

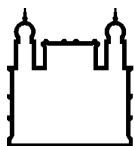
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *IFNL3* e *IFNL4* NA
RESPOSTA VIROLOGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM
PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM
ALFAPEGINTERFERONA**

ANDRÉA MARQUES VIEIRA DA SILVA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

ANDRÉA MARQUES VIEIRA DA SILVA

INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *IFNL3* e *IFNL4* NA RESPOSTA VIROLOGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ALFAPEGINTERFERONA

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2018

Silva, Andréa Marques Vieira da.

INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES IFNL3 e IFNL4 NA RESPOSTA VIROLÓGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ALFAPEGINTERFERONA / Andréa Marques Vieira da Silva. - Rio de Janeiro, 2018.

125 f.; il.

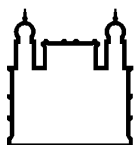
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Milton Ozório Moraes.

Bibliografia: f. 89-100

1. Hepatite C crônica. 2. Interferon alfa peguilado. 3. Polimorfismo . 4. Inteferon lambda . I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: ANDRÉA MARQUES VIEIRA DA SILVA

**INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *IFNL3* e *IFNL4* NA
RESPOSTA VIROLOGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM
PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM
ALFAPEGINTERFERONA**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. MILTON OZÓRIO DE MORAES

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Mário Campos Júnior - Presidente (IOC) Titular

Prof. Dr. Guilherme Motta Rezende (UFRJ) Titular

Prof. Dra. Livia Melo Villar - (IOC) Titular

Prof. Dr. Leonardo Ribeiro Batista Silva - (Bio-Manguinhos) Suplente

Prof. Dra. Patrícia Neves - (Bio-Manguinhos) Suplente

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2018



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular de **Andréa Marques Vieira da Silva**, sob orientação do Dr. Milton Ozório Moraes. Ao décimo oitavo dia do mês de dezembro de dois mil e dezoito, realizou-se às treze horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *IFNL3/4* NA RESPOSTA VIROLOGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ALFAPEGINTERFERONA"** No programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Imunofarmacologia. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Mario Campos Junior - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Guilherme Ferreira da Motta Rezende - UFRJ/RJ, Dr^a. Livia Melo Villar - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Patricia Cristina da Costa Neves - BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ e Leonardo Ribeiro Batista Silva - BIOMANGUINHOS/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2018.

Dr. Mario Campos Junior (Presidente da Banca):

Dr. Guilherme Ferreira da Motta Rezende (Membro da Banca):

Dr^a. Livia Melo Villar (Membro da Banca):

Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Aos meus eternos amores

Sérgio, Igor e Iasmin.

Aos meus pais Arlindo e Iára

Minha gratidão

Luziara e Arlindo

Aventuras garantidas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a FIOCRUZ, ao IOC que tornaram possível a realização deste trabalho. Assim como ao programa e aos professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular que contribuíram para minha formação durante todo processo.

Agradeço a Dra. Patrícia Cristina da Costa Neves revisora deste manuscrito, pelas críticas construtivas e essencial, pelas correções contribuindo pelo enriquecimento deste documento.

Agradeço aos membros da banca deste trabalho por aceitarem o convite e pela leitura cuidadosa deste documento, assim como de suas observações que sem dúvida permitiram a melhoria deste trabalho.

Aos meus pais Arlindo Vieira da Silva e Lara Ferreira Marques, pelo valioso exemplo que me proporcionaram, pelos ensinamentos, pelo amor incondicional que me deram, saudades eternas;

Aos meus amados irmãos Maria José, Luziara, Arlindo e Henrique pelo carinho, amizade e mimos;

Ao meu orientador Dr. Milton Moraes, pela confiança e tranquilidade em lidar com as circunstâncias adversas, pelo exemplo de pesquisador e como pessoa, sou muito grata pela oportunidade de desenvolver este trabalho e outros que estão em andamento, pela orientação ao longo destes anos ampliando meus conhecimentos.

A minha orientadora Dra. Denise Cristina e amiga de longas datas, pela enorme oportunidade, incentivos e estímulos para concretização deste trabalho, pelas inúmeras contribuições para meu desenvolvimento profissional e o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e irmãos do Laboratório de Tecnologia Imunológica – Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ, Alessandro, Camilla, Jane, Luciana, Nathalia, pela imensa ajuda e companheirismo em todos os momentos pessoais e profissionais, a Tamiris pela participação em etapas desta tese e pelo desenvolvimento de outros trabalhos que surgiram com nosso companheirismo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Hanseníase – IOC/FIOCRUZ pela acolhida e carinho, a Alexandre, Suelen, Fernanda Manta, Fernanda Kerdy, Ohana, Thiago, Carolinne Marques, Carolinne Xavier, Isabelle, Priscilla, Paula, Thyago, Rychelle,

Tamiris, e um agradecimento especial a Lucia Elena, Thyago Leal e Leonardo pela amizade e enormes contribuições neste projeto.

Ao Marcelo Ribeiro pela enorme ajuda nas análises de alguns resultados e pelas sugestões imprescindível e pela amizade.

A toda equipe da ASCLIM por permitirem a execução deste trabalho, as doutoras Eliane Matos, Maria de Lourdes, Tatiana, Vivian, aos colaboradores Robson, Mirian, Elizabeth, e todos que ajudaram direta ou indiretamente.

A Dra. Ana Carolina Magalhães Andrade e Dr. Rolando Pães Meireles que desenvolveram este biofármaco e permitirem a execução deste projeto.

A toda equipe do LATED que participaram ativamente na quantificação da carga viral dos pacientes do estudo clínico.

A Vice-Diretoria de desenvolvimento Tecnológico, Bio-Manguinhos pelo suporte e permissão para o desenvolvimento deste projeto.

Aos programas financiadores deste estudo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos, Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos,
e não tivesse amor,
seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine.*

*E ainda que tivesse o dom de profecia,
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
e ainda que tivesse toda fé,
de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor, nada seria.”*

Paulo de tarso



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

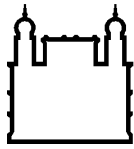
INFLUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS NOS GENES *IFNL3* E *IFNL4* NA RESPOSTA VIROLÓGICA SUSTENTADA E NA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM PACIENTES BRASILEIROS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM ALFAPEGINTERFERONA

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Andréa Marques Vieira da Silva

A hepatite C crônica (HCC) é um grande problema de Saúde Pública, pois se apresenta como uma doença assintomática, onde 20% irão progredir para cirrose, podendo ainda evoluir para carcinoma hepatocelular. Os polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) próximos a região do interferon lambda 3 (*IFNL3*) são marcadores que estão associados a eliminação espontânea do vírus, e no desfecho dos tratamentos à base de Peg-interferon (Peg-IFN α), bem como, tratamentos recentes com os antivirais de ação direta. Neste estudo, a genotipagem de SNPs na região de *IFNL3* e *IFNL4* na população Brasileira e seu papel na resposta virológica sustentada (RVS) e na regulação da resposta imunológica sistêmica foram avaliados. Para isso, 740 pacientes com HCC infectados com genótipos virais 1, 2 e 3 tratados com Peg-IFN α e ribavirina foram recrutados (conforme protocolo do Ministério da Saúde de 2015) as amostras coletadas nos tempos 0, 1^a, 2^a, 3^a, 12^a semanas de tratamento e 3^a semana pós-tratamento, juntamente com 24 amostras de voluntários sadios (0, 24 e 72 horas) que receberam uma dose dos biofármacos. Avaliamos a frequência de 12 SNPs da região gênica do *IFNL3* e 4 em pacientes estratificados de acordo com o desfecho. Confirmamos a associação de 10 SNPs com o desfecho favorável do tratamento na população miscigenada brasileira. Dentre estes, destacam-se os SNPs rs12979860, rs8109886 e rs8099917 que, após análises de desequilíbrio de ligação, funcionam como etiquetas de cobertura de toda região. Além disso, utilizando a combinação entre os genótipos destes três SNPs preditores aumentou-se a taxa de predição da RVS, independente de outros fatores preditivos do hospedeiro. A partir das amostras de um subgrupo de 24 pacientes e 24 voluntários sadios, foram avaliados níveis séricos de citocinas e quimiocinas bem como a expressão de genes da via de sinalização do IFN tipo I. O perfil observado nos níveis de CCL3, CCL4 e CXCL10 se mostraram bons biomarcadores de RVS. Níveis baixos de CCL4 e CXCL10 foram detectados em pacientes com genótipo rs12979860-CC, favorável a resposta ao tratamento. Apresentaram diferenças significativas entre pacientes homocigotos CC em relação aos pacientes com genótipo TT. Por fim, os pacientes apresentaram o efeito antagônico entre IFN- λ e os genes da via dos IFN tipo I, onde níveis altos de expressão de mRNA de *IFNL3* e 4 antes do tratamento estavam associados à níveis baixos do *IFNA1* nos pacientes com HCC. Genes expressos da via de sinalização do IFN tipo I apresentaram altos níveis antes do início do tratamento, com exceção dos genes *IFNA1*, *IFNAR* e *IFHI*. Em resumo, estes dados sugerem que a combinação de genótipos de rs12979860, rs8109886 e rs8099917 são preditores mais precisos do resultado do tratamento em uma população miscigenada como a Brasileira e que os genótipos do gene *IFNL3* e 4 regulam a resposta imuno-inflamatória indicando que os mecanismos genéticos controlam a regulação dos níveis de IFNs tipo I exercido pelos IFNs tipo III.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INFLUENCE OF POLYMORPHISMS IN THE *IFNL3* e *IFNL4* GENES ON THE SUSTAINED VIROLOGIC RESPONSE AND THE PRODUCTION OF CYTOKINES IN BRAZILIAN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C TREATED WITH ALHAPEGINTERFERON

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELLULAR and MOLECULAR Biology

Andréa Marques Vieira da Silva

Chronic hepatitis C (CHC) is a major public health problem, as it presents as an asymptomatic disease, where 20% will progress to cirrhosis and may progress to hepatocellular carcinoma. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) near the interferon Lambda 3 (*IFNL3*) region are markers that are associated with spontaneous viral elimination, and at the outcome of the Peg-interferon (Peg-IFN α), as well as, recent direct-acting antivirals treatment. In this study, the genotyping of SNPs in the region of *IFNL3* and *IFNL4* in the Brazilian population in the sustained virological response (SVR) as well as the role of these SNPs in the regulation of the systemic immune response were evaluated. For this, 740 patients with CHC infected with viral genotypes 1, 2 and 3 were treated with Peg-IFN α and ribavirin were recruited (according to the protocol of the Ministry of Health of 2015), along with 24 samples of healthy volunteers who received a dose of the biopharmaceutical. We evaluated the frequency of 12 SNPs of the *IFNL3* and *IFNL4* gene in patients stratified according to the outcome of SVR. We confirmed the association of 10 SNPs with the favorable treatment outcome in the Brazilian mixed population. Among these, SNPs rs12979860, rs8109886 and rs8099917 are highlighted, which, after analysis of linkage disequilibrium, function as tags to cover the whole region. In addition, the combination of the genotypes of these three predictive SNPs increased the rate of SVR, independent of other predictive factors of the host. From the samples of a subgroup of 24 patients and 24 healthy volunteers, we evaluated the serum levels of cytokines and chemokines as well as the expression of genes of the type I IFN signaling pathway. The profile in the pro-inflammatory chemokines CCL3, CCL4 and CXCL10 are good biomarkers of virological response. Non-responders had higher levels of CCL3 and CCL4 before treatment and higher levels of CXCL10 in the first week of treatment. However, lower serum levels of these chemokines were detected in patients with rs12979860-CC genotype, favorable to treatment response. Levels of CCL4 and CXCL10 showed significant differences among CC homozygous patients compared to patients with TT genotype. Finally, patients had the antagonistic effect between IFN- λ and the type I-interferon pathway genes, where high levels of *IFNL3* and *IFNL4* pre-treatment mRNA levels were associated with low *IFNA1* levels in HCC patients. Several interferon-expressed genes show high levels prior to initiation of treatment, with the exception of the *IFNA1*, *IFNAR* and *IFIH1* genes. In summary, our data suggest that the genotype combination of rs12979860, rs8109886 and rs8099917 are more accurate predictors of treatment outcome in a mixed population such as Brazil and the genotypes of the *IFNL3* and *IFNL4* region regulate the immune-inflammatory response indicating that the mechanisms regulate the levels of type I IFNs exerted by type III IFNs.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Breve Histórico	1
1.2	Epidemiologia.....	2
1.3	Aspectos Clínicos na infecção da hepatite C	5
1.4	Transmissão.....	8
1.5	Diagnóstico da infecção pelo VHC	9
1.6	O vírus da hepatite C.....	10
1.6.1	Partícula viral	10
1.6.2	Replicação viral.....	14
1.6.3	Resposta imunológica na hepatite C.....	17
1.7	Tratamento	22
1.8	O papel dos IFNs na resposta antiviral contra hepatite C	27
1.9	Polimorfismos no gene de <i>IFNL3</i> (IL28B).....	32
2-	OBJetivos	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
3-	Material e Métodos	37
3.1	Origem do Estudo	37
3.2	Amostras	39
3.3	Seleção de SNPs	40
3.4	Discriminação alélica.....	42
3.5	RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de citocinas da via do Interferon tipo I e III.....	43
3.5.1	Sistema microfluídico de avaliação de expressão gênica simultaneamente.....	43

3.5.2	Sistema utilizando sondas específicas marcadas com fluoróforos	44
3.6	Quantificação de citocinas e quimiocinas no soro pelo ensaio de microarranjo líquido/multiplex	44
3.7	Análises estatísticas	45
4-	resultados	48
4.1	Características epidemiológicas e clínicas associadas à RVS.....	48
4.2	Análises de associação dos SNPs da região <i>IFNL3 E IFNL4</i> com o desfecho do tratamento	49
4.3	Análises de desequilíbrio de ligação e bloco de haplótipo dos polimorfismos.....	53
4.4	Avaliação dos polimorfismos representativos do <i>IFNL3 E IFNL4</i> e o desfecho do tratamento	55
4.5	A relação entre a combinação genotípica do paciente e o resultado do tratamento	57
4.6	Avaliação dos níveis séricos de quimiocinas durante o tratamento. ..	61
4.7	Níveis de CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10 estão relacionados à resposta ao tratamento.	66
4.8	Avaliação funcional dos polimorfismos em relação aos níveis de citocinas séricas.	67
4.9	Avaliação dos níveis de expressão gênica do <i>IFNA1, IFNL3 e IFNL4</i>	71
4.10	- Avaliação dos níveis de expressão gênica da assinatura genica da via de sinalização do IFN tipo I.	73
5-	Discussão	78
6-	Conclusões	88
7-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
8-	ANEXOS.....	101
8.1	Anexo A – Tabelas com sequencias dos genes.....	101
8.2	Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência relativa da taxa global da doença hepatite C de cada genótipo por região.	3
Figura 2. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões brasileiras.	5
Figura 3. História natural da infecção pelo vírus da hepatite C. Extraído de Maasoumy B. et al. 2012.	7
Figura 4. Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016..	9
Figura 5. Características da partícula do vírus da hepatite C.	11
Figura 6. Estrutura genômica do vírus da hepatite C.	12
Figura 7. Fatores da célula do hospedeiro utilizadas pela partícula viral do VHC envolvidas na ligação e entrada a célula iniciando o processo de replicação viral.. .	15
Figura 8. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C.	17
Figura 9. Resposta imunológica inata e adaptativa.	22
Figura 10. Respostas virológicas na terapia da hepatite C crônica. Adaptado de Feld JJ. & Hoofnagle J.H, 2005.	23
Figura 11. Vias de sinalização de receptores dos IFN tipo I e tipo III.	29
Figura 12. Níveis de expressão dos IFNs tipo I e III e dos ISGs durante infecção viral. Extraído Egli A. et al. 2014.	30
Figura 13. Mecanismo de ação do interferon contra o VHC. Extraído de Uzé et al. 2007.	32
Figura 14. Frequência dos alelos C e T do rs12979860. Extraído de Thomas D.L. et. al. ,2009.	34
Figura 15. Fluxograma da metodologia.	39
Figura 16. Esquema representativo da região do cromossoma 19.13q, dos genes <i>IFNL2</i> , <i>IFNL3</i> e <i>IFNL4</i>	41
Figura 17. Gráfico representativo de discriminação alélica dos SNPs pelo sistema TaqMan.	43
Figura 18 Associação dos variantes em torno da região de <i>IFNL3</i> e <i>IFNL4</i> com o desfecho do tratamento.	51

