* com PEG-IFN e RBV. Além disso, as análises dos marcadores de ancestralidade demonstraram que a população estudada apresenta características genéticas semelhantes às de populações européias.

Neste estudo, a contribuição dos marcadores genéticos ameríndios e africanos foi menor do que o esperado. Devido à história da colonização do Brasil era esperada uma maior miscigenação racial, mas o que se encontrou nesta população oriunda de dois serviços hospitalares na cidade de São Paulo foi uma maior influência de marcadores europeus em todos os subgrupos. Esse resultado até certo ponto inesperado poderia ser explicado pela história da colonização do Estado de São Paulo. Nos últimos dois séculos, São Paulo recebeu um grande número de imigrantes europeus, concomitante à diminuição significativa de indígenas no território. Um estudo realizado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, São Paulo, encontrou no grupo populacional estudado maior contribuição de marcadores genéticos europeus para sua ancestralidade (85).

A distribuição das frequências alélicas dos SNPs (rs8099917, rs12979860 e rs368234815) varia em diferentes populações, o que poderia explicar a diferença de resposta ao tratamento da HC-C entre caucasianos, asiáticos, hispânicos e afrodescendentes (13, 86). A diferença geográfica e populacional das prevalências dos polimorfismos genéticos dos IFNs tipo III,

assim como suas associações com desfechos clínicos de infecções virais, ajudam-nos a compreender fatores imunológicos antes desconhecidos, bem como entender como fatores étnicos evolucionários podem conferir diversidade genética e fenotípica na susceptibilidade às infecções.

Em populações miscigenadas, como a brasileira, há poucos estudos que apontam qual SNP é o melhor preditor de evolução clínica da infecção e resposta ao tratamento (87, 88). Estudos que descrevem frequências alélicas e genotípicas da população brasileira para estes SNPs são escassos, e não encontramos nenhuma referência sobre a frequência dos polimorfismos rs368234815 (Δ G/TT).

Baseado em amostras do HapMap, nota-se uma variação na frequência da variante rs368234815-TT nas diversas populações mundiais: 93% em asiáticos, 68% em europeus e 23% em africanos. Baseado na observação das frequências alélicas populacionais no mundo sugere-se que ocorreu seleção natural positiva para este alelo (89). Não somente para este alelo, mas todo o *locus IFNL4* parece ter sofrido seleção positiva recente.

Figura 6. Frequência dos alelos do SNP rs368234815. Alelo ΔG (azul) e alelo TT (verde) para cada população do conjunto de dados 1000 Genomas. Populações: Africanas (YRI: Yoruba na Nigéria; ASW: africanos no sudoeste do EUA; LWK: Luhya no Quênia); Europeias (GBR: britânicos da Grã-Bretanha; CEU: indivíduos de ancestralidade europeia em Utah, EUA; FIN: Finlandeses na Finlândia; TSI: italianos na Toscana, Itália); Asiáticas (CHS: chineses do sul da China; CHB: chineses de Pequim; JPT: japoneses em Tóquio); Americanas (CLM: colombianos em Medellín, Colômbia; MXL: mexicanos em Los Angeles, EUA; PUR: porto-riquenhos em Porto Rico)

Em nosso estudo, encontramos em nossa população controle frequência de 66% do alelo rs368234815-TT, assemelhando-se a populações caucasianas, o que foi condizente com os demais achados.

Podemos dizer que evolutivamente o gene *IFNL4* pode ter sofrido um processo semelhante ao de formação dos pseudogenes (89). Pseudogenes são definidos como sequências genéticas que se assemelham a genes conhecidos, mas que, por surgimento de mutações incapacitantes que interrompem a sequência de leitura de regiões codificantes, não produzem uma proteína funcional.

Existem algumas hipóteses para explicar por que a eliminação do IFN- λ 4 seria uma vantagem para o ser humano. Ao observarmos a distribuição das frequências alélicas no mapa mundial (Figura 6), vemos que esta seleção positiva deve ter ocorrido em algum momento no continente asiático, por alguma infecção viral possivelmente bastante virulenta, uma vez que este gene está relacionado principalmente à resposta imunológica contra vírus (90).

Corroborando esta hipótese, estudos baseados em análise de alinhamento de sequências genéticas em múltiplas espécies de mamíferos mostram que o alelo *IFNL4*- Δ G é o alelo ancestral conservado e o alelo TT é uma variante humana específica. Outros genes de IFNs tipo III (*IFNL1* ou *IFNL2*) parecem ter sofrido algum tipo de pressão seletiva, porém apenas o polimorfismo rs368234815-TT em *IFNL4* foi comprovadamente associado com a resolução da infecção de uma virose, no caso a HC-C.

Após a descoberta de que os SNPs rs12979860-CC, rs8099917-TT e rs368234815-TT/TT estão associados com RVS e SC, vários estudos em populações diversas foram realizados.

Em pacientes tratados pela primeira vez com PEG-IFN e RBV, no estudo de Thompson *et al.*, em 2010, a taxa de RVS em pacientes caucasianos com genótipo CC era de 69%, enquanto nos pacientes com genótipo CT e TT as taxas de RVS eram 33 e 27%, respectivamente, com $P < 0,0001$. O alelo favorável C do SNP rs12979860 é mais frequente em asiáticos, seguido por caucasianos, hispânicos e afrodescendentes (0,9; 0,63; 0,55 e 0,39; respectivamente) (13, 75, 91, 92).

No Brasil, um estudo realizado em São Paulo envolvendo pacientes co-infectados com *HIV*, as frequências dos genótipos dos SNPs rs12979860 e

rs8099917 foram: CC 34,6%, CT 50,0%, TT 15,4% (SNP rs12979860), e TT 53,8% e TG 46,2% (SNP rs8099917). Neste trabalho, o genótipo CC do rs12979860 estava relacionado com RVS (93). No mesmo grupo populacional, no Rio Grande do Sul, os genótipos CT/TT conferiram quase três vezes maior chance de infecção crônica pelo *HCV* em relação ao genótipo CC, mostrando a associação do polimorfismo rs12979860 com a eliminação espontânea do *HCV* em pacientes co-infectados com *HIV-1* (94). Outro estudo no Rio Grande do Sul analisou a frequência dos genótipos rs12979860-CC/CT/TT (95). As frequências dos genótipos CC e TT foram de 31,4% e 17,8%, respectivamente, semelhantes àsquelas encontradas em nosso estudo (CC, 39,5% e TT, 14%).

Em um trabalho realizado em Salvador, demonstrou-se que tanto o genótipo rs12979860-CC como o genótipo rs8099917-TT estavam associados com RVS em pacientes infectados não só com o *HCV* genótipo 1 como também naqueles infectados com o *HCV* genótipo 3. Este trabalho também demonstrou que os pacientes com um maior componente racial africano tinham menor chance de resposta ao tratamento. Por sua vez, a chance de resposta era maior naqueles com maior componente racial ameríndio (87).

No presente estudo, os grupos de pacientes (SC, RVS, NR e C) foram testados em relação ao HWE definido anteriormente, uns com os outros. O único que não estava em equilíbrio com os demais grupos foi o NR. Isso pode indicar que a população estudada pode ter passado por recente processo de miscigenação em termos históricos (96). Assim sendo, esse achado pode ser interpretado como um fator que sustentaria a associação deste marcador genético com a não-resposta ao tratamento (ou desfecho indesejado).

Os resultados observados em nosso estudo demonstram associação dos três SNPs favoráveis, rs12979860-CC, rs8099917-TT e rs368234815-TT/TT, com resolução espontânea após infecção pelo *HCV* e com resposta ao tratamento (PEG-IFN e RBV) (Tabela 3). Esses resultados são semelhantes aos encontrados em estudos anteriores.