Figura 19 Desequilíbrio de ligação de par em par entre todos SNPs da região do <i>IFNL3</i> e <i>IFNL4</i>	53
Figura 20. Desequilíbrio de ligação de par em par entre os SNPs da região ao gene <i>IFNL3</i> e <i>IFNL4</i>	55
Figura 21. Frequência e a distribuição de RVS em pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α	56
Figura 22. Frequência dos genótipos rs12979860, rs8109886 e rs8099917, dos pacientes com HCC tratados e a porcentagem de RVS obtida, estratificados pelo genótipo viral.....	57
Figura 23. Distribuição da combinação genotípica dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN- α e porcentagem de RVS de cada combinação.....	59
Figura 24. Percentual de RVS em pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV estratificado pela combinação gênica entre o rs12979860, rs8109886 e rs8099917 e pelo genótipo viral, agrupados de acordo com fatores clínicos relacionados com bom prognóstico terapêutico.....	60
Figura 25. Níveis séricos de CXCL10 e CCL4 induzidas pelos biofármacos em voluntários sadios após administração do Peg-IFN α	61
Figura 26. Níveis séricos das citocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC.....	62
Figura 27. Níveis séricos das quimiocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α	65
Figura 28. Níveis séricos das quimiocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α	65
Figura 29 Diferença nos níveis das quimiocinas estratificados por RVS e NR.....	67
Figura 30. Níveis séricos de IFN- α dos pacientes com HCC estratificados pelos genótipos do SNP rs12979860 e o desfecho do tratamento.....	68
Figura 31. Níveis séricos de CCL4 estratificados por genótipos para rs12979860.....	69
Figura 32. Níveis séricos de CXCL10 estratificados por genótipos para rs12979860.....	70
Figura 33 Níveis de expressão gênica mRNA do <i>IFNA1</i>	72
Figura 34. Níveis de expressão gênica dos genes <i>IFNL3</i> e <i>4</i>	72
Figura 35. Gráfico Heat map (gráfico de calor) do perfil de expressão dos genes da via do interferon tipo I.....	74

Figura 36. Perfil de expressão relativa de mRNA de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -2a/2b, entre respondedores e não respondedores.	75
Figura 37. Perfil de expressão relativa de mRNA de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -2a/2b, entre respondedores e não respondedores..	76
Figura 38. Níveis de expressão genes da via de sinalização do IFN tipo I dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α + RBV estratificados pelo genótipo SNP rs12979860..	77
Figura 39. Modelo esquemático mostrando os principais achados deste estudo.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detalhes das sondas TaqMan™ (ThermoFisher Scientific) utilizadas para genotipagem dos SNPs.....	41
Tabela 2. Distribuição da frequência dos dados demográficas e clínicos em relação ao desfecho do tratamento dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α 2a ou 2b e RBV.....	49
Tabela 3. Distribuição da frequência dos genótipos e carreadores dos SNPs associados ao desfecho do tratamento e os valores de Odds Ratio.....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aa	aminoácidos
AAD	Antivirais de ação direta
ALT	alanina aminotransferase
Apo	Apopoliproteína
ARFP	Do inglês proteína <i>de quadro de leitura alternativa</i>
AST	aspartato aminotransferase
CCL11/Eotaxina	Ligante 11 de CC quimiocina
CCL3 /MIP-1 α	Ligante 3 de CC quimiocina/ proteína inflamatória de macrófago
CCL4 /MIP-1 β	Ligante 4 de CC quimiocina/ proteína inflamatória de macrófago
CCL5/RANTES	Ligante 5 de CC quimiocinas do inglês regulado na ativação de células T normais expressas e secretadas
CD	Células dendríticas
CD81	proteína da família tetraspanina -TSPAN28
cDNA	DNA complementar
CHC	Carcinoma hepatocelular
CK	Célula de Kupfer
CLDN1	Claudina 1
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CXCL10 (IP-10)	ligante 10 de CXC quimiocina/ do inglês proteína induzida por IFN
CXCL8 (IL-8)	ligante 8 de CXC quimiocina / interleucina-8
E1 ou E2	Proteína de envelope
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHW	Equilíbrio de Hardy Weinberg
EIA	Ensaio imunoenzimático
EMA	Do inglês Agencia Medi Agência Europeia de Medicamentos
FDA	Do inglês Administração de comidas e drogas
GAG	glicosaminoglicanos
GT	Genótipo viral
GBD	do inglês Doença de carga global, Global Burden of Disease
GWAS	estudo de associação de genoma inteiro (Genome-Wide Association Studies)
HCA	Hepatite C aguda
HCC	Hepatite C crônica
HIV	Do inglês vírus da imunodeficiência humana

HSPG	Do inglês <i>Heparan Sulfate proteoglycan</i>
IC	Intervalo de confiança (95%)
IFI16	Proteína induzida pelo interferon gama
IFI6	Proteína induzida pelo IFN
IFIH	interferon induzido com o domínio C da helicase
IFIT	proteína Induzida por Interferon com repetições de tetratricopeptídeos
IFITM	proteína transmembranar induzida pelo interferon
IFN	Inteferon
IFNAR	Receptor do interferon alfa
IFNL	Interferon lambda
IFN- α	Interferon alpha
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IFN- λ	Interferon lambda
IFRs	Fatores regulados pelo interferon do ingles <i>interferon regulatory fator</i>
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRF3 /5/9	Fator regulador do interferon
ISDR	Região que determina a sensibilidade ao Interferon
ISG15	Gene estimulado pelo interferon
JAK	Janus Kinase
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
LD	Do inglês <i>Linkage Disequilibrium</i> - desequilíbrio de ligação
LDL	Do inglês <i>low density lipoproteins</i>
LDL-R	Do inglês <i>low density lipoproteins receptor</i>
LVP	Do inglês <i>lipoviral particles</i>
MAVs	Proteína sinalizadora mitochondrial antiviral, do ingles <i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
NF-kB	Do inglês <i>nuclear factor-kappa B</i> - fator nuclear kappa B,
NR	não respondedores
NS	Do inglês <i>non-structural</i> – proteína não estrutural
Nt	Nucleotídeos
OAS	2' 5' Oligoadenilato sintetase
OASL	2' 5' Oligoadenilato sintetase like

OCLN	Ocludina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Do inglês razão de chances
PAMPs	<i>Padrões moleculares associados a patógenos do ingles</i> <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
Peg-IFN α	interferon alfa peguilhado
PKR	Proteína quinase R
PRRs	receptores de reconhecimento de padrões do ingles <i>Pattern recognition receptors</i>
qPCR	Reação de cadeia de polimerase em tempo real
RAVs	Variantes associados a resistência
RBV	Ribavirina
RE	Reticulo endotelial
RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	genes indutores de ácido retinóico tipo I do ingles <i>retinoic acid-inducible gene I</i>
RNA	ácido ribonucleico
RNASEL	Ribonuclease L
RR	resposta rápida
RVS	Resposta virológica sustentada
SNP	polimorfismo de base única
SOCS3	Supressor da sinalização de citocina
SR-B1	Do inglês <i>receptor scavenger class B type 1</i>
STAT	Do inglês Tradutor de sinais e ativador de transcrição
STING	Estimulador do genes de interferon
TBK1	Serina / treonina-proteína-quinase
TBX21	T-Box fator de transcrição
TICAM	Molécula adaptadora toll like
TNF	Fator de necrose tumoral
UTR	Do inglês <i>untranslated region</i>
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VLDL	Do inglês lipoproteína muito baixa densidade
VS	Voluntário sadio

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico

A hepatite é um processo inflamatório do fígado, e se caracteriza por ser uma doença silenciosa e quase sempre assintomática. Pode ser induzida por medicamentos, como anti-inflamatórios não esteroidais, pela ingestão excessiva de álcool, bem como doenças autoimunes, metabólicas e genéticas. Além disso, diversos microorganismos são causadores de hepatite no homem, entre eles estão bactérias, fungos e vírus. Contudo, os agentes com a maior importância epidemiológica são as hepatites virais A, B, C.

Partículas virais identificadas por Feinstone e Choo colaboradores, em 1975 como hepatite não-A ou não-B, a partir de amostras de indivíduos submetidos à transfusões sanguíneas, já que não possuíam características do vírus da hepatite A nem do vírus da hepatite B (1). Somente em 1989, estas partículas virais foram definidas como vírus da hepatite C por Choo e colaboradores, através de técnicas de clonagem e sequenciamento do genoma viral usando amostras de alto título coletadas de chimpanzés experimentalmente infectados (2). A hepatite tipo C possui uma marcante tendência à cronicidade, uma vez que mais de 80% dos indivíduos infectados desenvolvem essa forma da doença. É a principal causa de doença crônica no fígado, levando à cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (CHC), com taxas significativas de mortalidade e morbidade e ainda é a maior causa de indicação de transplante de fígado em todo o mundo (3).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou em 2016 uma meta mundial visando a erradicação das hepatites B e C até 2030 (4). A proposta tem como objetivo a intensificação no diagnóstico simplificado, o fortalecimento no atendimento das hepatites virais, e a disponibilidade do tratamento adequado e personalizado para população. Contudo, o desenvolvimento de uma vacina continua sendo uma meta fundamental para o controle global e a erradicação da doença.

1.2 Epidemiologia

A hepatite C é uma das principais causas de morte e morbidade no mundo. Estimativas recentes mostraram um aumento na sua prevalência na última década, chegando a 2,8% da população global, o que corresponde aproximadamente à 185 milhões de pessoas infectadas (3,5).

Dados sobre a prevalência mundial estão baseados, principalmente, em estudos de soroprevalência do VHC, o que inclui indivíduos que tiveram cura espontânea, indivíduos tratados e com infecção aguda. Aproximadamente 400.000 pessoas morrem anualmente de hepatite C, principalmente por cirrose e CHC (6).

Um trabalho publicado em 2017 realizou um estudo sistemático para quantificar a carga da epidemia do VHC no mundo, usando os melhores dados publicados disponíveis entre 2000 e 2015 em 138 países agrupados em 20 diferentes áreas geográficas. Concluiu-se que a prevalência global de VHC é estimada em 2,5% da população mundial (177,5 milhões de adultos infectados pelo VHC), variando de 2,9% na África à 1,3% nas Américas. A maior prevalência de VHC (> 3,5%) foi relatada nas regiões do leste da Ásia, norte da África e Oriente Médio (7). A soroprevalência da Hepatite C nas regiões do mundo são de 5,9% na África subsaariana e Ásia Central, 3,1% na Europa Oriental, 2,8% no Norte da África, Leste da Ásia e Oriente Médio e Sul da Ásia com 2,5%. Outras regiões apresentam frequências menores que 2,5% de soroprevalência. A China e a Índia apresentam 3,2% e 0,9%, respectivamente. Países desenvolvidos como Estados Unidos (1,8%), Alemanha (0,6%), Canadá (0,8%), França (1,1%) e Austrália (1,1%) apresentam menor prevalência de VHC e juntos tem um quinto da população mundial (7). O Egito é o país com a maior prevalência mundial cerca de 15% da população adulta é soropositiva para VHC e mais de quatro milhões permanecem virêmicos (8). A prevalência de co-infecções entre os vírus da hepatite B e C e o vírus do HIV é alta, visto que as formas de transmissão são similares e estima-se que 4 a 5 milhões de pessoas infectadas pelo HIV estejam cronicamente infectados pelo VHC (9). A prevalência mundial da co-infecção pelo VHB e VHC é subestimada, estima-se que varia entre 0,7% e 16%, dependendo da região geográfica e da população de estudo. A co-infecção VHB e VHC é frequentemente encontrada em várias populações de risco, como por exemplo, pessoas que usam drogas injetáveis (10).

A distribuição geográfica dos genótipos do VHC é heterogênea em todo o mundo. Dados obtidos de 1989 a 2013, conforme definido pelo Global Burden of Disease (GBD), descreveram que o genótipo viral 1 (GT1) do VHC é o mais prevalente (49,1%), seguido pelo genótipo 3 (17,9%), 4 (16,8%) e 2 (11,0%) sendo os GT5 e 6 responsáveis pelo restante dos casos <5%, conforme ilustrado na figura 1 (11). Na África, o GT4 é o mais prevalente com 28,1% seguido do GT1 (26,3%). Nas Américas, Europa e Ásia o GT1 é mais prevalente em torno de 70% seguido do GT3 em torno de 18%. O GT7 tem sido encontrado somente em poucos indivíduos (12). Além disso, os genótipos do VHC possuem manifestações clínicas distintas e diferem também de acordo com a rota de transmissão e a idade dos indivíduos infectados. Os GT3 e 1a, por exemplo, são altamente representados entre usuários de drogas injetáveis, o GT1b é mais frequente entre pacientes que receberam transfusões de sangue. No Japão, o GT1b é o mais prevalente e a população infectada é mais velha do que nos Estados Unidos (13,14).