Nas populações asiáticas, o genótipo rs8099917-TT foi associado com melhores valores preditivos (16). Em nosso estudo, esse polimorfismo provou ser o melhor preditor de não-resposta quando comparado com os outros polimorfismos (especificidade = 73,3%, IC 95% 58,8-84,1), embora o grupo portador do alelo rs8099917-G seja muito pequeno.

Os genótipos rs12979860-CC e rs368234815-TT/TT mostraram maior sensibilidade (97,7%, IC 95% 87,2-100, e 93,3%, IC 95% 81,3-98,3; respectivamente) e maior valor preditivo para resposta ao tratamento, em conformidade com os resultados de estudos com populações europeias. O genótipo rs12979860-CC, quando comparado aos genótipos CT/TT, foi o mais frequente e com maior correlação com SC e RVS. Contrariamente ao esperado, o SNP rs12979860 apresentou maior OR comparado ao SNP rs368234815 (OR 5,15 vs 4,72; respectivamente) quando associado à SC e à RVS (OR 47,7 vs 14,84; respectivamente). Como o número de indivíduos em alguns grupos é pequeno, e o DL entre estes SNPs nos diferentes grupos estudados foi muito elevado ($r^2 \sim 0,76-0,94$), estes fatores podem explicar o resultado ligeiramente superior para o polimorfismo rs12979860.

Como descrito por outros autores, em relação ao rs368234815, o alelo *IFNL4*-ΔG apresenta forte DL com o desfavorável alelo rs12979860-T em indivíduos asiáticos ($r^2=1.0$) e europeus ($r^2=0.92$), não fornecendo valores

preditivos para respostas a tratamento muito melhores do que a análise do SNP rs12979860 isolado (17). Em afrodescendentes, esta correlação é moderada ($r^2=0.71$), e o SNP rs368234815 prediz melhor resposta do que o SNP rs12979860 (17). Esta observação está em acordo com o observado anteriormente, em que a resposta de afrodescendentes ao tratamento é pior que a de asiáticos e caucasianos.

Quando analisamos os haplótipos encontrados, constatamos que a maior prevalência no grupo controle é a do haplótipo T/C/TT (rs8099917/rs12979860/rs368234815) e este é fortemente associado com a resolução da infecção pelo *HCV*, compatível com achados de literatura (97, 98). Nestes estudos, não houve um ganho no valor preditivo para resolução da doença quando associou-se o SNP rs8099917 aos outros SNPs. Como dito anteriormente, em nosso grupo populacional, este SNP parece ter uma influência em indicar não-resposta ao tratamento e cronicidade da infecção. Porém, esta análise estatística fica prejudicada pelo número pequeno de pacientes no grupo NR. Além disso, os achados desses estudos sugerem que o *IFNL4*-ΔG/TT seja o principal responsável pela resposta à infecção do *HCV* genótipo 1.

O alelo rs368234815-ΔG codifica um IFN-λ4 funcional que prejudica a eliminação do *HCV* por indução de elevada expressão de ISGs e leva a uma resposta imune adaptativa ineficiente (52).

Os mecanismos pelos quais a expressão de IFN-λ4 interfere no clareamento do *HCV* continuam a ser discutidos (78, 99). Estudos sugerem que células expostas ao IFN-λ4 apresentam um estado refratário à ação do IFN-α quando submetidas a este tratamento (74, 100, 101). Outra hipótese é a de

que o IFN- λ 4 envolveria a regulação de expressão do receptor IFN- λ R1 (102). Este polimorfismo apresenta relevância também nos tratamentos sem interferon, incluindo tratamentos com novos DAAs de segunda geração de inibidores de protease e inibidores de polimerase (99).

Em uma análise de diferentes subgrupos de pacientes tratados por oito semanas com sofosbuvir e ledipasvir, O'Brien *et al.* mostraram que pacientes com genótipo rs12979860-CC obtiveram mais que 98% de RVS ao tratamento. Os autores sugerem que pacientes com *HCV* genótipo 1 e genótipo *IFNL4*- Δ G TT/TT, devido à sua forte ligação com o genótipo rs12979860-CC, possam ser tratados por oito semanas com este esquema terapêutico (103, 104).

Um estudo com uma população com maioria de afrodescendentes infectados com *HCV* genótipo 1 mostrou que o alelo *IFNL4*- Δ G estava associado a um declínio mais lento do RNA-*HCV* quando comparado ao genótipo *IFNL4*-TT/TT durante tratamento com DAAs sem IFN (Meissner, 2014). Outro estudo, que avaliava a população japonesa, evidenciou que a substituição Y93H na região NS5A do genoma do *HCV* - uma variante associada à resistência (RAV, *resistance-associated variant*) ao daclatasvir - era altamente prevalente em indivíduos infectados com *HCV* genótipo 1b nunca tratados com DAAs. A presença desta RAV Y93H estava associada ao genótipo rs8099917-TT e estes indivíduos eram susceptíveis ao tratamento com IFN (105). Outro grupo de pesquisadores japoneses mostrou forte associação entre genótipo *IFNL4*-TT/TT e substituições na região Y93 na NS5A e na proteína do *core* do *HCV*. Além disso, uma resposta antiviral mais eficiente foi associada ao genótipo *IFNL4*-TT/TT em pacientes portadores de *HCV* genótipo 1b (106).

Peiffer *et al.* estudaram população caucasiana infectada com *HCV* genótipos 1a, 1b e 3 e também encontraram associação significativa entre o genótipo *IFNL4*-TT/TT e a presença de RAV Y93H em pacientes com *HCV* genótipo 1b (107).

Até o momento, a variante genética *IFNL4* rs368234815 mostrou-se a melhor preditora de resposta a tratamento do *HCV* genótipo 1 (97, 108).

Surpreendentemente, os resultados do nosso estudo assemelham-se com outros realizados com populações europeias. A partir dos nossos estudos genéticos em uma população atendida em dois serviços hospitalares em São Paulo, podemos sugerir que, para essa população, possam ser seguidas diretrizes de tratamento descritas para populações com origem predominantemente caucasiana. Como em nosso país existem populações com diferentes características genotípicas, estas podem exigir diferentes abordagens de tratamento.

Estes resultados podem ajudar a ajustar nossas políticas de tratamento para a infecção por *HCV* em populações com tais características genéticas, bem como nos permitem conhecer o perfil genético da nossa população com relação a esses polimorfismos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- 1) O polimorfismo no SNP rs8099917 foi o melhor preditor de não-resposta quando comparado com os outros polimorfismos (especificidade = 73,3%; IC 95% 58,8-84,1).
- 2) Os polimorfismos rs12979860 e rs368234815 mostraram aumento da sensibilidade (97,7%, IC 95% 87,2-100, e 93,3%, IC 95% 81,3-98,3; respectivamente) e maior valor preditivo de resposta positiva ao tratamento, em conformidade com os resultados de estudos com populações europeias.
- 3) O haplótipo mais prevalente no grupo controle foi T/C/TT (rs8099917/rs12979860/rs368234815), fortemente associado com a resolução da infecção pelo *HCV*.
- 4) O haplótipo G/T/ Δ G foi relacionado com a não-resposta ao tratamento (OR = 21,09, IC 95% 5,33-83,51; $p < 0,001$) e com uma chance maior de desenvolver infecção crônica (OR = 5,46, IC 95% 2,06-14,46; $p = 0,001$), quando comparado com haplótipo T/C/TT.
- 5) Em relação à análise dos marcadores de ancestralidade, a contribuição de marcadores genéticos europeus foi dominante em todos os três grupos.

Referências

7. REFERÊNCIAS

1. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat.* 1999;6(1):35-47.
2. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S45-57.
3. Mohd Hanafiah K, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology.* 2013;57(4):1333-42.
4. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis.* 2013;13:60.
5. Thomas DL, Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis.* 2005;9(3):383-98, vi.
6. Kenny-Walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. *N Engl J Med.* 1999;340(16):1228-33.
7. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med.* 1989;321(22):1494-500.
8. Vogt M, Lang T, Frösner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med.* 1999;341(12):866-70.
9. Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(4):717-34.
10. Health NIO. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology.* 2002;36(5 Suppl 1):S3-20.
11. Lehmann M, Meyer MF, Monazahian M, Tillmann HL, Manns MP, Wedemeyer H. High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. *J Med Virol.* 2004;73(3):387-91.
12. Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays. *N Engl J Med.* 1991;325(19):1325-9.
13. Ge DL, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009;461(7262):399-401.
14. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature Genetics.* 2009;41(10):1100-U74.
15. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461(7265):798-U52.

16. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*. 2009;41(10):1105-U81.
17. Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet*. 2013;45(2):164-71.
18. Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med*. 1992;327(21):1490-5.
19. Zampino R, Marrone A, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Rinaldi L, et al. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J Hepatol*. 2013;5(10):528-40.
20. Ghany MG, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003;124(1):97-104.
21. Lee MH, Yang HI, Yuan Y, L'Italien G, Chen CJ. Epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 2014;20(28):9270-80.
22. Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, et al. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1986;315(25):1575-8.
23. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med*. 1998;339(21):1485-92.
24. Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001;33(2):433-8.
25. Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837-49.
26. Rosen HR. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. *N Engl J Med*. 2011;364(25):2429-38.
27. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB, Diseases AAFSoL. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2011;54(4):1433-44.
28. Pawlotsky JM. New hepatitis C virus (HCV) drugs and the hope for a cure: concepts in anti-HCV drug development. *Semin Liver Dis*. 2014;34(1):22-9.
29. Liver EAftSot. EASL recommendations on treatment of hepatitis C 2014. *J Hepatol*. 2014;61(2):373-95.
30. Dore GJ, Kaldor JM, McCaughan GW. Systematic review of role of polymerase chain reaction in defining infectiousness among people infected with hepatitis C virus. *BMJ*. 1997;315(7104):333-7.
31. Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med*. 2013;19(7):850-8.

32. Armstrong GL, Wasley A, Simard EP, McQuillan GM, Kuhnert WL, Alter MJ. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1999 through 2002. *Ann Intern Med.* 2006;144(10):705-14.
33. Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. *J Viral Hepat.* 2002;9(2):84-100.
34. Terrault NA, Dodge JL, Murphy EL, Tavis JE, Kiss A, Levin TR, et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: the HCV partners study. *Hepatology.* 2013;57(3):881-9.
35. Yeung CY, Lee HC, Chan WT, Jiang CB, Chang SW, Chuang CK. Vertical transmission of hepatitis C virus: Current knowledge and perspectives. *World J Hepatol.* 2014;6(9):643-51.
36. Gottwein JM, Bukh J. Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems. *Adv Virus Res.* 2008;71:51-133.
37. Murphy DG, Willems B, Deschênes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1102-12.
38. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989;244(4902):359-62.
39. Lohmann V, Körner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* 1999;285(5424):110-3.
40. Bartosch B, Dubuisson J, Cosset FL. Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med.* 2003;197(5):633-42.
41. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* 2005;309(5734):623-6.
42. Li YP, Ramirez S, Jensen SB, Purcell RH, Gottwein JM, Bukh J. Highly efficient full-length hepatitis C virus genotype 1 (strain TN) infectious culture system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(48):19757-62.
43. Li YP, Ramirez S, Gottwein JM, Scheel TK, Mikkelsen L, Purcell RH, et al. Robust full-length hepatitis C virus genotype 2a and 2b infectious cultures using mutations identified by a systematic approach applicable to patient strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(18):E1101-10.
44. Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol.* 1992;181(5):293-300.
45. André P, Komurian-Pradel F, Deforges S, Perret M, Berland JL, Sodoyer M, et al. Characterization of low- and very-low-density hepatitis C virus RNA-containing particles. *J Virol.* 2002;76(14):6919-28.
46. Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(23):9505-10.
47. Hueging K, Doepke M, Vieyres G, Bankwitz D, Frentzen A, Doerrbecker J, et al. Apolipoprotein E codetermines tissue tropism of hepatitis C virus and is crucial

for viral cell-to-cell transmission by contributing to a postenvelopment step of assembly. *J Virol*. 2014;88(3):1433-46.

48. Coller KE, Berger KL, Heaton NS, Cooper JD, Yoon R, Randall G. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog*. 2009;5(12):e1000702.

49. Levin A, Neufeldt CJ, Pang D, Wilson K, Loewen-Dobler D, Joyce MA, et al. Functional characterization of nuclear localization and export signals in hepatitis C virus proteins and their role in the membranous web. *PLoS One*. 2014;9(12):e114629.

50. Paul D, Hoppe S, Saher G, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol*. 2013;87(19):10612-27.

51. Shin EC, Sung PS, Park SH. Immune responses and immunopathology in acute and chronic viral hepatitis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(8):509-23.

52. Wack A, Terczyńska-Dyla E, Hartmann R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. *Nat Immunol*. 2015;16(8):802-9.

53. Kotenko SV. IFN- λ s. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(5):583-90.

54. Israelow B, Narbus CM, Sourisseau M, Evans MJ. HepG2 cells mount an effective antiviral interferon-lambda based innate immune response to hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2014;60(4):1170-9.

55. Dill MT, Duong FH, Vogt JE, Bibert S, Bochud PY, Terracciano L, et al. Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology*. 2011;140(3):1021-31.

56. Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(19):7034-9.

57. Sung PS, Cheon H, Cho CH, Hong SH, Park dY, Seo HI, et al. Roles of unphosphorylated ISGF3 in HCV infection and interferon responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(33):10443-8.

58. Knapp S, Warshow U, Ho KM, Hegazy D, Little AM, Fowell A, et al. A polymorphism in IL28B distinguishes exposed, uninfected individuals from spontaneous resolvers of HCV infection. *Gastroenterology*. 2011;141(1):320-5, 5.e1-2.

59. Lauterbach H, Bathke B, Gilles S, Traidl-Hoffmann C, Lubner CA, Fejer G, et al. Mouse CD8 α ⁺ DCs and human BDCA3⁺ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC. *J Exp Med*. 2010;207(12):2703-17.

60. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, et al. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+) dendritic cells are a potent producer of interferon- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2013;57(5):1705-15.

61. Takahashi K, Asabe S, Wieland S, Garaigorta U, Gastaminza P, Isogawa M, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(16):7431-6.

62. Rodrigue-Gervais IG, Rigsby H, Jouan L, Sauvé D, Sékaly RP, Willems B, et al. Dendritic cell inhibition is connected to exhaustion of CD8⁺ T cell polyfunctionality during chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol*. 2010;184(6):3134-44.

63. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, Ghrayeb J, et al. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*. 2003;302(5645):659-62.
64. Ulsenheimer A, Gerlach JT, Gruener NH, Jung MC, Schirren CA, Schraut W, et al. Detection of functionally altered hepatitis C virus-specific CD4 T cells in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;37(5):1189-98.
65. Shoukry NH, Grakoui A, Houghton M, Chien DY, Ghrayeb J, Reimann KA, et al. Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med*. 2003;197(12):1645-55.
66. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(4):829-41.
67. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(14):6025-30.
68. Frebel H, Richter K, Oxenius A. How chronic viral infections impact on antigen-specific T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2010;40(3):654-63.
69. Zinselmeyer BH, Heydari S, Sacristán C, Nayak D, Cammer M, Herz J, et al. PD-1 promotes immune exhaustion by inducing antiviral T cell motility paralysis. *J Exp Med*. 2013;210(4):757-74.
70. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, et al. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog*. 2009;5(2):e1000313.
71. Park SH, Veerapu NS, Shin EC, Biancotto A, McCoy JP, Capone S, et al. Subinfectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infection. *Nat Med*. 2013;19(12):1638-42.
72. Consortium IH. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426(6968):789-96.
73. **Brøsen K. Pharmacogenetics and Pharmacogenomics.** In: Souich Pd, Orme M, Erill S, editors. *The IUPHAR Compendium of Basic Principles for Pharmacological Research in Humans*. California, USA: IUPHAR; 2004. p. 27-33.
74. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic Variation in IL28B Is Associated With Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-Wide Association Study. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1338-U173.
75. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*. 2010;139(1):120-9.e18.
76. Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, et al. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1853-60.
77. *Institute HGNCatEB*. [Available from: <http://www.genenames.org/>.
78. O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP. IFN-λ4: The Paradoxical New Member of the Interferon Lambda Family. *J Interferon Cytokine Res*. 2014.
79. Nouredin M, Rotman Y, Zhang F, Park H, Rehmann B, Thomas E, et al. Hepatic expression levels of interferons and interferon-stimulated genes in

patients with chronic hepatitis C: A phenotype-genotype correlation study. *Genes Immun.* 2015;16(5):321-9.