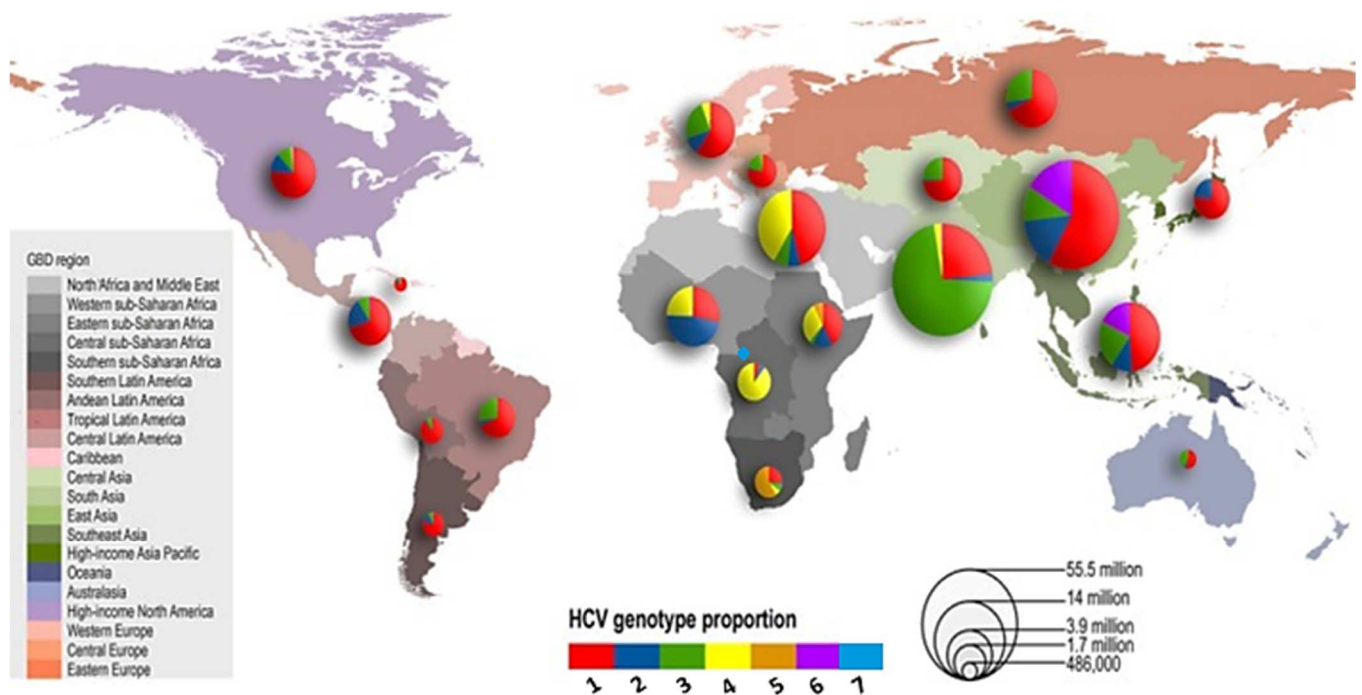


Figura 1. Prevalência relativa da taxa global da doença hepatite C de cada genótipo por região. O tamanho dos gráficos de pizza é proporcional ao número de casos soroprevalentes estimados por Hanafiah, et al 2013. Adaptado de Messina JP, et al 2015, incluído o genótipo 7.

No Brasil a notificação compulsória de hepatites virais teve início em 1996, desde então, a coleta de dados sobre a ocorrência dessas doenças passou a compor

as ações de vigilância epidemiológica. Atualmente, cerca de 1,45 milhões de pessoas são infectadas pelo VHC e os óbitos por hepatite C representam atualmente a maior causa de morte entre as hepatites virais no Brasil. Entre 1999 e 2016, foram detectados no Brasil 319.751 casos de hepatite C, sendo a região Sul com maior taxa de detecção, com 12 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelas regiões Sudeste (9,6), Centro-Oeste (3,9), Nordeste (1,6) e Norte (1,0), em 2014. Houve uma tendência na elevação da taxa em todas regiões a partir de 2015, devido a mudança no critério de confirmação de casos de hepatite C. Na revisão os casos positivos foram considerados positivos quando um dos marcadores anti-VHC e/ou VHC-RNA foram reagentes.

Ainda, entre 2000 e 2015, foram identificados 46.314 óbitos relacionados à hepatite C, a região Sul apresentou um coeficiente de mortalidade por VHC como causa básica de morte para 1,5/100.000 habitantes. No estado do Rio Grande do Sul (RS), o coeficiente era de 2,8/100.000 habitantes, quase três vezes maior que a média nacional para o mesmo período (15). Em 2013, Pereira e colaboradores descreveram a prevalência de portadores com anticorpos contra HVHC entre as regiões do Brasil em torno de: Norte 4%, Nordeste 1,4%, Centro-Oeste 2,5%, distrito federal 1,7%, Sudeste 2,5% e Sul 2,3%. Atualmente, o número de casos é maior entre homens, e a maior taxa em ambos os sexos está entre a faixa etária de 55 a 59 anos (15,16).

No território brasileiro existem infecções pelos VHC dos genótipos 1, 2, 3, 4 e 5. Um estudo no Estado do Amazonas de 2004, identificou a seguinte distribuição: GT1a (26,9%); 1b (46,2%); 2b (3,8%); 3a (15,5%); 4 (3,8%) e 5 (3,8%), em outro estudo maior prevalência foi do GT1b (48,8%), em diversos grupos de risco (17).

Um estudo com a população do Sudeste de 2008, também o GT1 do VHC foi o mais prevalente, seguido dos GT3 e 2. Foi observado uma enorme prevalência do genótipo 3, 40%, diferente de outros estudos. Em várias regiões do Brasil, foram encontrados os genótipos do GT1, 2, 3, 4 e 5 entre as 1.688 amostras estudadas. A distribuição das frequências foram as seguintes: 64,9% para o GT1, 4,6% para o GT2, 30,2% para o GT3, 0,2% para o GT4 e 0,1% para o GT5 (18,19), conforme figura 2.

A prevalência de estágios de fibrose hepática e cirrose foi relatada em estudos com pequenas amostras no Brasil. Utilizando a biópsia hepática como referência, observou-se fibrose leve a moderada (F0, F1e F2) em até 70% dos pacientes (19). Até 8% dos pacientes brasileiros com cirrose desenvolveram CHC em um período de 10 anos de acompanhamento (20). A cirrose terminal é a principal indicação para o

transplante de fígado em todo o mundo, até 75% dos pacientes submetidos a transplante hepático em hospitais brasileiros apresentavam CHC.

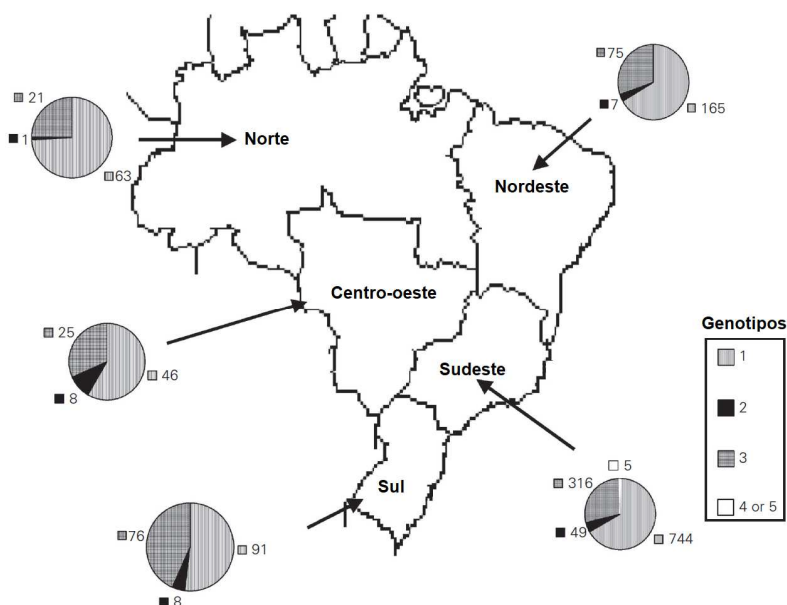


Figura 2. Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C nas diferentes regiões brasileiras. O número absoluto de casos de cada genótipo encontrado em cada região é mostrado. Extraído e adaptado de Campiotto et al. 2005.

1.3 Aspectos Clínicos na infecção da hepatite C

As principais manifestações clínicas durante a infecção por VHC são a cirrose, o CHC e a hepatite fulminante. A história natural da infecção pelo VHC é variável e de difícil previsibilidade, devido aos diversos fatores envolvidos nos aspectos clínicos, os quais podem ser relacionados ao vírus (genótipos, carga viral), ao hospedeiro (idade, sexo, etnia, doenças metabólicas, doenças hepáticas concomitantes, fatores genéticos) ou ao ambiente (consumo de álcool, tabagismo, dieta, coinfeções pelos VHB e pelo HIV) (21). Estudos elaborados sobre o curso temporal de eliminação espontânea da hepatite C aguda são difíceis de realizar devido ao início silencioso da doença e ausência ou presença de sintomas clínicos leves. A fase aguda da hepatite C geralmente é assintomática em 90% das pessoas infectadas, e se caracteriza por um aumento transitório na taxa de transaminases séricas. Nesse estágio, o primeiro marcador detectável é o RNA viral que aparece uma a duas semanas após a exposição, seguido dos anticorpos IgG anti-VHC. Entretanto este segundo marcador aparece entre sete a oito semanas depois (13). As características iniciais da doença aguda são sintomas não específicos, comuns a muitas infecções virais

agudas. Sintomas mais específicos de hepatite viral podem ser encontrados em uma minoria de indivíduos, pode aparecer astenia, anorexia, urina escura, febre e dores musculares e articulares, desconforto abdominal, enquanto, sinais de icterícia não são frequentes. A definição de hepatite C aguda (HCA) ocorre através dos seguintes resultados de diagnóstico: (a) soro-conversão recente (período de seis meses), anti-VHC negativo no início dos sintomas ou no momento da exposição ao VHC e segunda dosagem realizada com intervalo de 90 dias com resultado positivo de anti-VHC; (b) detecção de anti-VHC negativo, porém positivo na detecção do RNA viral, em até 90 dias após o início dos sintomas ou da data de exposição, quando esta for conhecida. Em torno de 20% dos casos, ocorre a cura espontânea através de efetiva resposta imunológica inata e adaptativa (22). O resultado da infecção pelo VHC é determinado pelo equilíbrio da interação dinâmica entre a virulência do vírus e a resposta imunológica do hospedeiro, além da contribuição de fatores ambientais e do hospedeiro que podem influenciar essa interação (23).

Em cerca de 80% dos casos o sistema imunológico não é capaz de erradicar o VHC durante a fase aguda da infecção. A transição da hepatite C aguda para crônica é geralmente subclínica, sendo o desfecho mais comum geralmente caracterizado pelo aumento nos níveis de aminotransferases séricas podendo levar a fibrose e cirrose no fígado. Após seis meses de persistência do RNA viral no sangue e da presença de anticorpos anti-VHC, a infecção é definida como crônica. Assim, a cronicidade é a principal complicação da hepatite C aguda.

Durante a fase crônica da hepatite, a maioria dos pacientes é assintomático, entretanto alguns pacientes podem apresentar sintomas inespecíficos como fadiga, artralgia ou mialgia e os níveis de transaminases podem estar moderadamente aumentados (24). A evolução a longo prazo da infecção crônica é variável, porém alguns fatores podem contribuir para a progressão da doença como: idade acima de 40 anos, sexo masculino, co-infecção pelo HIV, maior índice de massa corporal, fígado gorduroso e consumo de álcool (25). Em média 25% dos pacientes desenvolvem uma cirrose após um período entre 10 e 30 anos. A cirrose pode estar associada a uma insuficiência hepática, como uma descompensação após uma hipertensão portal (ascite, hemorragia gastrointestinal, etc). Em pacientes cirróticos, o risco de morte por complicações é de 4% ao ano, e o risco de desenvolver um carcinoma hepatocelular (CHC) é de 1 a 5% ao ano. Trinta e três por cento dos pacientes com HCC morrem dentro de um ano após o diagnóstico. No geral, entre os

pacientes com cirrose, a taxa de sobrevivência em 5 anos é de 50%. Na verdade, a cirrose descompensada é a causa principal de transplante de fígado (13), figura 3.

Além das doenças hepáticas, a infecção crônica pelo VHC também está envolvida em uma variedade de doenças extra-hepáticas, afetando os rins, pele, glândulas salivares, olhos, tireóide, articulações, sistema nervoso e sistema imunológico. Dentre as doenças extra-hepáticas, destaca-se a crioglobulinemia mista, uma doença auto-imune e linfoproliferativa caracterizada pela circulação de complexos imunológicos chamados crioglobulinas. Os mecanismos que causam essas doenças não são completamente compreendidos e a fisiopatologia é multifatorial relacionada a fatores endócrinos, replicação do VHC em células extra-hepáticas e ativação imunológicas com efeitos sistêmicos (26).

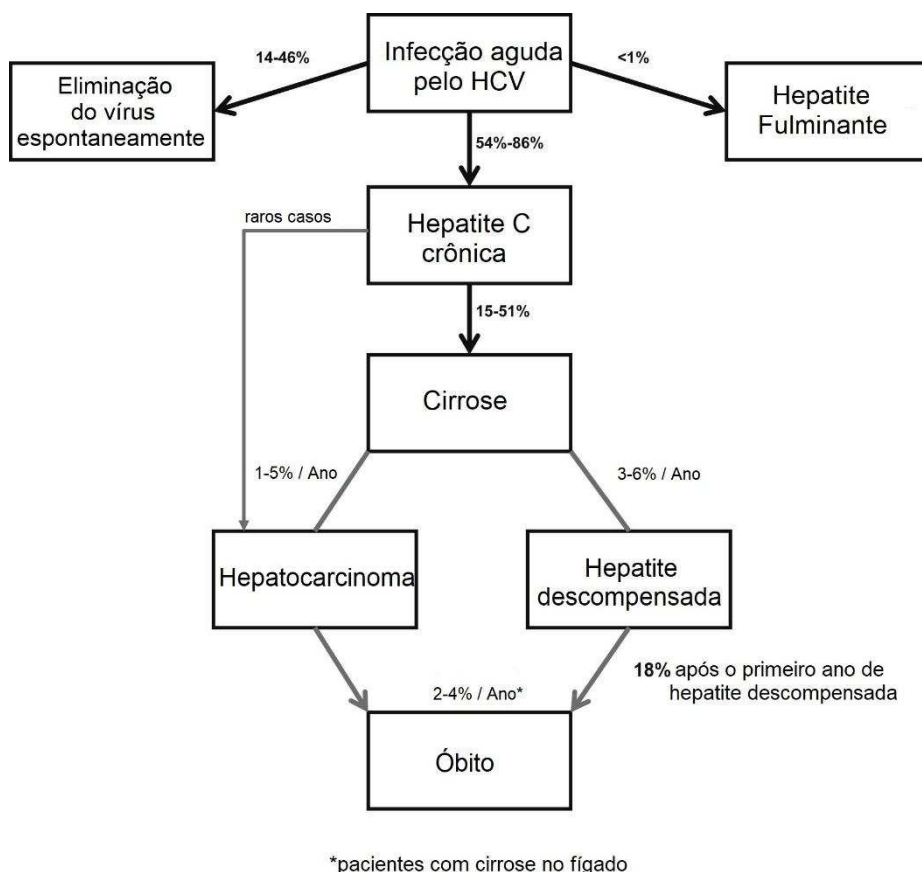


Figura 3. História natural da infecção pelo vírus da hepatite C. Extraído de Maasoumy B. et al. 2012.

1.4 Transmissão

O VHC é um agente infeccioso transmitido pelo sangue que infecta naturalmente humanos, mas os chimpanzés podem ser infectados experimentalmente (13). A transmissão sanguínea é a principal via de infecção pelo VHC e o RNA viral pode ser detectada entre 7 e 21 dias após a transfusão sanguínea, podendo ter períodos de incubação mais longo nos casos em que pequenas quantidades de cargas virais foram transmitidas (25). A transmissão através da transfusão sanguínea é relevante em indivíduos que necessitam continuamente de transfusão sanguínea, como pacientes com talassemia, hemofilia, insuficiência renal crônica e necessidade de hemodiálise, além de vários tipos de câncer. Há transmissão via intravenosa, a ocasionada pela injeção insegura, especialmente com seringas e agulhas multiuso, ato comum entre usuários de drogas. A transmissão vertical do VHC da mãe para o feto é limitada e ocorre em até 5% dos casos, sendo que em mães com co-infecção com HIV, a transmissão vertical sobe para 10%, contudo, a cesariana não aumenta a taxa de infecção pelo VHC (13,27). Entre os profissionais de saúde, a lesão acidental ocasionada por agulha contaminada é uma importante causa de infecção pelo VHC. Assim, os profissionais de saúde com exposição ocupacional ao HIV e VHC devem confirmar seus resultados negativos seis meses após a suspeita de infecção, devido à soroconversão tardia (28). A infecção pelo VHC também pode ser transmitida com contato sexual, sendo a minoria dos casos, porém esse risco aumenta entre pessoas com múltiplos parceiros sexuais. Pode ocorrer a transmissão nosocomial devido ao uso de dispositivos médicos não estéreis, como endoscopia, angiografia e dispositivos cirúrgicos. Também pode haver transmissão via procedimentos médicos como ginecologia, cardiologia, angiografia, endoscopia, colonoscopia, aparelhos cirúrgicos e ventosaterapia. Métodos como tatuagem, piercing e escavação como agente adicional para a transmissão do VHC (7). A figura 4 mostra as notificações da hepatite C separadas pela provável via de transmissão.