80. Bluth, Edward. *Ultrasound: A Practical Approach to Clinical Problems*. 2nd ed. ed. New York, NY: Thieme Medical Publishers, Inc.; 2008. 739 p.

81. Tian C, Gregersen PK, Seldin MF. Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet.* 2008;17(R2):R143-50.

82. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat.* 2010;31(2):184-90.

83. S H. A simple sequentially reject multiple test procedure. *Scand J Stat.* 1979;6:65-70.

84. Lake SL, Lyon H, Tantisira K, Silverman EK, Weiss ST, Laird NM, et al. Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Hum Hered.* 2003;55(1):56-65.

85. Brum DG, Luizon MR, Santos AC, Lana-Peixoto MA, Rocha CF, Brito ML, et al. European ancestry predominates in neuromyelitis optica and multiple sclerosis patients from Brazil. *PLoS One.* 2013;8(3):e58925.

86. Halfon P, Bourliere M, Ouzan D, Maor Y, Renou C, Wartelle C, et al. A single IL28B genotype SNP rs12979860 determination predicts treatment response in patients with chronic hepatitis C Genotype 1 virus. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;23(10):931-5.

87. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, Machado TM, Lemaire DC, Mendes CM, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Int.* 2012;32(3):476-86.

88. Olmedo DB, Cader SA, Porto LC. IFN- λ gene polymorphisms as predictive factors in chronic hepatitis C treatment-naïve patients without access to protease inhibitors. *J Med Virol.* 2015;87(10):1702-15.

89. Key FM, Peter B, Dennis MY, Huerta-Sánchez E, Tang W, Prokunina-Olsson L, et al. Selection on a variant associated with improved viral clearance drives local, adaptive pseudogenization of interferon lambda 4 (IFNL4). *PLoS Genet.* 2014;10(10):e1004681.

90. Manry J, Laval G, Patin E, Fornarino S, Itan Y, Fumagalli M, et al. Evolutionary genetic dissection of human interferons. *J Exp Med.* 2011;208(13):2747-59.

91. Huang C-F, Yeh M-L, Huang J-F, Yang J-F, Hsieh M-Y, Lin Z-Y, et al. Host interleukin-28B genetic variants versus viral kinetics in determining responses to standard-of-care for Asians with hepatitis C genotype 1. *Antiviral Research.* 2012;93(2):239-44.

92. Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, et al. Association of two polymorphisms of the IL28B gene with viral factors and treatment response in 1,518 patients infected with hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2012;47(5):596-605.

93. Ferreira PR, Santos C, Côrtes R, Reis A, Tenore SeB, Silva MH, et al. Association between IL28B gene polymorphisms and sustained virological

response in patients coinfecting with HCV and HIV in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(2):509-10.

94. Lunge VR, da Rocha DB, Béria JU, Tietzmann DC, Stein AT, Simon D. IL28B polymorphism associated with spontaneous clearance of hepatitis C infection in a Southern Brazilian HIV type 1 population. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012;28(2):215-9.

95. Frizon K, Alves CF, Borchardt AC, Lunge VR, Simon D. Viral genotypes and human rs12979860 polymorphism of the IFNL3 gene in hepatitis C infected patients in Southern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(2):229-30.

96. Esser C, Tomluk J. Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: reasons for caution but not for panic reactions. *J Invest Dermatol.* 2005;124(5):1082-3.

97. O'Brien TR, Pfeiffer RM, Paquin A, Lang Kuhs KA, Chen S, Bonkovsky HL, et al. Comparison of functional variants in IFNL4 and IFNL3 for association with HCV clearance. *J Hepatol.* 2015;63(5):1103-10.

98. Ochi H, Miki D, Hayes CN, Abe H, Hayashida Y, Kubo M, et al. IFNL4/IL-28B haplotype structure and its impact on susceptibility to hepatitis C virus and treatment response in the Japanese population. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 6):1297-306.

99. Meissner EG, Bon D, Prokunina-Olsson L, Tang W, Masur H, O'Brien TR, et al. IFNL4-ΔG genotype is associated with slower viral clearance in hepatitis C, genotype-1 patients treated with sofosbuvir and ribavirin. *J Infect Dis.* 2014;209(11):1700-4.

100. Makowska Z, Duong FH, Trincucci G, Tough DF, Heim MH. Interferon-β and interferon-λ signaling is not affected by interferon-induced refractoriness to interferon-α in vivo. *Hepatology.* 2011;53(4):1154-63.

101. François-Newton V, Magno de Freitas Almeida G, Payelle-Brogard B, Monneron D, Pichard-Garcia L, Piehler J, et al. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS One.* 2011;6(7):e22200.

102. Duong FH, Trincucci G, Boldanova T, Calabrese D, Campana B, Krol I, et al. IFN-λ receptor 1 expression is induced in chronic hepatitis C and correlates with the IFN-λ3 genotype and with nonresponsiveness to IFN-α therapies. *J Exp Med.* 2014;211(5):857-68.

103. O'Brien TR, Lang Kuhs KA, Pfeiffer RM. Subgroup differences in response to 8 weeks of ledipasvir/sofosbuvir for chronic hepatitis C. *Open Forum Infect Dis.* 2014;1(3):ofu110.

104. O'Brien TR, Pfeiffer RM. Reply: Subgroup Differences in Response to 8 Weeks of Ledipasvir/Sofosbuvir for Chronic Hepatitis C. *Open Forum Infect Dis.* 2015;2(2):ofv057.

105. Itakura J, Kurosaki M, Takada H, Nakakuki N, Matsuda S, Gondou K, et al. Naturally occurring, resistance-associated hepatitis C virus NS5A variants are linked to interleukin-28B genotype and are sensitive to interferon-based therapy. *Hepatol Res.* 2015;45(10):E115-21.

106. Akamatsu S, Hayes CN, Ochi H, Uchida T, Kan H, Murakami E, et al. Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J Hepatol.* 2015;63(3):554-63.

107. Peiffer KH, Sommer L, Susser S, Vermehren J, Herrmann E, Döring M, et al. Interferon lambda 4 genotypes and resistance-associated variants in patients infected with hepatitis C virus genotypes 1 and 3. *Hepatology*. 2016;63(1):63-73.
108. Xie X, Liu H, Zhang J, Chen W, Zhuang D, Duan S, et al. Association between genetic variations of NMDA receptor NR3 subfamily genes and heroin addiction in male Han Chinese. *Neurosci Lett*. 2016.

Apêndices

APÊNDICE A – Aprovação da CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0462/11

Título: FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS AO CLAREAMENTO ESPONTÂNEO E RESPOSTA AO TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO VIRUS DA HEPATITE C.