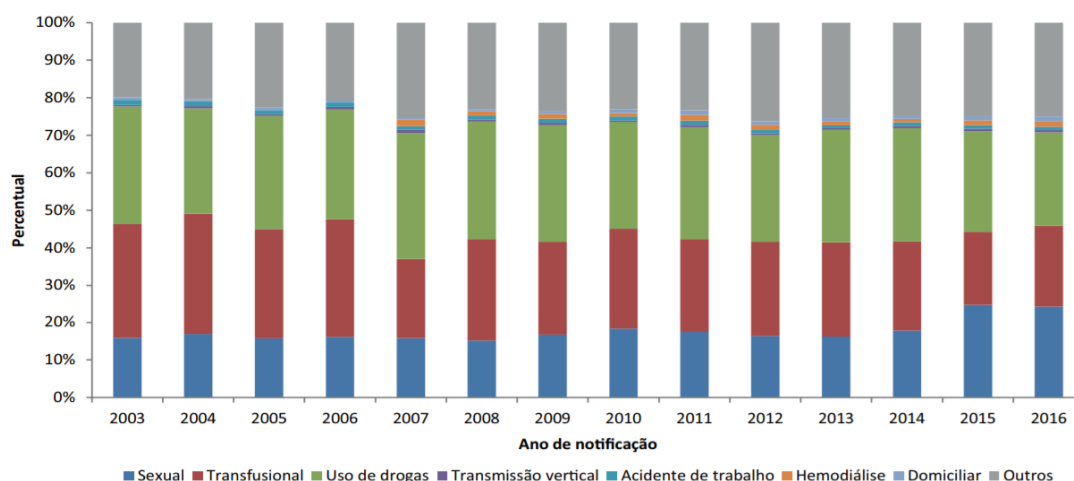


Figura 4. Proporção de casos de hepatite C segundo provável fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação. Brasil, 2003 a 2016. Extraído do Boletim de hepatites de 2017, Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde.

1.5 Diagnóstico da infecção pelo VHC

O rastreio da infecção pelo VHC é realizado através da detecção dos níveis séricos de anticorpos anti-VHC utilizando ensaio imunoenzimático (EIA). Os atuais testes de triagem de terceira e quarta geração contêm múltiplos antígenos recombinantes do nucleocapsídeo do VHC e proteínas virais não estruturais, como NS3, NS4 e NS5, fornecendo alta precisão para a detecção da exposição ao VHC (13). Os anticorpos contra o VHC também podem ser detectados por testes rápidos (TR), testes de imunocromatografia de fluxo lateral em amostras de sangue total com punção digital. Esses testes não exigem instrumentos complexos e fornecem o resultado em até 20 minutos. Pacientes anti-VHC positivo indicam um contato prévio com o vírus, mas não distingue entre uma infecção resolvida naturalmente ou uma infecção ativa. Sendo assim, se faz necessário confirmação pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR), onde o RNA do VHC no soro ou plasma pode ser detectável dentro de poucos dias após a infecção (29). Indivíduos com RNA VHC positivo devem ser submetidos ao estadiamento da doença para avaliar a extensão da fibrose por biópsia hepática ou métodos não invasivos e deve-se identificar o genótipo viral da infecção pelo VHC. Nesses casos, geralmente utiliza-se o sequenciamento direto de regiões específicas dentro do genoma viral, seguido por alinhamento às sequências de referência e análise filogenética. A definição do genótipo do VHC pode orientar a seleção, dosagem e duração global do tratamento (13,29).

1.6 O vírus da hepatite C

1.6.1 Partícula viral

O vírus da hepatite C pertence a Família *Flaviviridae*, do gênero *Hepacivirus*. Esta família inclui gênero *Pestivirus* que infectam mamíferos não humanos, gênero *Pegivirus* (GB-A, GB-C e GB-D), e gênero *Flavivirus* que inclui o vírus da febre amarela, vírus da dengue e o vírus Zika. Os membros da família *Flaviviridae* compartilham uma série de características virológicas e estruturais básicas, como por exemplo a organização genômica (13)

Baseado na diversidade da sequência do genoma viral, atualmente o VHC está classificado dentro de 7 genótipos e 67 subtipos confirmados, sendo 20 subtipos atribuídos provisoriamente e 21 subtipos não atribuídos. O VHC GT1 a GT6 e seus subtipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 4d, 5a e 6a estão bem identificados em todo o mundo, com características epidemiológicas importantes ou em grupos populacionais específicos (30). Os genomas de isolados do VHC diferem em cerca de 30% ao nível dos nucleotídeos e mesmo dentro dos subtipos, diferentes isolados podem variar em até 10%. Assim, o VHC tem um alto nível de heterogeneidade genética, com implicações importantes para o diagnóstico, tratamento e para desenvolvimento de uma vacina eficaz. Frequentes mutações promovem o surgimento de variantes nos genomas virais que circulam como quasispecies em indivíduos infectados. Duas quasispecies com importância epidemiológica definidos como RFI 2k/1b, (31) já foram descritas.

O VHC é um vírus icosaédrico, com cerca de 56 a 65 nm de diâmetro, constituído de um genoma de RNA de fita simples de polaridade positivo, um nucleocapsídeo, e um envelope lipídico contendo duas glicoproteínas virais, E1 e E2, como mostra a figura 5 (32). A quantidade significativa de lipoproteínas contidas nas partículas virais do VHC, é uma característica marcante deste vírus. A presença de membrana lipolipídica formada por lipoproteínas de baixa densidade (LDL - low density lipoproteins), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL - very low-density lipoproteins) e apolipoproteínas (Apo) A1, B, C e E (33). As partículas virais associadas às lipoproteínas são chamadas de “partículas lipovirais (LVP - *lipoviral particles*) e possuem um tamanho entre 70 e 80 nm de diâmetro. Estudos relatam a importância destas lipopoliproteínas, VLDL na montagem e secreção de partículas

infecciosas, enquanto as ApoB e ApoE estão relacionadas com a infectividade viral. A lipase lipoprotéica (LPL) está relacionado ao hepatotropismo do VHC (34).

Devido à falta de um método *in vitro* robusto para estudar a replicação do vírus da hepatite C e as interações ao hospedeiro, a melhor compreensão do ciclo de vida do VHC foi realizada principalmente pelas técnicas de biologia molecular (35).

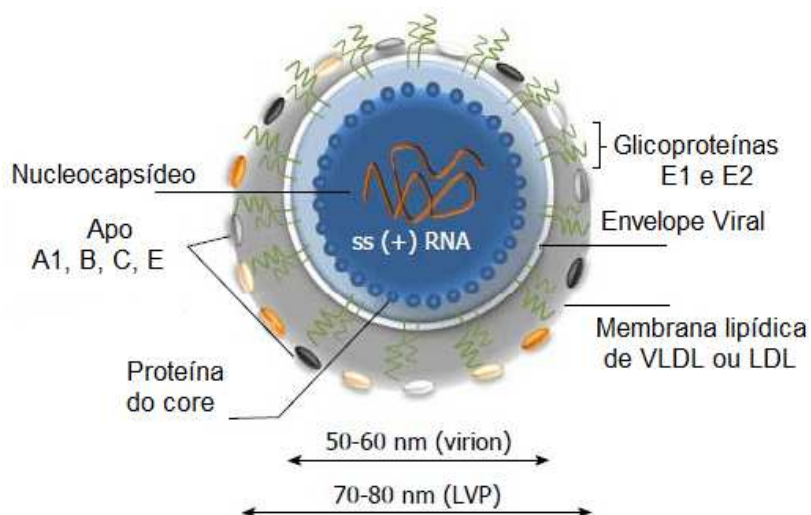


Figura 5. Características da partícula do vírus da hepatite C. Adaptado de Morozok VA e Lagaye, 2018

O genoma viral é constituído por aproximadamente 9600 nucleotídeos (nt), contendo 2 regiões altamente conservadas não traduzidas 5'UTR e 3'UTR (UTR – untranslated). As regiões UTRs flanqueiam uma única fase de leitura aberta (*open reading frame - ORF*) que codifica uma poliproteína de 3010 a 3033 aminoácidos (aa) e a tradução é inicializado pela IRES da 5'UTR no retículo endoplasmático. Em geral miRNAs interagem com a região 3'UTR de mRNAs para promover a desestabilização do mRNA e / ou repressão translacional. Na infecção por VHC, a ligação do miR-122 ao 5' UTR do RNA do vírus regula positivamente a replicação viral, o miR-122 é altamente expresso no fígado (36).

A poliproteína pode ser dividida em três segmentos baseados no aspecto funcional das proteínas, sendo clivada por proteases, que geram três proteínas estruturais: proteína do nucleocapsídeo e proteínas de envelope E1 e E2 localizadas na parte N terminal, e sete proteínas não estruturais (NS): NS1 (p7), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B localizadas na parte C terminal. As proteínas estruturais assim como as NS exercem um papel principal no ciclo de vida viral, e também estão

envolvidas na morfogênese, na replicação do RNA e regulação das funções celulares, contudo todas são multifuncionais, figura 6 (13).

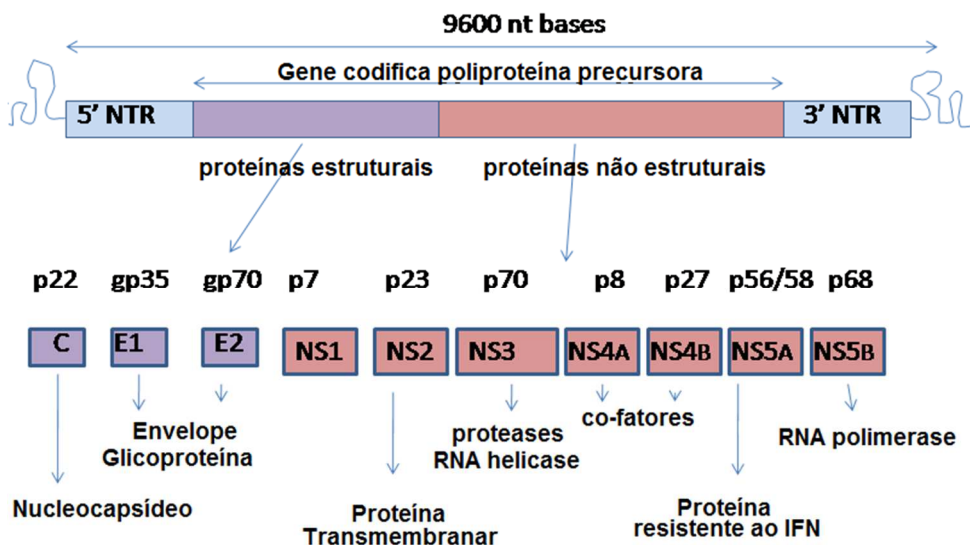


Figura 6. Estrutura genômica do vírus da hepatite C. Adaptado de https://ca.wikipedia.org/wiki/Virus_de_l%27hepatitis_C.

A proteína do núcleo do HCV é traduzida como uma proteína imatura de 22 kDa, contém três domínios. Estão envolvidos na ligação ao RNA viral, na criação de ligações com a gotícula lipídica (LD) e o terceiro domínio contém a sequência de sinal para a translocação da membrana do RE do ectodomínio de E1. A proteína do núcleo está direta ou indiretamente envolvida na hepatocarcinogênese e na hepatite por esteatose. Interage com numerosas proteínas celulares e afeta as funções das células do hospedeiro, tais como transcrição gênica, metabolismo lipídico, apoptose e várias vias de sinalização (13,15).

As glicoproteínas E1 e E2 são necessárias para fusão e entrada do vírus, respectivamente. Os ectodomínios destas glicoproteínas são fortemente glicosilados, com seus sítios bastante conservados, porém variando entre os genótipos (10). Vale a pena mencionar que alguns dos glicanos estão envolvidos na dobragem e formação dos complexos heterodímeros E1-E2 na superfície do vírus. Estes complexos são essenciais para a interação com os receptores celulares e ajudam a promover a fusão vírus-a-célula (37) e a variação antigênica (38).

A NS1 (chamado também de “p7”) é uma pequena poliproteína de 63 aa de comprimento, localizada entre as proteínas E2 e NS2, sua clivagem é mediada pela sinalização das peptidases das células do hospedeiro (36). A NS1 possui dois

domínios transmembranares conectados pela alça citoplasmática e translocados para o lúmen do RE. Está descrito que a NS1 também pode formar o canal iônico que tem um papel importante na infecção pelo VHC e este canal pode ser bloqueado pela amantadina (36). Os estudos recentes demonstram que NS1 atua para prevenir a acidificação que é necessária para a produção de partículas de VHC. Além disso, a proteína parece ser essencial durante a montagem e liberação de partículas infecciosas, como mostrado em diferentes genótipos (39). Com base nisso, a NS1 pode ser considerada como um alvo potencial para novos antivirais (13).

A função bem conhecida da NS2 está na sua capacidade de auto clivagem no local NS2/3. Estudos sugeriram que a expressão da NS2 do VHC resulta na regulação positiva da síntese dos ácidos graxos, que pode estar relacionada ao papel da NS2 na estimulação da esteatose induzida pelo VHC. Existem dados a favor do envolvimento desta proteína na montagem e liberação viral (24).

A NS3 juntamente com a proteína NS4 estão envolvidas na clivagem das junções NS3/4A, NS4A/4B, NS4B /5A e NS5A/5B (23,40). Sugere-se que essas proteínas possam agir juntas durante a replicação do VHC. A protease NS3/4A do VHC também pode clivar alguns alvos celulares envolvidos na imunidade inata, como MAVS (Mitochondrial antiviral-signaling), que pode indiretamente ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B - *nuclear factor-kappa B*) e o fator regulador do interferon 3 (IRF3 - *Interferon regulatory factor 3*) a induzir interferon tipo I. A protease NS3/NS4A é essencial para a infectividade viral, portanto, é um alvo promissor para antivirais. Em 2011, dois potentes inibidores NS3/NS4A, boceprevir e telaprevir (41) foram aprovados pelo FDA e EMA e foram utilizados em combinação com IFN- α e ribavirina. No entanto, várias mutações associadas à resistência dentro da região codificadora NS3/NS4A foram observadas.

A NS4A tem seu papel na replicação do VHC, também pode contribuir para a patogênese viral, influenciando algumas funções celulares (42). A atividade de polimerização e a modificação lipídica da NS4B são importantes para a indução da estrutura de membrana especializada para a replicação do RNA viral, entretanto, não está envolvida diretamente na replicação do vírus, mas pode contribuir para a montagem e a liberação das partículas de vírus (43). A fosfoproteína NS5A é multifuncional e contribui para a replicação do VHC, patogênese do vírus, modulação das vias de sinalização celular, propagação do vírus e resposta do interferon.

A NS5A inicialmente atraiu um interesse considerável devido a sua função na modulação da resposta ao IFN, pois contém uma "região que determina a sensibilidade ao interferon- α (ISDR- *interferon- α sensitivity-determining region*) de 237-276 aa. A primeira função descrita desta proteína, foi a inibição da proteína quinase dependente RNA (PKR). Foi encontrada interagindo diretamente com gene estimulado pelo IFN- α , induzindo ocasionalmente, a interrupção da síntese protéica celular. A NS5A pode modular as três principais vias da MAPK envolvidas na sinalização mitogênica da célula hospedeira, que regulam o crescimento e a ativação. O NS5A é capaz de regular a sinalização celular por mecanismos pró e antiapoptóticos. Também tem sido implicado na interferência nas vias das ROS e nas vias de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase, o que pode levar à transformação de hepatócitos e formação de HCC (44). Devido ao seu papel fundamental na replicação do vírus, as proteínas NS5A e NS5B são consideradas alvos para os antivirais de ação direta, por exemplo o daclatasvir e sofosbuvir, respectivamente (13,23).

Além das dez proteínas descritas acima, a proteína de frame-shift (F) ou de frame de leitura alternativo (ARFP), foi relatada (45). A ARFP é uma proteína viral de vida curta localizada no citoplasma associado ao retículo endoplasmático. A detecção de anticorpos anti-ARFP em soros de indivíduos positivos para o VHC indica que a proteína é expressa durante a infecção, mas provavelmente não está envolvida na replicação do vírus. Alguns achados sugerem o envolvimento da ARFP na modulação da função das células dendríticas e estimulação das respostas das células T (13).

1.6.2 Replicação viral

O VHC pode infectar hepatócitos através de duas vias: penetra direta nas células ou pela disseminação de célula para célula. Na entrada livre de células, partículas virais extracelulares, transportadas pelo sangue, interagem com receptores dos hepatócitos que ocorre principalmente durante a infecção aguda. A disseminação célula-a-célula é quando as células infectadas transmitem vírus para as células vizinhas e ocorre principalmente em hospedeiros cronicamente infectados. A infecção célula-a-célula persiste mesmo na presença de anticorpos anti-VHC, sugerindo que esta via de infecção é uma estratégia eficaz para o vírus escapar às respostas imunes humorais do hospedeiro (26).

O VHC possui tropismo pelas células do fígado, os hepatócitos, contudo, pode proliferar em tecidos extra-hepáticos, incluindo células mononucleares do sangue periférico. As partículas virais são transportadas dentro do fígado pelo fluxo sanguíneo, através da fenestração e no espaço Disse, onde o vírus pode entrar em contato com os receptores da membrana basal dos hepatócitos. Para uma entrada bem-sucedida são necessários 6 fatores: fator de ligação o HSPG (*Heparan Sulfate proteoglycan*), um tipo de receptor glicosaminoglicanos (GAG), receptor de LDL-R, 2 fatores de entrada as proteínas CLDN1 (claudina) e OCLN (occludina), e dois receptores SR-B1 (*Scavenger Receptor class B Member 1*) e CD81 que são expressas na superfície celular (figura 7). O início da entrada do VHC parece ser semelhante ao de muitos outros vírus, que se ligam através das GAGs, estudos demonstraram que as apolipoproteínas das partículas do VHC interagem com as lipoproteínas da membrana celular, sugerindo que as ApoE é responsável pela interação com as GAGs (46). O LDL é necessário na fase inicial de fixação e a glicoproteína E2 interage com os receptores, SR-B1 e com CD81 (proteína da família tetraspanina -TSPAN28). Foi demonstrado que as proteínas CD81 e Cldn1 podem interagir com a superfície dos hepatócitos, sugerindo que o CD81-Cldn1 forma um complexo relacionado com a entrada do VHC (23).

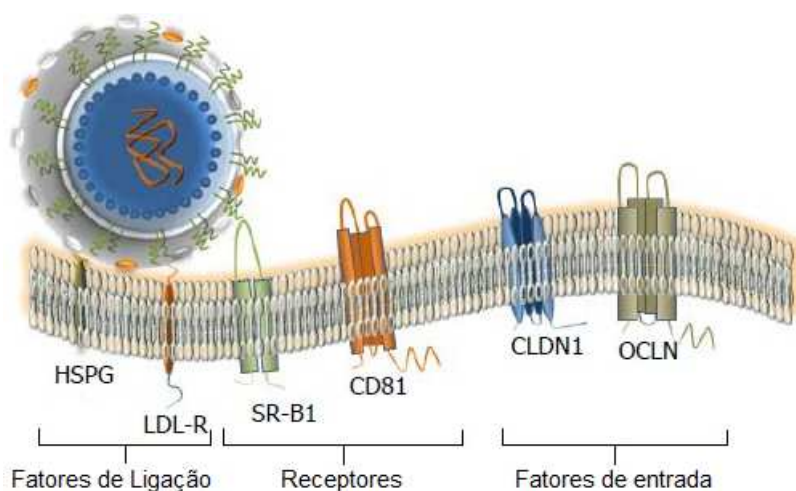


Figura 7. Fatores da célula do hospedeiro utilizadas pela partícula viral do VHC envolvidas na ligação e entrada a célula iniciando o processo de replicação viral. Extraído de Morozok VA e Lagaye, 2018.

Após ligação e fixação nas células, o vírus da hepatite C é internalizado por endocitose dependente das proteínas clatrinadas (46). As partículas são liberadas para o endossomo, onde permanecem até que ocorra a diminuição do pH interno mediado

pela proteína Rab-5 (RAB5A), desencadeando a fusão do envelope viral e da membrana endossômica. O capsídeo viral é liberado e destruído, e o RNA viral é liberado no citoplasma celular, sendo um RNA (+), o RNA viral atua como mRNA e, portanto, é traduzido diretamente. O RNA é utilizado para ambos os processos a replicação e a tradução da poliproteína. A tradução do RNA ocorre no retículo endoplasmático (ER) e é iniciada por uma ligação do IRES da região 5'UTR ao ribossomo. O produto de tradução primário é um precursor de poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que é clivada pelas proteases do hospedeiro e virais em proteínas estruturais e não estruturais, conforme descrito anteriormente. O vírus da hepatite C, como outros vírus de fita simples de polaridade positiva, induz a alteração no sistema de membranas celulares. A montagem do virion é outro processo de vários passos, sabe-se que a montagem de partículas ocorre dentro do RE próximo ou diretamente na superfície a gotas de lipídeos (LD). A proteína NS5B é responsável por codificar a RNA polimerase dependente de RNA, que replica o genoma pela síntese de RNA de cadeia negativa. Este RNA de fita negativa serve como modelo para a síntese de RNA de fita positiva. A replicação e o processamento pós-traducional parecem ocorrer em uma trama membranosa formada por proteínas não estruturais do vírus e por proteínas da célula hospedeira chamadas de "complexo de replicação", localizadas nas membranas perinucleares. A encapsidação do genoma parece ocorrer no retículo endoplasmático e o nucleocapsídeo é envolvido pelo envelope e amadurecido no complexo de Golgi antes que os vírus recém-produzidos sejam liberados no espaço pericelular por exocitose (23), figura 8.

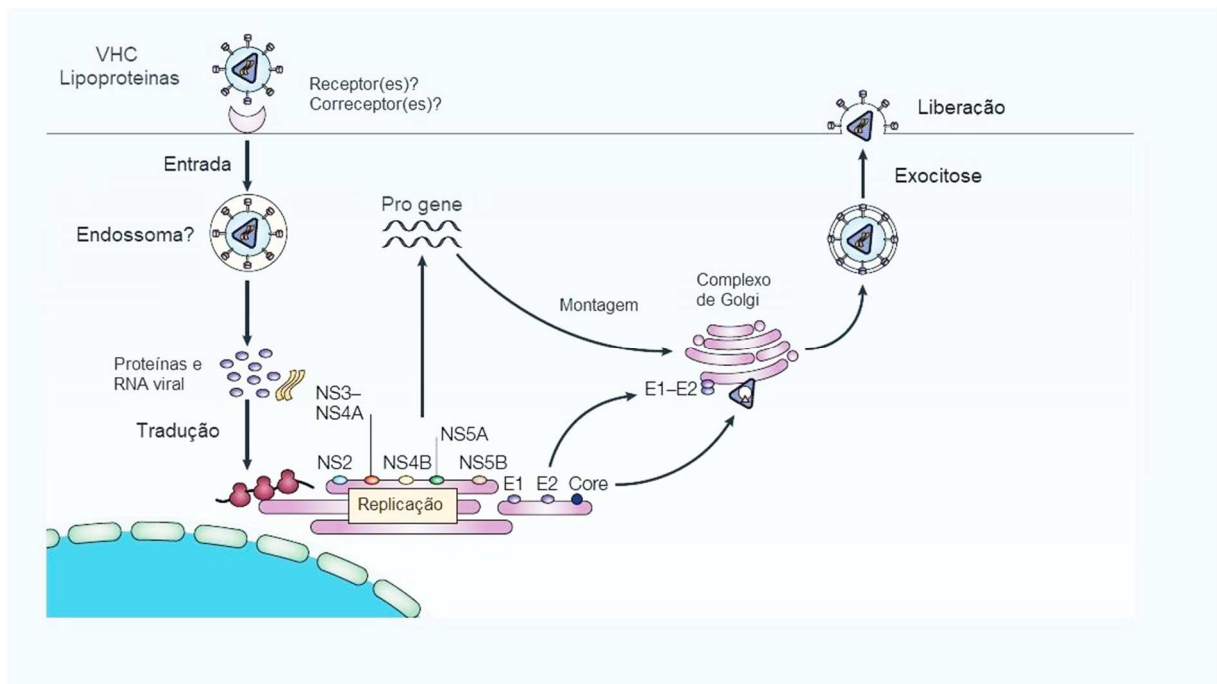


Figura 8. Ciclo de replicação do vírus da hepatite C. Adaptado Rehermann B. & Nascimbeni M., 2005.

1.6.3 Resposta imunológica na hepatite C

O controle da infecção da Hepatite C exige funções coordenadas do sistema imunológico, incluindo a resposta inata com participação importante dos IFNs, célula natural killer (NK e NKT), bem como a resposta adaptativa mediada por células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas ao VHC. Foi demonstrado que células T CD4⁺ específicas foram determinantes na resposta imunológica para eliminação do VHC em pacientes com HCA (47). As respostas imunológicas também servem de limite à progressão da doença hepática, quando não ocorre a eliminação do vírus (48,49).

Imediatamente após contato e penetração do vírus nas células do hospedeiro o sistema imunológico é alertado, desencadeando uma série de mecanismos para eliminação viral. As células imunológicas detectam a presença do vírus por meio de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern recognition receptors*), iniciando uma rápida resposta imunológica através da liberação de IFN tipo I e III. Além disso, os IFNs ativam e recrutam células para o tecido infectado e ativam as células imunológicas para adquirir funções efetoras. Ocorrendo também a ativação e atração de células do sistema imune como neutrófilos, células dendríticas (CD), macrófagos, células NKs que constituem a primeira etapa de controle da proliferação e restrição do espalhamento do vírus (50). As células NKs reconhecem alvos que

expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I, proteínas derivadas de patógenos e / ou proteínas celulares induzidas por estresse celular. Ainda, podem auxiliar na diferenciação das células T, na maturação das CDs na capacidade de secretar citocinas imunomoduladoras e antivirais. Contudo, a citotoxicidade das células NK através da via perforina / granzima não é tão efetiva na infecção pelo HCV, uma vez que os hepatócitos são relativamente resistentes à lise por essa via (51).

A maior população de células imunológicas do braço inato no fígado é da célula de Kupffer (CK), macrófagos residentes no tecido hepático. São células fagocíticas, que compõem a primeira barreira no fígado contra patógenos, uma vez que estão localizadas na periferia da veia porta e nos sinusóides hepáticos. Entretanto, a contribuição específica destas CK não é bem conhecida, devido às características sobrepostas entre os macrófagos que infiltram o fígado e macrófagos residentes (CK). Possuem função de ligação e / ou absorção do vírus, levando ao reconhecimento imunológico e à produção de mediadores pró-inflamatórios, resultando na inibição dos vírus nos hepatócitos, ativação de células vizinhas, ativação e interação com outras células imunológicas, aumentando resposta antiviral e inflamatória. A ativação das CK são importantes para eliminação do HCV, mas também podem contribuir para o dano tecidual e desenvolvimento de fibrose, cirrose e CHC durante hepatite viral crônica (52).

Em modelo experimental utilizando chimpanzés infectados cronicamente foi demonstrado uma importante diminuição da viremia devido a resposta efetora de células T CD4⁺ no fígado (48,53). Em contrapartida, a diminuição da frequência de células T CD4⁺ específicas para VHC nos primeiros meses da infecção está associada à recidiva da viremia. Visto que, a depleção de células T CD4⁺ foram associados na persistência e o escape dos vírus, prejudicando a indução ou manutenção de respostas imunológicas. As respostas mediadas pelos linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel importante no aumento de citocinas e além disso primam e realizam a manutenção de células de memória T CD8⁺ (54).

As células T CD8⁺ com função efetora citotóxica (CTLs) estão relacionadas tanto na citólise de células infectadas quanto na produção de citocinas que levam a eliminação viral. Em amostras de chimpanzés foi observado que resposta precoce de CTLs CD8⁺ secretoras de IFN- γ intra-hepático direcionadas para múltiplas proteínas virais, resultam na resolução da infecção. Outros estudos confirmam que as respostas

de células T estão associadas a eliminação viral pelos níveis elevados de IL-2 e IFN- γ . Entretanto, a persistência do VHC está associada a uma alta frequência de células T reguladoras (Treg) podendo suprimir os CTLs específicos contra VHC.

De fato, o VHC promove majoritariamente infecções persistentes e o desenvolvimento da cronicidade é marcado por uma diminuição dramática na atividade de CTLs e de células T CD4⁺ no fígado. Estudos demonstram que o VHC utiliza vários mecanismos de escape do sistema imunológico do hospedeiro. Inicialmente, chimpanzés infectados com VHC experimentalmente, demonstraram que a resposta do IFN tipo I intra-hepático não está correlacionada com o desfecho favorável da infecção, indicando que o VHC não é sensível a ação dos IFNs tipo I na resposta *in vivo* (55). Outros estudos *in vitro* mostram que as funções das células NK podem ser inibidas por altas concentrações de proteínas de envelope viral E2 interagindo com CD81 (molécula de superfície celular), e os níveis de expressão do IRF1 um fator essencial para ativar células NK, não se altera durante infecção aguda pelo HCV, alterando a produção de citocinas e suas capacidades de ativar as CDs (50). Ocorre então uma cascata de falhas na resposta imunológica contra o VHC, diminuindo a capacidade das CDs de apresentar antígenos associada à presença de células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas ineficazes (48) no sangue e no fígado. E as células T presentes apresentam baixa diferenciação, enquanto que para outros patógenos uma maior diferenciação das células T específicas é observada (56). Também foi demonstrado que proteínas do *core* do VHC podem se ligar ao receptor do complemento C1q, que estão expressos em células T e macrófagos, modulando os níveis de IL-2, IL-12 e IFN- λ e por consequência reduzindo o mecanismo de citotoxicidade celular dependente de complemento (CDC) (57). As células T intra-hepáticas apresentam um fenótipo alterado para funções reguladoras. Fatores genéticos do hospedeiro também podem contribuir para a modulação de respostas imunes, bem como polimorfismos nos genes de quimiocinas (CCL5), IFN- γ , HLA, mantendo uma infecção crônica assintomática branda, favorecendo a seleção de vírus mutantes (13). E altos níveis de replicação viral são tolerados pelo sistema imunológico do hospedeiro. O papel dos anticorpos neutralizantes permanece incerto, embora seja ainda possível que a imunidade humoral contribua para o dano causado pelo VHC, através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos.