Pesquisador Responsável: João Renato Rebello Pinho

Pesquisador Executante: Ana Catharina de Seixas Santos Nastri

Co-autores: Fernanda de Mello Malta, Flair José Carrilho,

Finalidade Acadêmica: Doutorado

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

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, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 23/11/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 23 de Novembro de 2011

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

Association of IFNL3 and IFNL4 polymorphisms with hepatitis C virus infection in a population from southeastern Brazil

Ana Catharina de Seixas Santos Nastro^{1,2} · Fernanda de Mello Malta^{2,3} ·
Márcio Augusto Diniz⁴ · Alessandra Yoshino¹ · Kiyoko Abe-Sandes⁵ ·
Sidney Emanuel Batista dos Santos⁶ · André de Castro Lyra⁷ · Flair José Carrilho² ·
João Renato Rebello Pinho^{2,3,8}

Received: 22 December 2015 / Accepted: 28 February 2016 / Published online: 14 March 2016
© Springer-Verlag Wien 2016

Abstract Hepatitis C virus (HCV) infection is a major cause of chronic liver disease and associated complications such as liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Viral and host factors are known to be predictors for antiviral therapy. Host factors that are predictors of sustained viral response (SVR) were discovered by genome-wide association studies (GWAS), including single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in or near the interferon lambda gene (rs8099917, rs12979860 and rs368234815). The aim of the present study was to verify the genotype frequencies of SNPs rs8099917, rs12979860 and rs368234815 and to evaluate the association between SNPs and the outcome of HCV infection, taking into account the population ancestry. In this study, there was an association

of the three polymorphisms with both clinical outcome and response to treatment with PEG-IFN and RBV. The polymorphisms rs12979860 and rs368234815 were associated with increased sensitivity (97.7 %, 95 % CI 87.2–100, and 93.3 %, 95 % CI 81.3–98.3; respectively) and with a greater predictive value of a positive response to treatment. In multivariable analysis adjusted by gender, age and ancestry, the haplotype G/T/ΔG was related to non-response to treatment (OR = 21.09, 95 % CI 5.33–83.51; $p < 0.001$) and to a higher chance of developing chronic infection (OR = 5.46, 95 % CI 2.06–14.46; $p = 0.001$) when compared to the haplotype T/C/TT. These findings may help to adjust our treatment policies for HCV infection based on greater certainty in studies with populations with such genetic characteristics, as well as allowing us to get to know the genetic profile of our population for these polymorphisms.

✉ Fernanda de Mello Malta
fmalta@yahoo.com

¹ Department of Infectious and Parasitic Diseases, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil

³ Institute of Tropical Medicine, LIM 07, University of São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 500, 2nd floor IMT-II, São Paulo, SP, Brazil

⁴ Samuel Oschin Cancer Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA

⁵ Laboratory of Immunology, Health Sciences Institutes (ICS), Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil

⁶ Department of Medicine, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil

⁷ Human Genetics and Medical laboratory, Federal University of Pará (UFPA), Belém, Pará, Brazil

⁸ Hospital Isabela Albert Einstein, São Paulo, Brazil

Introduction

According to a recent study, approximately 115 million people worldwide are infected with hepatitis C virus (HCV). Among these individuals, it is estimated that about 80 million have detectable viremia [1]. There has been an increase in morbidity and mortality caused by chronic hepatitis C (CHC), with an increasing number of cases of cirrhosis and hepatocellular carcinoma and around 500,000 deaths per year due to the disease [2]. It is expected that this number will increase in most countries by 2030. In countries where this tendency has been reversed, such as France, this was achieved by a successful diagnostic policy and early treatment of infected individuals [3]. Until 2011 the standard treatment consisted of pegylated interferon and ribavirin (PEG-IFN + RBV).

Due to the cost and the large number of side effects of PEG-IFN+RBV, viral and host factors related to better response to treatment have been used to aid the optimization of public health policies. One of the factors that could affect the reduction of the future disease burden of HCV infection is the improvement in the rate and of treatment effectiveness. Recently, this has been achieved with the introduction of new treatment regimens using highly effective direct-acting antiviral agents (DAAs) [4–6].

Host factors that are predictors of sustained viral response (SVR) were discovered by genome-wide association studies (GWAS). In 2009, some GWAS showed that single-nucleotide polymorphisms (SNPs), rs12979860 genotype CC, and rs8099917 genotype TT in the interferon lambda 3 gene (*IFNL3*, previously named interleukin 28B gene), located on chromosome 19q13.13, are associated with SVR when patients with CHC are treated with PEG IFN + RBV [7–10].

In 2013, Prokunina-Olsson et al. discovered a novel functional dinucleotide polymorphism, rs368234815 (previously designated as ss469415590), located in exon 1 of the *IFNL4* gene, between *IFNL3* and *IFNL2*. In addition, they showed that the rs12979860 variant is located in intron 1 of the same gene [11]. The presence of the variant *IFNL4*-ΔG allows *IFNL4* transcription and the production of a new interferon, IFN-λ4, which is not detected in individuals who are *IFNL4*-TT homozygotes. The mechanism of action of *IFNL4*-ΔG has not been fully elucidated, but it is associated with the expression of intrahepatic interferon-stimulated genes (ISGs) [12]. The rs368234815-ΔG variant is in strong linkage disequilibrium (LD) with the unfavorable allele rs12979860-T. This LD value is very high in Asian ($r^2 = 1.0$) and European ($r^2 > 0.9$) individuals and consequently does not provide predictive values for response to treatment much better than the isolated analysis of SNP rs12979860. In people of African descent, this correlation is moderate ($r^2 \approx 0.7$), and the SNP rs368234815 is a better predictor of the response to treatment than is the SNP rs12979860 [11]. In a recent study, it was shown that rs368234815 is the primary region associated with impaired viral clearance in African American and European American populations [13].

Since the frequencies of the SNPs near the *IFNL3* and *IFNL4* genes are associated with ethnicity, it is important to know their frequency in the different regions of the world; this information will be relevant in establishing treatment guidelines for hepatitis C virus. The Brazilian population is an admixed population formed by ancestors of three different ethnic groups (European, African and Amerindian), thus the aim of this study was to determine the genotype frequencies of SNPs rs8099917, rs12979860 and rs368234815 and to evaluate the association between

SNPs and the outcome of HCV infection, taking into account the population ancestry.

Material and methods

Patients

A total of 145 patients were enrolled in the present study. The patients were divided in three groups based on clinical outcome: spontaneous clearance (SC; $n = 51$), sustained virological response (SVR; $n = 49$) and non-responder (NR; $n = 45$). Patients in the SC group had two negative HCV RNA test results with a six-month interval, had positive ELISA and recombinant immunoblot assay (RIBA 3.0) results for anti-HCV, and had not undergone treatment for HCV. All CHC patients were infected with HCV genotype 1 and had been treated with PEG-IFN and RBV for 48 weeks. Patients in the SVR group had undetectable HCV RNA for 24 weeks after the end of treatment. NR patients were positive for HCV RNA at weeks 12 and 24 of treatment. Liver biopsies were performed prior to initiation of treatment. Fibrosis was staged according to the METAVIR score (F0–4). None of the patients were infected with hepatitis B virus (HBV) or human immunodeficiency virus (HIV), made abusive use of alcohol, or had autoimmune diseases.

In addition to the previously described groups, 157 individuals who were not infected with HCV, HBV or HIV were selected from among the general population. This group, called the control group, was used for frequency analysis of the studied polymorphisms. All patients were Brazilians with no reported Asian ancestry and were recruited from hepatitis units from Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and Centro de Referência e Treinamento-AIDS, São Paulo, SP, Brasil. All of the individuals signed a written informed consent to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee of the University of São Paulo Medical School CAPESQ (protocol 0462/11).

DNA extraction

Blood samples were collected from each patient for genetic analysis. Human genomic DNA was extracted from 140 μ L of whole blood using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the protocol provided by manufacturer.