Na imunopatogenia da hepatite C tem o envolvimento de citocinas, que podem estar associadas tanto a morte dos hepatócitos e a fibrose, quanto relacionadas à

mediação da regeneração do fígado após a lesão. As citocinas Th1 têm importante papel nas hepatites agudas, não sendo relevantes na indução de fibrose, enquanto que as citocinas Th2 aumentam a transcrição de diversos genes fibrogênicos, incluindo pró-colágeno I e III, metaloproteinases de matriz como a 2 (MMP-2), ou a MMP-9 e o inibidor tecidual das metaloproteinases (TIMP). Na esteato-hepatite, as citocinas pró-inflamatórias, como TNF (fator de necrose tumoral) foram associadas com a gravidade da doença em alguns modelos animais. O TNF vem sendo descrito por sua importância central nas hepatopatias devido à sua capacidade de induzir tanto a morte quanto a proliferação dos hepatócitos. Induzindo tanto a ativação do fator nuclear kB (NF-kB do inglês: Nuclear factor - kB) e da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK do inglês: mitogen-activated protein kinase), quanto os mecanismos de apoptose mediado por caspases. Em contrapartida, também têm sido bastante estudado, citocinas que induzem uma resposta anti-inflamatória, dentre elas a IL-10 e o TGF- β . Ambas são conhecidas como inibidoras da função dos linfócitos T pró-inflamatórios e no fígado possuem ação principalmente na formação da fibrose. A IL-10 produzida por subtipos de células T, monócitos e macrófagos têm sido observadas exercer um perfil imunoregulador na hepatite viral e auto-imune, doença alcoólica do fígado em modelos animais. Pacientes com uma intensa resposta pró-inflamatória durante a infecção aguda pelo HCV podem fazer o "clearance" viral, enquanto que pacientes que respondem com um padrão antiinflamatório (com altos níveis de IL-10) tem maiores chances de se tornarem portadores crônicos.

Em pacientes com a Hepatite C crônica, a fibrose hepática é causada por células inflamatórias presentes no infiltrado intra-hepático que secretam altos níveis de citocinas e quimiocinas e induzem a secreção de colágeno pelas células estreladas hepáticas (CEH) (13). As CEHs podem apresentar diferentes fenótipos celulares com funções e características distintas que, contribuem significativamente para a homeostase metabólica do fígado. A lesão hepática provoca a transdiferenciação de CEHs ao seu fenótipo ativado, levando a uma reprogramação metabólica. Isso aumenta a autofagia, a amplificação da lesão parenquimatosa e o desenvolvimento de características fenotípicas "clássicas" de HSCs / miofibroblastos ativados. Através dessas mudanças, as células estreladas ativadas conduzem a resposta fibrótica a lesões e ao desenvolvimento de cirrose. A redução do número de CEHs contribui para a regressão da fibrose ou da cirrose e do reparo hepático na maioria, mas não em todos os pacientes (58).

Em diferentes modelos experimentais tem sido relatado o envolvimento de quimiocinas e seus receptores como mediadores pró-inflamatórios na evolução de dano ao fígado. Em humanos, quimiocinas e seus receptores desenvolvem um papel importante na eliminação viral e no desenvolvimento de inflamação crônica no tecido. Obviamente, a modulação dessas vias é importante para geração de uma resposta imunológica eficiente, e na indução do processo inflamatório durante a fase de infecção crônica. Entretanto, a modulação desta via também pode ser um mecanismo utilizado pelo VHC para escapar controle imunológico (59)

Estudos descrevem que a quimiocina CXCL10 é abundantemente expressa por hepatócitos de pacientes com HCV crônico. O nível de expressão do mRNA CXCL10 está correlacionado com a gravidade da inflamação lobular com predominância de células T, sugerindo que esta quimiocina regula o recrutamento destes linfócitos. Por sua vez, os linfócitos T infiltrantes do fígado expressaram uniformemente o receptor CXCR3/CXCL10. Como a inflamação lobular é um correlato cada vez mais reconhecido da progressão da doença na infecção crônica pelo HCV, foi sugerido que a CXCL10 pode ser um componente importante de mecanismos efetores antivirais e lesão hepatocelular por meio do recrutamento de células T CD8 citotóxicas para a vizinhança de hepatócitos infectados pelo HCV (60).

Altas concentrações séricas de CCL3 e CXCL10 estão associadas a um aumento na frequência de linfócitos T periféricos positivos para CCR5 e CXCR3 durante hepatite C crônica. Já no fígado, uma redução no número de CCR5/CXCR3-células T positivas foi observado, que poderia ser devido a regulação negativa desses receptores de quimiocinas produzidos pela alta concentração sérica de seus ligantes, figura 9 (59).

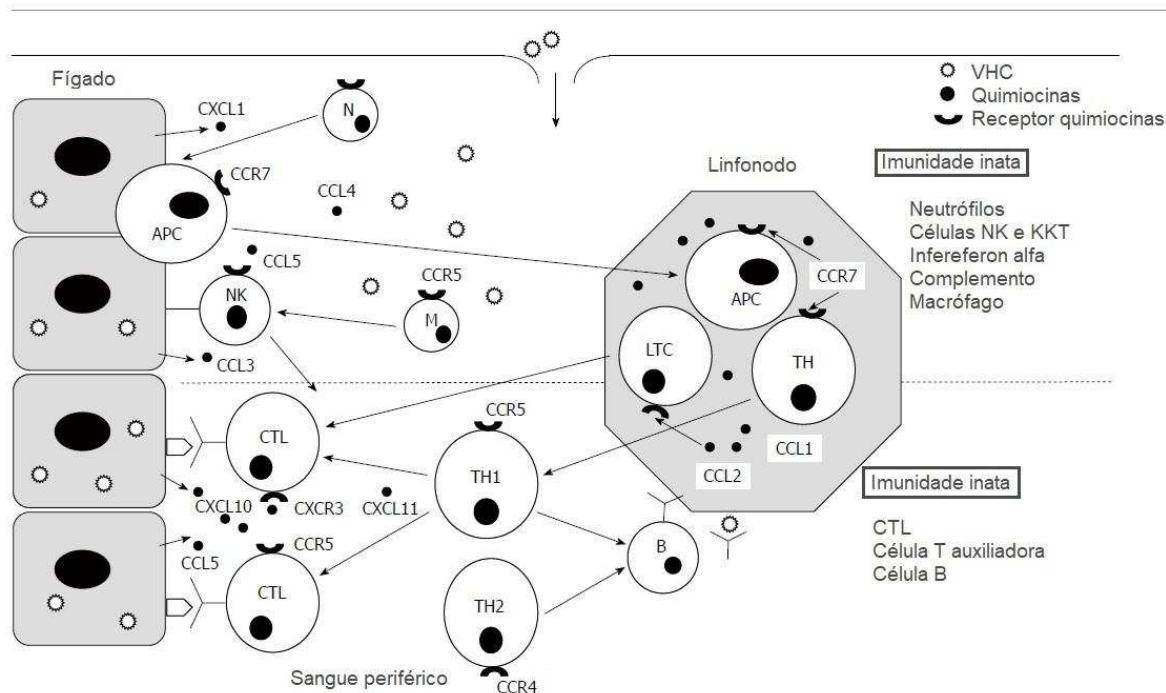


Figura 9. Resposta imunológica inata e adaptativa. Importância da resposta específica de células T citotóxicas. Numa infecção viral não citopática, o desenvolvimento de uma resposta vigorosa de CTLs é essencial. As APCs processam antígenos virais e migram do parênquima infectado para os linfonodos para estimular CTLs imaturos específicos. Estas células expressam o receptor de quimiocinas CCR7 e migram para os linfonodos, atraídos pelas quimiocinas CCL1 e CCL2. Após estímulo, os CTLs específicos param de expressar CCR7 aumentando a regulação dos receptores CCR5 e CXCR3, e depois migram para o parênquima hepático para desenvolver sua função efetora, atraídos pelas quimiocinas produzidas no fígado. Durante a fase inicial da infecção, a imunidade inata é a primeira barreira para combater o vírus. A resposta inata celular também é recrutada no parênquima infectado pela interação entre quimiocinas e seus receptores. Adaptado de Larrubia, J.R., 2008.

1.7 Tratamento

O tratamento da hepatite C crônica evoluiu exponencialmente nos últimos anos com a implementação de várias drogas antivirais de ação direta (AADs), elevando a cura desta doença para acima de 90% e diminuindo os ciclos de tratamento. Atualmente, os AADs se tornaram o tratamento padrão para a terapia de VHC em vários países, incluindo o Brasil, entretanto, uma série de desafios críticos e limitações ainda permanecem. Dentre as limitações destacam-se a dificuldade de acesso à terapia devido ao alto custo, a incerteza sobre o desenvolvimento de resistência viral, o diagnóstico precoce de portadores de VHC, a eventual falha do tratamento em um subconjunto de pacientes e a falta de imunidade contra reinfecção. Especialmente em pacientes idosos e com doença hepática avançada pode haver o risco persistente de desenvolvimento de CHC após a cura. Esses fatores em conjunto dificultam substancialmente o controle da infecção viral através de terapias baseadas em AADs,

portanto, o Peg-IFN α ainda é utilizado como tratamento padrão em alguns países, e alguns casos especiais (53,54).

A resposta a terapia com alfapeginterferona estão agrupadas em 3 padrões de modo geral: pacientes com RVS, com resposta no final do tratamento com recidiva e não resposta. A RVS é definida com a não detecção do RNA viral durante o tratamento e durante pelo menos 6 meses após o término do tratamento. Cerca de 95% dos pacientes que atingiram RVS apresentam resposta durável. A terapia com IFN- α durante a hepatite C aguda reduz a taxa de cronicidade para abaixo de 10%. Surpreendentemente, quase todos os pacientes com hepatite C aguda (independentemente do genótipo ou da carga viral inicial) rapidamente não apresentam RNA viral durante a terapia (61) Alguns pacientes podem apresentar respostas transitórias e recidiva ocorrendo entre 10% – 25% dos casos. Nesses casos não é detectado RNA viral por semanas, contudo ao final do tratamento o RNA do HCV é detectável, (62) como mostra na figura 10.

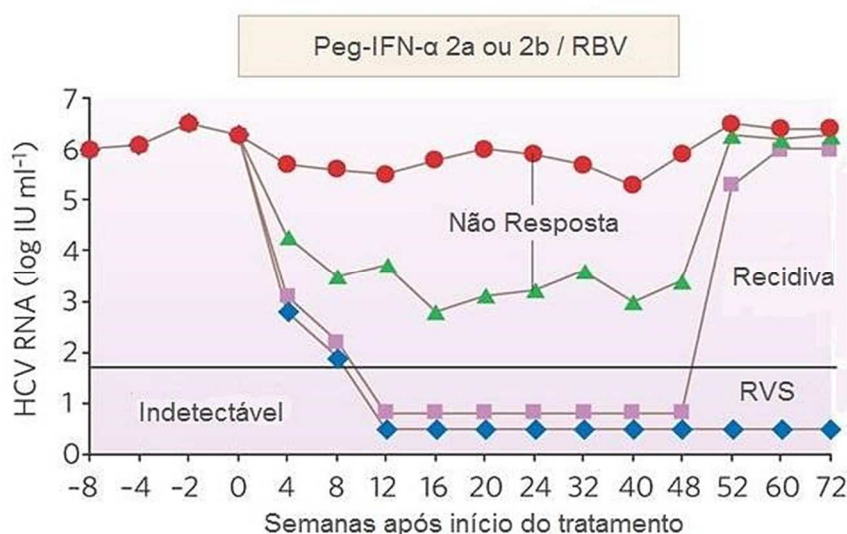


Figura 10. Respostas virológicas na terapia da hepatite C crônica. Adaptado de Feld JJ. & Hoofnagle J.H, 2005.

Em 1989 antes da identificação do vírus da hepatite C, o biofármaco IFN- α humano recombinante foi utilizado como terapia para tratar as infecções da hepatite não-A não-B, pacientes tratados alcançaram níveis normais de ALT e não foi detectado RNA viral (63), sendo que o tratamento apresentava muitos efeitos colaterais, porém não em todos. Após a identificação do VHC em 1991, a ribavirina, um análogo sintético de nucleosídeos (guanósina), foi utilizada como monoterapia. A

ribavirina possui amplo espectro de ação antiviral, inibindo seletivamente a síntese de DNA e RNA e proteínas virais em células hospedeiras infectadas e melhora a resposta imune mediada por citocinas contra o vírus. Contudo, não resultou na eliminação do RNA viral em nenhum dos pacientes (64). Posteriormente, em 1995 estudos analisaram a terapia combinada do IFN- α recombinante e RBV, o IFN- α administrado 3 vezes por semana, via subcutânea e a RBV por via oral diariamente, foi observado a obtenção da RVS em 50% dos pacientes tratados. Uma das razões da baixa resposta ao tratamento é a meia-vida curta do interferon (aproximadamente oito horas), o que leva a grandes flutuações nas concentrações plasmáticas do fármaco durante o período de tratamento. Em contrapartida, a replicação do VHC tem uma alta taxa de renovação e uma meia-vida (*in vivo*) de apenas algumas horas. Foi observado um aumento intermitente da carga viral nos pacientes nos dias sem tratamento (65). Contudo, a ligação covalente de uma porção de polietilenoglicol (PEG) de cadeia ramificada de 40 kD ao IFN α -2a produziu um composto Peg-IFN α -2a, que sustenta a absorção, levando a uma taxa de depuração do fármaco mais lenta com meia vida mais longa do que o IFN α convencional, mantendo o efeito antiviral e diminuindo sua imunogenicidade (66), as altas concentrações sustentadas de Peg-IFN α permitiu mudar a administração para 1 vez por semana (67).

O IFN- α , é uma citocina essencial para vastos processos imunológicos. Não age diretamente no vírus, mas sim através da indução de genes estimulados por IFN (ISGs), os quais, estabelecem um estado antiviral dentro da célula, inibindo a replicação viral e estimulando a atividade de células NK. Além deste papel, os IFNs tipo I modulam a resposta imune adaptativa aumentando a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I para promover apresentação de antígeno, a proliferação de células T de memória, inibição ao apoptose das células T, estimulando a maturação de CDs.

Simultaneamente, estudos sobre as análises estruturais do genoma do VHC identificaram proteínas NS importantes da fase de replicação viral, identificando alvos atraentes para o desenvolvimento de drogas antivirais. Uma serina protease localizada dentro da proteína NS3 do VHC que processa a poliproteína viral em quatro sítios específicos que é essencial para a replicação, a apoezima NS5B uma RNA-polimerase dependente de RNA, e o domínio I da NS5A, em 1996, 1999 e 2005, respectivamente. A partir de 2000, diversos estudos ocorreram avaliando a eficácia da terapia à base de Peg-IFN α , atualmente, há duas formulações aprovadas a alfa-2a

(Pegasys, Roche) e alfa-2b (Peg-Intron, Schering-Plough). Em um dos estudos foi observado um aumento do alcance de RVS de 30% entre pacientes tratados com Peg-IFN α -2a em comparação ao IFN α -2a convencional. Entretanto, a comparação entre os esquemas de tratamento entre Peg-IFN α -2a sem RBV, Peg-IFN α /RBV e IFN α -2b convencional/RBV apresentaram 29%, 56% e 44% de RVS, respectivamente, demonstrando importante papel da RBV (68).