SNP genotyping

All DNA samples were typed for three SNPs located near the *IFNL3*/*IFNL4* genes (rs8099917, rs12979860, and

rs368234815). The genotypes of the SNPs were determined using TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, USA). The rs12979860 and rs368234815 assays were customized using sequences from the NCBI Entrez SNP Database, and the rs8099917 assay (C_11710096_10) is a pre-designed TaqMan SNP genotyping assay from Applied Biosystems. The reactions were performed in a final volume of 13.3 μ L containing 2 μ L of DNA, 6.3 μ L of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 4.3 μ L of water and 0.7 μ L of 20x SNP Genotyping Assay mix (Applied Biosystems) containing primers and MGB TaqMan probes. Real-time PCR was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 15 seconds and at 60 °C for 1 minute.

Ancestry analysis

In populations with recent miscegenation, a populational stratification occurs in which the proportion of the genetic material of the ancestors of each subpopulation varies among individuals in the population. To assess the composition of these populations, the structured association method was used, utilizing a set of genetic markers to estimate the genetic ancestry of the individual and then testing this association with correction for individual admixture [14].

A panel of 48 ancestry-informative markers (AIMs) was used to distinguish continental populations, specifically Europeans, Africans (sub-Saharan) and Native Americans. The protocol used was the same as described previously by Santos et al., briefly described below [15]. The markers were genotyped using an automatic DNA sequencer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) and analyzed using the program GeneMapper1 ID v3.2 (Applied Biosystems). The identification of alleles was performed with reference to the ladder ABIGS LIZ-500 (Applied Biosystems) and a standard of known size. As a quality control, for each allele, a control sample of known size was analyzed simultaneously.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed using median and interquartile range (IQR), and qualitative variables were presented using frequency (percent). Frequencies of demographic characteristics were compared between groups using the χ^2 test and Fisher's exact test with the Holm correction [16]. Genotype frequencies for all investigated polymorphisms were tested for consistency with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium (LD, r^2 value). The analyses were also performed

with the Holm correction [16]. SNPs were tested comparing the presence of two copies of the minor allele versus none or one copy (recessive model). A multivariable logistic model adjusted by age, gender, and ethnicity was applied for genotypes and haplotypes. For the haplotypes, the expectation-maximization (EM) algorithm was used, considering a minimum frequency of 1 % and the HWE assumption satisfied [17]. Statistical analysis was performed using the program R Foundation for Statistical Computing (version 3.1.2, R Development Core Team 2014, Vienna, Austria) and a P -value <0.05 was considered significant.

Results

Study population

The studied population was similar regarding age as a variable ($P = 0.298$), with a median of 45 (35–52.5), 48 (40–57) and 45 (35–52) in the SC, SVR and NR group, respectively. Regarding gender, there was also homogeneity between groups, with a majority of females in the SC, SVR and NR groups, 56.9 %, 59.2 % and 57.9 %, respectively ($P = 0.679$). Ancestry analysis showed that the contribution of European genetic markers was dominant in all three groups. However, the SC group showed lower frequency of these markers when compared to the SVR group ($P = 0.003$). Most of the population of the SVR and NR groups showed a Metavir profile with fibrosis grade 0 to 2, without statistical differences. However, a significant difference was observed in the Metavir profile with fibrosis grade 3 to 4 ($P = 0.037$) (Table 1).

The genotype frequency of the three SNPs (rs8099917, rs12979860 and rs368234815) was analyzed according to the clinical course and response to treatment (Fig. 1). The LD between rs12979860 and rs368234815 was strong in all groups (SC, $r^2 = 0.94$; SVR, $r^2 = 0.76$; NR, $r^2 = 0.77$; HC, $r^2 = 0.88$). The genotypes GT and TT (rs8099917), CT and TT (rs12979860), and TT/ Δ G and Δ G/ Δ G (rs368234815) were associated with a higher chance of chronic infection and non-response to treatment (Table 2). The genotypes CT and TT (rs12979860) were more frequently associated with chronic disease (OR = 47.7, 95 % CI 5.49–414.42, $P < 0.001$) and with failure of therapeutic response (OR = 5.15, 95 % CI 2.25–11.8, $P < 0.001$) (Table 2).

Seven different haplotypes were found (Fig. 1), five of which were observed at a frequency greater than 1 % (Table 3). The haplotype G/T/ Δ G was the most frequent in the NR group (40 %), in spite of the fact that HWE was not observed for this group ($P = 0.03$). However, in the SC and SVR groups, the T/C/TT was the most frequent haplotype (78 % and 69 %, respectively). In multivariable analysis

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the four study groups

	SC n = 51	SVR n = 49	NR n = 45	HC n = 157	P-value
Age, median (IQR)	45 (35-52.5)	48 (40-57)	45 (35-52)	39 (30-51)	0.006*
Gender, n (%)					
Female	29 (56.9 %)	29 (59.2 %)	26 (57.8 %)	80 (51 %)	0.679
Male	22 (43.1 %)	22 (48.8 %)	19 (42.2 %)	77 (49 %)	
Ancestry classification, median (IQR)					
European	0.64 (0.47-0.76)	0.75 (0.71-0.87)	0.76 (0.56-0.87)	0.74 (0.78-0.61)	0.003*
Amerindian	0.12 (0.04-0.17)	0.08 (0.05-0.14)	0.07 (0.04-0.12)	0.07 (0.04-0.16)	0.379
African	0.18 (0.08-0.37)	0.12 (0.04-0.18)	0.11 (0.05-0.3)	0.10 (0.04-0.22)	0.002*
HCV genotype	NA	1	1	NA	
Liver fibrosis (Metavir), n (%)					
F0-F2	NA	33 (67.3 %)	34 (75.6 %)	NA	0.037
F3-F4	NA	16 (32.7 %)	11 (24.4 %)	NA	

IQR, interquartile range; *SC vs SVR; # SVR vs HC; P < 0.05

SC, spontaneous clearance; SVR, sustained virological response; NR, non-response; HC, healthy control

Fig. 1 Haplotype distribution of rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T) and rs368234815 (AG/TT). SVR, sustained virological response; SC, spontaneous clearance; NR, non-response; control, healthy patients

adjusted by gender, age and ancestry, the haplotype G/T/ΔG was related to non-response to treatment (OR = 21.09, 95 % CI 5.33-83.51; $p < 0.001$) and to a higher chance of developing chronic infection (OR = 5.46, 95 % CI 2.06-14.46; $p = 0.001$) when compared to haplotype T/C/TT (Table 4).

Discussion

Infection with hepatitis C virus is of great importance worldwide due to the morbidity and mortality it causes, as well as the expense in places on public health systems for monitoring and treatment. Rapid development in the therapeutic arsenal against this infection has been achieved in recent years, culminating in the introduction of direct-act-

Table 2 Statistical analysis of the frequency of each studied polymorphism in different outcome groups

Factor	CHC vs. SC		NR vs. SVR	
	OR (95 % CI)	P-value	OR (95 % CI)	P-value
rs8099917				
TT	1		1	
GT/GG	4.99 (1.99-12.54)	0.001	10.78 (3.63-32.06)	<0.001
rs12979860				
CC	1		1	
CT/TT	5.15 (2.25-11.8)	<0.001	47.7 (5.49-414.42)	<0.001
rs368234815				
TT/TT	1		1	
TT/AG or AG/AG	4.72 (2.07-10.77)	<0.001	14.84 (3.57-61.68)	<0.001

NR, non-response; SVR, sustained virological response; OR, odds ratio; CI, confidence interval ($P < 0.05$); CHC, chronic hepatitis C; SC, spontaneous clearance

Table 3 Haplotype frequencies of the different polymorphisms in the different groups

Factor	rs8099917	rs12979860	rs368234815	Haplotype frequency
NR	G	T	AG	0.40
	T	C	AG	0.02
	T	C	T	0.35
	T	T	AG	0.19
SVR	T	T	T	0.03
	G	T	AG	0.14
	T	C	AG	0.03
	T	C	T	0.69
SC	T	T	AG	0.11
	T	T	T	0.02
	G	T	AG	0.07
	G	T	T	0.01
HC	T	C	T	0.78
	T	T	AG	0.14
	G	T	AG	0.18
	T	C	T	0.62
	T	T	AG	0.17
	T	T	T	0.02

NR, non-response; SVR, sustained virological response; SC, spontaneous clearance; HC, healthy control

ing agents (DAAs) [4, 6, 18]. These drugs have far better efficacy and safety when compared to the previously available treatment based on PEG-IFN and RBV [19, 20], but the cost of these new drugs is still very high for health systems in general. Thus, treatment using PEG-IFN and RBV will still be used for a while until the cost of the new drugs has decreased and their availability to the general population has increased. Knowledge of the predictors of response to treatment enables us to improve strategies to fight the infection. The present study evaluated a resident population in the city of São Paulo, Brazil, where the haplotypes rs8099917 (T/G), rs12979860 (C/T) and

rs368234815 (AG/TT) are associated with clearance and response to treatment with PEG-IFN and RBV.