Em dois grandes ensaios com esses agentes, as taxas de RVS 48 semanas de Peg-IFN α /RBV foram 54 e 56%, em comparação com 44 e 47% com IFN- α convencional/RBV e apenas 29% com Peg-IFN α sozinho. As taxas de resposta foram maiores entre os pacientes com GT2 e GT3 do que entre aqueles com GT1. Um estudo subsequente de diferentes regimes de Peg-IFN α -2a/RBV mostrou que pacientes com GT2 ou GT3 poderiam ser tratados com uma dose menor de RBV e que as taxas de RVS após 24 semanas de tratamento (81 e 84%) foram semelhantes às taxas após 48 semanas de tratamento (79 e 80%) (69), reduzindo o tempo de tratamento dos GT2 e GT3 para 24 semanas e GT1 permanecendo duração de 48 semanas de tratamento.

Devido a diversidade de características essenciais para obter um ótimo prognóstico do tratamento, em 2007, foi publicado uma portaria da Secretaria de Vigilância em Saúde o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para o tratamento da Hepatite Viral Crônica C (VHC) visando garantir uma prescrição segura e eficaz e dando diretrizes para o tratamento da população brasileira, critérios de diagnóstico, de inclusão/exclusão de pacientes no tratamento, esquema terapêutico, mecanismos de acompanhamento e avaliação deste tratamento (70).

Em 2008, foi constituído o Comitê Técnico Assessor em Hepatites Virais (CTAHV), pela Portaria Nº 94/SVS, de 10 de outubro de 2008, com caráter consultivo em relação aos aspectos técnico científicos referentes às hepatites virais, composto por membros da comunidade científica envolvidos em atividades de assistência aos portadores de hepatites, além de representantes de especialidades médicas e membros da sociedade civil. Posteriormente, conforme os novos dados científicos eram publicados sobre novas drogas, o tratamento e sobre as infecções das hepatites virais, os PDCT da Hepatite Viral Crônica B ou C e coinfeções, foram atualizados incluindo novos fármacos e esquemas de tratamento ou de diagnóstico, e publicados em 2010, 2011, 2015, 2017, (70). O CTAHV fornece aos profissionais de saúde recomendações atualizadas baseadas nas melhores evidências científicas disponíveis inseridas no contexto de Saúde Pública e na racionalização e dispensação

dos medicamentos preconizados para o tratamento da doença, disponibilizados pelo Ministério da Saúde, buscando promover melhora na qualidade de vida dos portadores da hepatite C e potencializar os resultados do tratamento.

Com o melhor entendimento das proteínas não-estruturais do VHC, os agentes inibidores dessas proteínas mostraram-se promissores ao desabilitar diretamente o ciclo de vida do VHC.

Em 2011, o telaprevir e boceprevir tornaram-se disponíveis como os primeiros antivirais de ação direta para o tratamento da HCC com RVS variáveis para os diferentes genótipos. Comparando esquemas de tratamento de pacientes GT1, associando estes inibidores com a terapia padrão com IFN- α e RBV foi observado um aumento de quase o dobro na obtenção da RVS tanto para telaprevir quanto para boceprevir (71,72). Posteriormente, mais dois inibidores de proteases o daclatasvir e asunaprevir, foram incluídos em estudos clínicos de fase II no tratamento de pacientes infectados com GT1 para avaliação, foram utilizados sozinhos ou combinados com IFN- α mais RBV, foi concluído que o tratamento dos HCC poderia ser feito sem a utilização da terapia a base de IFN- α . A partir de 2014, vários medicamentos AADs, os quais inibem especificamente a função de proteínas virais essenciais à replicação viral, foram liberados no mercado para tratar diferentes genótipos do vírus hepatite C. Esses medicamentos apresentaram RVS em torno de 85% a 95% dependendo de outros fatores preditivos e com melhor tolerabilidade. Apesar de terem vantagens consideráveis sobre a terapia baseada em IFN- α , os vírus sofrem mutações associadas à resistência, que ocorrem naturalmente durante a replicação do vírus e são selecionadas sob a pressão dos AADs. O surgimento de variantes associadas à resistência ao VHC (RAVs - *resistance associated variants*) diminui a susceptibilidade aos AADs resultando em falha no tratamento (68).

No Brasil, até 2015, era utilizado o esquema padrão de terapia combinada Peg-IFN α -2a ou 2b e RBV, com taxa de RVS para os GT1 e 4 em torno de 50% e para GT2 e 3 entre 75 e 90% com alguns efeitos adversos (48). Em 2016, houve a introdução de inibidores de proteases para compor diferentes tipos de tratamento para HCC. Foi publicado neste ano novos esquemas de tratamento de acordo com as características clínicas do hospedeiro, como também o agente etiológico e dependendo dos AADs disponíveis no SUS, ainda se utiliza a terapia dupla Peg-IFN α e RBV nos seguintes casos: a) tratamento de adultos com infecção por GT1a, na presença de polimorfismos específicos da NS5A (M28T/A, Q30E/H/R/G/K/D,

L31M/V/F, H58D e Y93C/H/N), tratamento prévio com Peg-IFN α + RBV associado ou não a IP (telaprevir, boceprevir, simeprevir); b) para GT3 utilizar a combinação tripla sofosbuvir + alfapeguinterferona + ribavirina; por GT4 tratamento prévio com a terapia dupla Peg-IFN α + RBV; c) crianças de 3 a 11 anos utilizar a terapia dupla com Peg-IFN α e RBV, conforme descrito pelo PCDT, 2018 (70). Apesar da disponibilidade de AADs e seu baixo perfil de toxicidade, o Peg-IFN α mantém um papel no tratamento de infecções agudas e crônicas do VHC em locais com recursos limitados, para pacientes com doença renal terminal e outros que não são elegíveis para AADs. O objetivo primário do tratamento na infecção aguda ou crônica pelo VHC é controlar a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral, reduzindo desta forma a atividade inflamatória hepática, e por consequência a evolução para cirrose e CHC, promovendo a RVS. Atualmente, o tratamento ideal da infecção pelo VHC é bem complexo e deve ser personalizado para cada caso levando em consideração as características demográficas e clínicas dos pacientes.

Foi lançada pela OMS uma meta mundial: a erradicação desta doença até 2030, então, a intensificação no diagnóstico simplificado, o fortalecimento no atendimento das hepatites virais, a disponibilidade do tratamento adequado e personalizado para população serão fundamentais nos próximos anos.

1.8 O papel dos IFNs na resposta antiviral contra hepatite C

Os IFNs têm papel fundamental na eliminação viral. Os IFNs tipo I e III fazem parte da resposta inata e são expressos após a detecção direta de fragmentos virais, induzindo vários ISGs que irão eliminá-los por mecanismos diversos. Por outro lado, o IFN- γ (tipo II) é expresso de forma tardia pelas células T específicas e células NK ativadas, que induzem também vários ISGs.

A superfamília dos IFNs tipo I incluem os IFN- α (com 13 subtipos e os IFNs - β , - ϵ , - κ , e - ω), os quais desempenham papel crucial na resposta imune antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, mas se diferem nas suas potências. São produzidos por diversas células, pelos leucócitos e pelos fibroblastos (73). Todos os tipos de IFN- α se ligam a um receptor comum composto de duas cadeias IFNAR1 e IFNAR2 (73).

A família do IFN- λ foi descrita pela primeira vez em 2003 por dois grupos independentes (74,75), utilizando análise computacional de genes, identificaram três

novas citocinas IL-28A, IL-28B e IL-29 e seus receptores de classe II que são distantemente relacionadas aos IFNs tipo I e à família IL-10.

A maioria das células podem expressar os IFNs tipo III, sendo que as principais produtoras são CDs mielóides e plasmocitóides (73). Entretanto, as células epiteliais da mucosa intestinal, das vias aéreas, e dos hepatócitos têm maior capacidade de expressão do IFN- λ . Visto que, para efetiva sinalização do IFN- λ é necessária sua ligação a um complexo heterodímero composto pelos receptores IFNLR1 e IL-10R2, e o IFNLR1 é restrito a células epiteliais, subconjunto de células mielóides e neurais.

Embora os IFNs tipo I (IFN- α/β) e IFN tipo III (IFN- λ) sinalizem através de complexos receptores distintos, eles ativam a mesma via de sinalização intracelular e exercem muitas das mesmas atividades biológicas, incluindo atividade antiviral, em uma ampla variedade de células alvo, demonstrando um efeito antagonista entre eles (76,77)

Os IFNs tipo I e III são expressos a partir da detecção de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen - associated molecular pattern*), pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern recognition receptors*). Os receptores principais são o RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) que detectam RNAs virais e interagem com as MAVs (do inglês, *Mitochondrial antiviral-signaling protein*) levando ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e os IRF ou fatores regulados pelo interferon (do inglês *interferon regulatory factor*), que induzem a expressão dos IFNs. Por outro lado, observado a via de detecção de DNA o sensor citosólico Ku70 induz a produção de IFN- λ 1 e IFN- λ 2/3, mas não o IFN α/β , (78) figura 11.

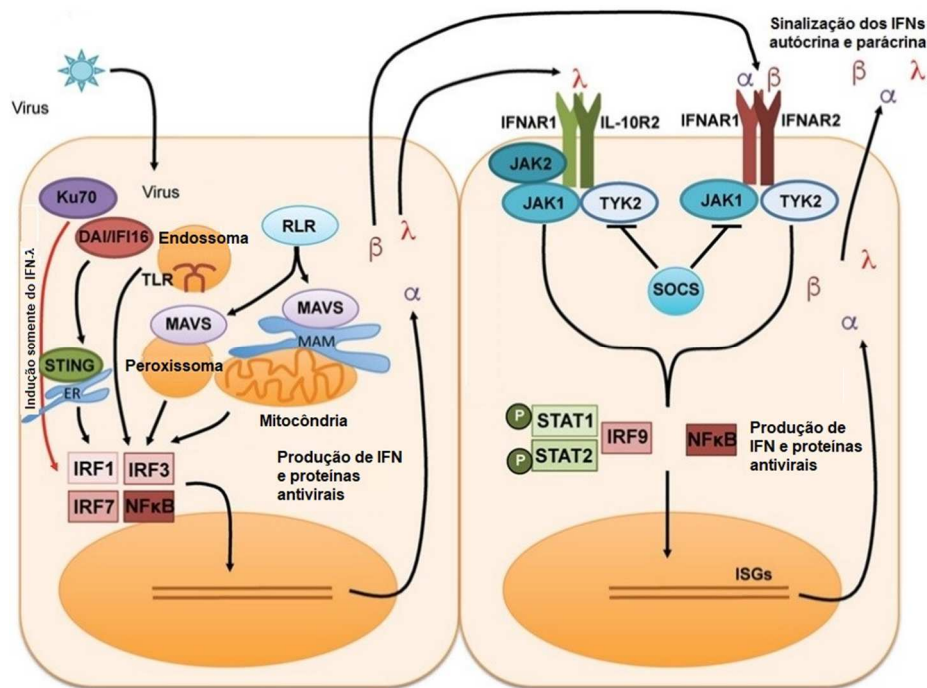


Figura 11. Vias de sinalização de receptores dos IFN tipo I e tipo III. O reconhecimento do vírus pelas vias PPRs induz à ativação dos fatores de regulação do IFNs IRF1, IRF3, IRF7 e NF-κB para induzir a transcrição, tradução e secreção de IFN tipo I (IFN-α e IFN-β) e IFN tipo III (IFN-λ). IFNs tipo I e tipo III sinalizam para as células vizinhas através de receptores distintos induzindo a ativação da via JAK-STAT levando à ISGs que podem amplificar o sinal de IFN e induzir um estado antiviral em células e tecidos infectados.

Os IFNs tipo I e III são ativados após uma infecção viral e vários relatos sugerem funções redundantes. Contudo, a transcrição destes genes é regulada temporalmente, visto que os IFNs tipo I são expressos e resolvidos rapidamente, enquanto que os IFNs tipo III têm a indução tardia, sustentada e tecido específica. Os mecanismos responsáveis pelas diferenças na expressão e respostas dos IFN-λ, ainda são desconhecidos. Pode ser devido às diferenças nas cadeias laterais dos genes para *IFNL1*, 2 e 3, e diferenças de aminoácidos no local de ligação ao receptor (79). Por exemplo, o *IFNL2* e *IFNL3* tem atividades antivirais diferentes. Um estudo com proteínas recombinantes do IFN-λ1, λ2 e λ3 em células HepG2 infectada com vírus da encefalomiocardite mostrou que o IFN-λ3 é o mais ativo entre os três. Estudos sugerem que a transcrição do IFN-λ é dependente do NF-κB (80). Os IFN-λ após se ligarem aos seus receptores iniciam ativação da Janus quinase 1 (JAK1) e tirosina quinase 2 (TYK2) a fosforilação recruta o tradutor de sinal e ativador de transcrição (STAT1 e 2) formando um heterodímero fator regulador do interferon (IRF9). Este complexo forma o fator gênico estimulado pelo interferon (ISGF3) que transloca para o núcleo se ligando ao elemento de resposta por IFN (ISR3), induzindo a produção de centenas de ISGs (74,76,81,82). A cinética de expressão dos IFNs tipo I e III podem

ser diferentes para cada tipo de célula, como mostra a figura 12. Em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e fibroblastos, o IFN- λ 3 apresentou um pico após 4h e se manteve por 24h, já o IFN- λ 1 teve um pico em 6h. O mRNA do *IFNL4* pode ser detectado em hepatócitos 2 a 4 horas após estimulação com poli (I:C).

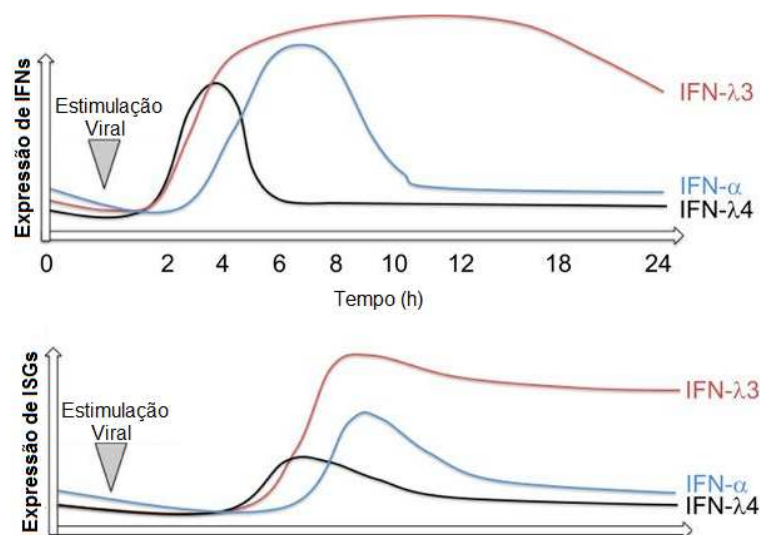


Figura 12. Níveis de expressão dos IFNs tipo I e III e dos ISGs durante infecção viral. Extraído Egli A. et al. 2014.