Brazil, due to its continental dimensions and its colonization history, has a very high level of ethnic diversity, and thus, the genetic profile of its population is extremely variable. In admixed populations, such as the Brazilian one, there are a few studies that point to SNPs as being the best predictors of clinical outcome of infection and response to treatment [21–23]. Studies describing allele and genotype frequencies in the population are scarce, particularly for the polymorphism rs368234815 (AG/TT). Furthermore, there are no studies correlating the haplotypes of the three mentioned SNPs with viral clearance and response to treatment.

In a meta-analysis by Olmedo et al in 2015, studies that included admixed populations were analyzed in order to establish whether individuals with the genotypic profile rs12979860-CC and rs8099917-TT infected with genotype 1 HCV have a higher chance of response to treatment with PEG-IFN and RBV [23]. This was confirmed, and this meta-analysis also included two studies examining the the Brazilian population. Ramos et al., in 2012, demonstrated the correlation between the two genotypes mentioned above with spontaneous viral clearance [22]. Cavalcante et al., in 2011, also analyzed an admixed population infected with genotypes 1, 2 and 3 [21]. This study analyzed ancestry markers showing a highly mixed population where the rs12979860-CC and rs8099917-TT genotypes were also correlated with SVR. Genomic markers that were found mainly in Africans were associated with poorer response to treatment [7, 8].

Due to the history of colonization of Brazil, greater miscegenation was expected in the present study, but we found a significantly higher influence of European markers in all subgroups when compared to African and Amerindian markers, with significant difference between the SVR and SC groups ($P = 0.011$, 95 % CI). The State of São Paulo received a large number of European immigrants in the last two centuries, concomitantly with a significant

Table 4 Multivariate analysis of the different haplotypes according to HCV infection outcome

Factor	rs8099917	rs12979860	rs368234815	OR (95 % CI)	P-value
CHC vs. SC	T	C	T	1	
	G	T	AG	5.46 (2.06–14.46)	0.001
	T	T	AG	1.88 (0.84–4.21)	0.129
NR vs. SVR	T	C	T	1	
	G	T	AG	21.09 (5.33–83.51)	<0.001
	T	C	AG	0.38 (0.05–3.19)	0.378
	T	T	AG	4.96 (1.1–22.45)	0.041
	T	T	T	4.15 (0.34–50.35)	0.267

CHC, chronic hepatitis C; SC, spontaneous clearance; NR, non-response; SVR, sustained virological response; OR, odds ratio; CI, confidence interval ($P < 0.05$), adjusted for sex, age and ethnicity

decrease in the number of indigenous peoples on its territory. In addition, since the mid-19th century, even before the abolition of slavery, there has been a significant decrease in the rate of entry of Africans in Brazil [24]. Most of this population came into Brazil through the State of Bahia, and this may be one explanation for the different results of this study and a study by Cavalcante et al., who found a stronger influence of African markers [21].

The studied subgroups were in HWE with each other, with the exception of the NR group. This can be interpreted as another fact supporting the association of this genetic marker with non-response to treatment in a population of recent miscegenation in historical terms [25]. The SC and SVR groups were in HWE with the control group, and this fact also supports it.

In this study, there was association of the three isolated polymorphisms (rs8099917, rs12979860 and rs368234815) with both clinical outcome and response to treatment with PEG-IFN and RBV, similar to the results obtained in previous studies. The polymorphisms rs12979860 and rs368234815 were associated with increased sensitivity (97.7 %, 95 % CI 87.2–100, and 93.3 %, 95 % CI 81.3–98.3, respectively) and greater predictive value of a positive response to treatment, in accordance with the results of studies with European populations. Since the LD between these SNPs in the different groups is high (r^2 , 0.76 to 0.94), and the number of individuals is small in some groups, these facts could explain the slightly higher values obtained for the polymorphism rs12979860. In Asian populations, the polymorphism rs8099917 was associated with better predictive values [10]. For us, this polymorphism proved to be a better predictor of non-response when compared to the other polymorphisms (specificity = 73.3 %, 95 % CI 58.8–84.1), although the NR group was too small for a more definitive analysis.

The ΔG allele of rs368234815 encodes a functional IFN- $\lambda 4$ that impairs HCV clearance by induction of high ISG expression, which inhibits viral replication and leads to an inefficient adaptive immune response [26, 27]. Additionally, a recent study has shown an association between the *IFNL4* TT/TT genotype and increased degranulation activity of lymphocytes [28], and an NS5A resistance-associated variant (Y93H) has been associated with a reduced response to treatment with NS5A inhibitors (daclatasvir/asunaprevir) [29]. Another study by O'Brien and Pfeiffer suggests that the genotypic profile could be useful for decreasing treatment time with DAAs in specific situations [30]. Therefore, even in the era of DAAs, *IFNL4* genotyping still proves to be helpful.

Surprisingly, the results of our study strongly resemble those of studies with Caucasian populations. Consequently, in our population, it might perhaps be safe to follow treatment guidelines based on these genetic markers and

those obtained from studies with populations of predominantly Caucasian origin. These findings might help to adjust our treatment policies for HCV infection based on greater certainty in studies with populations with such genetic characteristics, as well as allowing us to get to know the genetic profile of our population for these polymorphisms. They also confirm that, in our vast territory, there are populations with different genotypic characteristics that might, depending on the situation, require different approaches to treatment and investigation.

Acknowledgments This work was supported by FAPESP São Paulo Research Foundation (2010/10.549-1).

Compliance with ethical standards

Financial support This Project was supported by grant 2010/10.549-1 (Fapesp) and the Alves de Queiroz Family Fund for Research. João Renato Rebello Pinho is the recipient of a fellowship from CNPq (Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H (2014) Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 61:S45–S57
- Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalra K, Birkov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Campetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezrati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Little SL, Mahweejano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Meriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Rodilla RP, Perez-Ruiz F, Peñico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson

- U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyeh IM, Towbin JA, Truelson T, Undarra EA, Venkateshmanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazma MA, Memish ZA (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380:2095–2128
3. Razavi H, Waked I, Sarrazin C, Myers RP, Idilman R, Calinas P, Vogel W, Mendes Correa MC, Hezode C, Lazaro P, Akarca U, Aleman S, Balik I, Berg T, Bohl F, Bilodeau M, Blasco AJ, Brandao Mello CE, Bruggmann P, Buti M, Calleja JL, Cheinquer H, Christensen PB, Clausen M, Coelho HS, Cramp ME, Dore GJ, Doss W, Duberg AS, El-Sayed MH, Ergor G, Esmat G, Falconer K, Felix J, Ferraz ML, Ferreira PR, Frankova S, Garcia-Samaniego J, Gerstoft J, Gira JA, Goncalves FL Jr, Gower E, Gschwantler M, Guimaraes Pessoa M, Hindman SJ, Hofer H, Hsu P, Kaberg M, Kaita KD, Kautz A, Kaymakoglu S, Knjden M, Krarup H, Laleman W, Lavanchy D, Marinho RT, Marotta P, Mauss S, Moreno C, Murphy K, Negro F, Nemecek V, Ormeci N, Overhus AL, Parkes J, Pasini K, Peltekian KM, Ramji A, Reis N, Roberts SK, Rosenberg WM, Roudot-Thoraval F, Ryder SD, Sarmento-Castro R, Semela D, Sherman M, Shiha GE, Sievert W, Sperl J, Starckel P, Stauber RE, Thompson AJ, Urbanek P, Van Damme P, van Thiel I, Van Vlierberghe H, Vandijk D, Wedemeyer H, Weiss N, Wiegand J, Youry A, Zelky A, Cornberg M, Mullhaupt B, Estes C (2014) The present and future disease burden of hepatitis C virus (HCV) infection with today's treatment paradigm. *J Viral Hepat* 21(Suppl 1):34–59
4. Lawitz EJ, Ganev D, Hill JM, Marbury T, Moorehead L, Mathias A, Cheng G, Link JO, Wong KA, Mo H, McHutchison JG, Brainard DM (2012) A phase 1, randomized, placebo-controlled, 3-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *J Hepatol* 57:24–31
5. Manns MP, Reesink H, Berg T, Dushenko G, Flisiak R, Marcellin P, Moreno C, Lenz O, Meyvisch P, Peeters M, Sekar V, Simmen K, Verloes R (2011) Rapid viral response of once-daily TMC435 plus pegylated interferon/ribavirin in hepatitis C genotype-1 patients: a randomized trial. *Antivir Ther* 16:1021–1033
6. Ganev D, Rouzier R, Wiercinski-Drapalo A, Larrey DG, Morcos PN, Brennan BJ, Le Pogon S, Najem I, Petric R, Tran JQ, Kulkarni R, Zhang Y, Smith P, Yetzer ES, Shulman NS (2013) Efficacy and safety of danoprevir-ritonavir plus peginterferon alfa-2a-ribavirin in hepatitis C virus genotype 1 prior null responders. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1136–1145
7. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulikowski M, McHutchison JG, Goldstein DB (2009) Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461:399–401
8. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M (2009) Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 461:798–801
9. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedley A, Fragomeli V, Muller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J (2009) IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 41:1100–1104
10. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsun M, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakada I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugawara F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M (2009) Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 41:1105–1109
11. Prokunina-Olsson L, Machmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, Hergott D, Porter-Gill P, Mumy A, Kohaar I, Chen S, Brand N, Tarway M, Liu L, Sheikh F, Astemborski J, Bonkovsky HL, Edlin BR, Howell CD, Morgan TR, Thomas DL, Rehermann B, Donnelly RP, O'Brien TR (2013) A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45:164–171
12. Hamming OJ, Terczynska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jorgensen SE, Akhtar H, Siupka P, Pletschmann T, Thiel V, Hartmann R (2013) Interferon lambda 4 signals via the IFNlambda receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. *Embo J* 32:3055–3065
13. O'Brien TR, Pfeiffer RM, Paquin A, Lang Kuhs KA, Chen S, Bonkovsky HL, Edlin BR, Howell CD, Kirk GD, Kuniholm MH, Morgan TR, Strickler HD, Thomas DL, Prokunina-Olsson L (2015) Comparison of functional variants in IFNL4 and IFNL3 for association with HCV clearance. *J Hepatol* 63:1103–1110
14. Tian C, Gregersen PK, Seldin MF (2008) Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 17:R143–R150
15. Santos NP, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AK, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, Guerreiro JF, Zago MA, Mathe C, Hutz MH, Santos SE (2010) Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker. *Hum Mutat* 31:184–190
16. Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6:65–70
17. Lake SL, Lyon H, Tantisira K, Silveira EK, Weiss ST, Laird NM, Schaid DJ (2003) Estimation and tests of haplotype-environment interaction when linkage phase is ambiguous. *Hum Hered* 55:56–65
18. Kowdley KV, Lawitz E, Crespo I, Hassanein T, Davis MN, DeMico M, Bernstein DE, Afdhal N, Vierling JM, Goston SC, Anderson JK, Hyland RH, Dvory-Sobol H, An D, Hines RG, Albanis E, Symonds WT, Berney MM, Nelson DR, Jacobson IM (2013) Sofosbuvir with pegylated interferon alfa-2a and ribavirin for treatment-naïve patients with hepatitis C genotype-1 infection (ATOMIC): an open-label, randomised, multicentre phase 2 trial. *Lancet* 381:2100–2107
19. Nelson DR, Cooper JN, Lalezari JP, Lawitz E, Podnos PJ, Gitlin N, Freilich BF, Younes ZH, Hanlon W, Ghalib R, Oguchi G, Thuluvath PJ, Ortiz-Lasanta G, Rabinovitz M, Bernstein D, Bennett M, Hawkins T, Ravendran N, Sheikh AM, Varunok P, Kowdley KV, Hennicken D, McPhoe F, Rana K, Hughes EA (2015) All-oral 12-week treatment with daclatasvir plus sofosbuvir in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection: ALLY-3 phase III study. *Hepatology* 61:1127–1135
20. Manns MP, Fried MW, Zeuzem S, Jacobson IM, Forns X, Poordad F, Poeters M, Fu M, Lenz O, Ouwerek-Mahadevan S, Jessner W, Scott JA, Kalmeijer R, De La Rosa G, Sinha R, Beaumont-Mauviel M (2015) Simeprevir with peginterferon/ribavirin for treatment of chronic hepatitis C virus genotype 1 infection: pooled safety analysis from Phase IIb and III studies. *J Viral Hepat* 22:366–375
21. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, Machado TM, Lemaire DC, Mendes CM, Pinho JR, Malta F, Lyra LG, Lyra AC (2012) IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver Int* 32:476–486

22. Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, Perez Rde M, Coelho HS, Urmenyi TP, Silva R, Rondinelli E, Villela-Nogueira CA (2012) A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, mono-infected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:888–892
23. Olmedo DB, Cader SA, Porto LC (2015) IFN-lambda gene polymorphisms as predictive factors in chronic hepatitis C treatment-naïve patients without access to protease inhibitors. *J Med Virol* 87:1702–1715
24. IBGE (2015) Estatísticas do povoamento. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
25. Esser C, Tomluk J (2005) Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: reasons for caution but not for panic reactions. *J Invest Dermatol* 124:1082–1083
26. Terczyńska-Dyla E, Bihert S, Duong FHT, Krol I, Jørgensen S, Collinet E, Kutalik Z, Aubert V, Cemy A, Kaiser L, Malinverni R, Mangia A, Moradpour D, Mühlhaupt B, Negro F, Santoro R, Semela D, Semmo N, Swiss Hepatitis CCSG, Heim MH, Bochud P-Y, Hartmann R (2014) Reduced IFNL4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nat Commun* 5
27. Wack A, Terczyńska-Dyla E, Hartmann R (2015) Guarding the frontier: the biology of type III interferons. *Nat Immunol* 16:802–809
28. Jouvin-Marche E, Maccek Jilková Z, Thelu M-A, Marche H, Fugier E, Van Campenhout N, Hoang XS, Marlu A, Sturm N, Callanan M, Leroy V, Zarski J-P, Marche PN (2014) Lymphocytes Degranulation in Liver in Hepatitis C Virus Carriers Is Associated With IFNL4 Polymorphisms and ALT Levels. *J Infect Dis* 209:1907–1915
29. Akamatsu S, Hayes CN, Ochi H, Uchida T, Kan H, Murakami E, Abe H, Tsuge M, Miki D, Akiyama R, Hiraga N, Imamura M, Aikata H, Kawaoka T, Kawakami Y, Chayama K (2015) Association between variants in the interferon lambda 4 locus and substitutions in the hepatitis C virus non-structural protein 5A. *J Hepatol* 63:554–563
30. O'Brien TR, Pfeiffer RM (2015) Reply: Subgroup Differences in Response to 8 Weeks of Ledipasvir/Sofosbuvir for Chronic Hepatitis C. *Open Forum Infect Dis* 2:ofv057