Assim é gerado a principal função destes IFNs tipo III, principalmente contra vírus que infectam as células do fígado, mucosas respiratórias ou gastrointestinal e vírus que atravessam a barreira hematoencefálica. Em modelo murino foi observado que ambos interferons tipo I e III são produzidos após infecção pelo rotavírus, mas as células epiteliais intestinais respondem preferencialmente ao IFN tipo III, sugerindo o predomínio do IFN- λ no papel antiviral do intestino. O IFN- λ é importante em uma ampla variedade de infecções virais que incluem vírus sincicial respiratório, rotavírus, norovírus. Estudos utilizando camundongos nocaute para os receptores do IFN tipo I (*IFNAR1*^{0/0}) ou IFN tipo III (*IL28R α* ^{0/0}) ou para ambos IFNs, confirmando a importância do IFN- λ para a resistência inata contra patógenos virais que infectam pulmões mesmo em camundongos nocaute para *IFNAR1*^{0/0}. Demonstrando que a inoculação intranasal do IFN- λ induziu a produção o fator antiviral Mx1 pelos tecidos dos pulmões, protegendo-os da infecção por vírus da influenza. Em contraste, a aplicação intraperitoneal de IFN- λ não induziu Mx1 no fígado, não protegendo-os contra os vírus hepatotrópicos (83). Em outro estudo o IFN- λ inibiu a replicação do coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) nos pulmões e tecido gastrointestinal (84). Os IFNs tipo III também contribuem para a resistência às

infecções fúngicas, infecções bacterianas, principalmente as respiratórias, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus Aureus*, e tem papel descrito em alguns tipos de câncer (78).

O IFN- α recombinante fornecido exogenamente liga-se e ativa os receptores celulares, induzindo às mesmas cascatas de resposta que ocorrem com a produção endógena, (62) figura 13. Ativam a via de sinalização JAK-STAT-1 e 2 e ao IRF9 gerando um complexo de gene estimulado pelo IFN fator 3 (*interferon-stimulating gene factor 3, ISGF3*) que é translocado para o núcleo que se ligam ao DNA originando os elementos de resposta estimulado pelo IFN (*ISREs - interferon-stimulated response elements*) provocando a transcrição de centenas de mRNA de genes estimulados pelo IFN (*ISG - interferon-stimulated gene*) (69), que saem do núcleo e codificam proteínas que alteram o metabolismo celular e interfere na replicação viral. Os principais ISGs considerados importantes na inibição da replicação do VHC inclui a OAS (2', 5' oligoadenilato sintetase), que ativa as RNases antivirais, como adenosina desaminase que é específica na edição do RNA viral; e proteína quinase R, que inativa a tradução da proteína do mRNA viral, como a ativação da RNaseL (ribonuclease-L), ou outras vias. O complexo replicativo do VHC está associado com as membranas citoplasmáticas dos hepatócitos e compreende intermediários replicativos de RNA, mRNA viral, proteínas estruturais e NS e montagem de novos vírus.

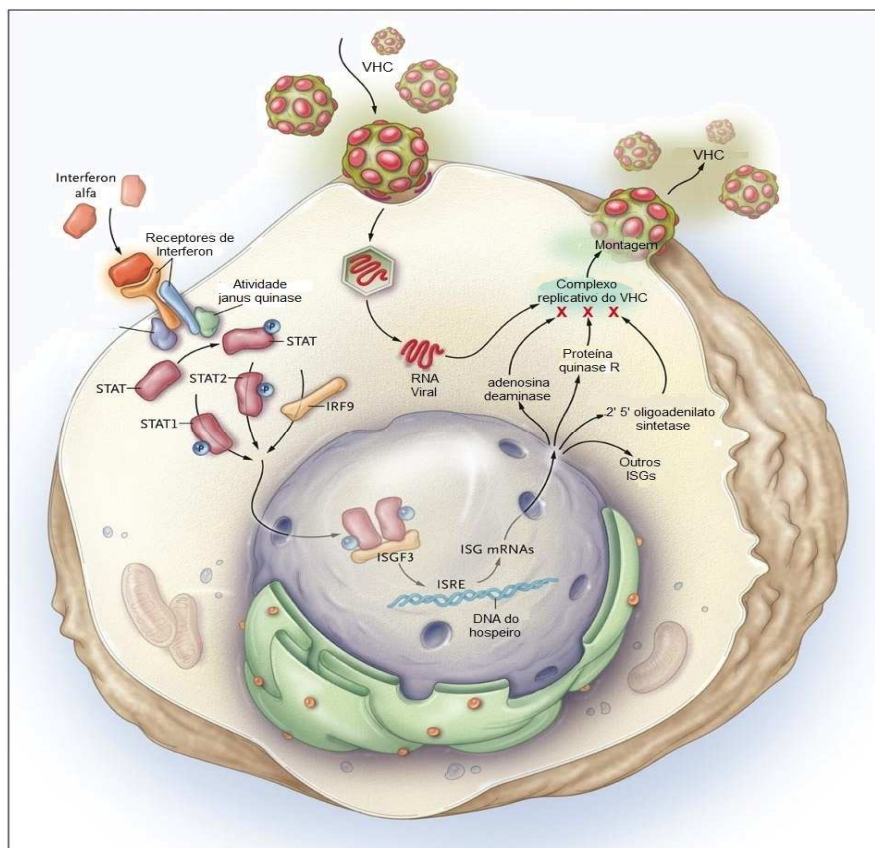


Figura 13. Mecanismo de ação do interferon contra o VHC. Adaptado de Hoofnagle e Seeff, 2007.

1.9 Polimorfismos no gene de *IFNL3* (IL28B)

A variação genética humana tem uma grande influência na susceptibilidade de um indivíduo a doenças infecciosas. Estudos pan-genômicos (do inglês *Genome-wide association study - GWAS*) demonstrou que variantes do SNP localizados próximos aos genes que codificam as interleucinas da família do IFN tipo III, tinham uma relação direta na limitação da infecção pelo VHC. Estudos GWAS associam SNPs comuns de todo genoma humano, inseridos no banco de dados HapMap (<http://www.hapmap.org>), com um coorte de pacientes, podendo identificar marcadores importantes da doença sem prévio conhecimento.

Em 2009 ocorreram os primeiros relatos da associação dos genes do *IFNL3* à resposta ao tratamento de pacientes com HCC com Peg-IFN α /RBV. Esta região genômica localizada no cromossomo 19q13.13 consiste de genes que codificam proteínas da família do IFN- λ , composta pelos IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, (denominados anteriormente como IL-29, IL-28A, IL-28B, respectivamente) e recentemente descrita o IFN- λ 4 (85). A organização genômica é composta por 5 exons e 4 introns.

Tanaka e colaboradores, utilizando estudo de associação de genoma inteiro (GWAS) identificaram os SNPs rs8105790, rs11881222, rs8103142, rs28416813, rs4803219, rs8099917 e rs7248668 que apresentaram forte associação a RVS em pacientes infectados com GT1 tratados da população de japoneses. Neste mesmo período, Suppiah et al. 2009 identificaram o homozigoto do alelo G para rs8099917 associado a pacientes que não responderam ao tratamento, e o rs12980275 também apresentou um forte sinal associado ao desfecho a resposta ao tratamento com alfa peginterferona, em populações Europeias. Após estes dois estudos, diversos relatos surgiram confirmando a enorme importância de SNPs na região de *IFNL3*, que pode aumentar a predição quanto à eficácia da terapia baseada em IFN- α para infecção crônica, bem como, são fortemente preditivos no clareamento espontâneo de VHC durante a fase aguda das infecções (86,87).

O IFN- $\lambda 3$ possui alta homologia de sequências de aminoácidos com IFN- $\lambda 2$ (96%), e em menor grau com IFN- $\lambda 1$ (81%), e parecem ser originados de um gene ancestral comum (88). O IFN- $\lambda 4$ é originado de uma mutação do tipo *frameshift* que possui 27% a 29% de similaridade de sequência com os outros três IFN- λ (85).

O papel dos IFN- λ s na resposta do hospedeiro ao vírus tem sido bastante estudado na infecção pelo VHC. Uma vez que, cerca de 40% dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α não ficam curados devido ao polimorfismo na região gênica do *IFNL*. Uma gama de SNPs tem sido associado ao desfecho, sendo que nas populações europeias, ameríndias, apresentam forte desequilíbrio de ligação (LD - do inglês *Linkage Disequilibrium*) entre a maioria dos SNPs da região do *IFNL3* E *IFNL4*, formando um grande bloco com haplótipos específicos. Em contrapartida, a população de Africanos não apresenta LD forte entre os mesmos SNPs (89). O LD mede associações não-aleatórias entre polimorfismos de alelos em dois ou mais loci, não necessariamente no mesmo cromossoma. Notavelmente, as taxas de frequências do genótipo preditor do SNP rs12979860-CC são distintas nas diversas populações, apresentando aproximadamente 85% em asiáticos do Leste Ásia, 58% do Sul da Ásia, 48% entre os europeus, 38% ameríndio e 11% dos africanos (90). Consequentemente a taxa de RVS alcançada pelos pacientes diferem de acordo com os grupos populacionais (76,91). Visto que, asiáticos do Leste têm taxas mais altas de RVS do que os pacientes com ascendência Europeia. Dentre as populações, os asiáticos são os que possuem a maior frequência dos genótipos preditores rs12979860-CC e rs8099917-TT em torno de 89%. Um estudo mostrou que Asiáticos portadores VHC

GT1 tratados obteve maior RVS de que os caucasianos (92). Em pacientes com ascendência Europeia, o genótipo CC está associado ao dobro de taxa de RVS em relação ao genótipo TT, com similar proporção para Afro-americanos e Hispânicos (91). Outro estudo avaliando fatores relacionados ao desfecho do tratamento, a ancestralidade africana foi o único preditor de resposta, pode se explicar pela menor frequência do alelo C entre os afrodescendentes em relação aos descendentes de europeus (76). Estudos avaliaram a interferência da seleção natural sobre os IFNs humanos e seus receptores e, foi visto que alguns IFNs tipo I e IFN- γ evoluíram sob forte pressão seletiva exercida por patógenos. Os IFNs tipo III exibem restrita seleção positiva em populações europeias e asiáticas, indicando que a variação genética nesses genes confere uma vantagem seletiva ao hospedeiro, pelo aumento da resistência à infecção viral (81). Na figura 14, ilustra as distintas frequências dos alelos na população mundial.



Figura 14. Frequência dos alelos C e T do rs12979860. Extraído de Thomas D.L. et. al. ,2009.

Ainda há muito a compreender sobre o papel funcional do IFN tipo III na infecção pelo VHC e a relação com o desfecho dos tratamentos, bem como sua importância entre outras infecções virais. Níveis séricos e mRNA de *IFNL* tanto no sangue como no fígado são mais altos em pacientes com HCC do que com RVS ou com inflamação hepática não viral. *In vitro*, IFN- λ recombinante em cultivo de CDs derivadas de monócitos, promoveu a diferenciação das CDs para um fenótipo com

baixa capacidade de estimulação de células T e alta expressão de PD-L1, que promoveu a expansão das células T reguladoras (69). A resposta a terapia é dependente dos níveis de expressão dos ISGs produzidos antes do tratamento, pacientes que produzem altos níveis de ISGs no fígado apresentam mal prognóstico. Foi observado também que altos níveis de IFN- λ 4 hepáticos apresentam maiores níveis de expressão de ISGs, piores taxas de resposta ao tratamento e menores taxas de depuração espontânea (93), contudo há relatos contraditórios. Estudos em modelo animal, chimpanzés infectados com VHC apresentaram rápida indução hepática da transcrição do IFN tipo III, associada com uma regulação positiva dos ISGs e baixos níveis de IFN tipo I (77,94). Sugerindo que o sistema IFN tipo III é funcionalmente predominante via antiviral induzida nos hepatócitos, como visto, a indução de IFN- λ em cultura primária de hepatócitos humano. Estudo avaliando a proteína do IFN- λ 4 observou a substituição de um aminoácido, alterando uma prolina na posição 70 (P70) para uma serina (P70S), altera a atividade antiviral do IFN- λ 4. Análises demonstraram que pacientes com variante IFN- λ 4-S70 apresentam menores níveis de expressão gênica de ISGs. Estas características foram observadas também na avaliação da expressão gênica de alguns ISGs a partir do tecido do fígado de doadores não infectados pelo VHC e de pacientes com HCC entre respondedores e não respondedores. Identificaram o importante papel dos genes *ISG15* e *USP18* com o desfecho do tratamento (95)

Posteriormente, após o conhecimento das propriedades antivirais dos IFNs tipo III, foi desenvolvido IFN- λ recombinante para o uso clínico como tratamento alternativo ao IFN- α . Uma das vantagens dos IFNs tipo III é sua especificidade tecidual, apresentando menor eventos adversos, comparado com o IFN- α , que atua de forma sistêmica (96). Contudo, com advento das AADs, houve um declínio nas avaliações do IFN- λ para terapia da infecção do HCC. Entretanto, hipóteses mais recentes sugerem que este IFN- λ poderiam ser utilizados para controlar infecções virais respiratórias, bem como, vírus que infectam tecidos que expressam o IFNLR, em particular o fígado e o pulmão.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar variantes polimórficas da região dos genes *IFNL3* e *IFNL4* e seu papel funcional em amostras de pacientes com HCC infectados pelos VHC GT1, GT2 e GT3 tratados com terapia combinada alfapeginterferona e RBV e em amostras de voluntários sadios submetidos a uma dose de PEG-IFN α -2a ou 2b.

2.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a associação dos SNPs do gene *IFNL3* E *IFNL4* com a resposta virológica sustentada de pacientes com HCC tratados com alfapeginterferona e RBV;
- Avaliar o grau de desequilíbrio de ligação entre os SNPs do gene *IFNL3* E *IFNL4* da população brasileira, comparando com o valor de LD nas populações europeias, ameríndias e africanas;
- Avaliar a importância da combinação genotípica destes SNPs para melhor prever a RVS;
- Avaliar o papel funcional do SNP rs12979860 nos níveis séricos de citocinas e quimiocinas nas amostras dos voluntários sadios e pacientes com HCC;
- Análisar os níveis séricos de citocinas com pacientes respondedores e não respondedores;
- Comparar os níveis séricos e de mRNA das citocinas entre os dois tratamentos Peg-IFN α 2a e Peg-IFN α -2b;
- Comparar a expressão gênica de citocinas da via de sinalização do IFN tipo I, em relação a RVS;
- Avaliar a relação entre a presença das variantes do SNP rs12979860 nos níveis de expressão de genes da via de sinalização do IFN tipo I.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem do Estudo

A origem desta pesquisa ocorreu a partir de amostras de participantes de dois estudos clínicos de fase I e II/III, que teve como objetivo avaliar a eficácia e segurança da alfapeginterferona-2b 48 KDa humano (Peg-IFN α -2b) denominado BIP48, desenvolvidos em conjunto por Bio-Manguinhos/Fiocruz/Brasil e Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología/Cuba. Foi utilizado como referência o produto comercial alfapeginterferona-2a (Peg-IFN α -2a) de 40KDa Pegasys®. Estes estudos foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa - CEP de cada local dos participantes e foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinque, Boas Práticas Clínicas e requisitos regulatórios locais. O estudo foi concebido e conduzido pelo patrocinador principal do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos/Fiocruz em colaboração com os investigadores principais. O patrocinador coletou os dados, monitorou a conduta do estudo e realizou as análises estatísticas. Maiores detalhes sobre critérios de inclusão e não inclusão, descontinuação de pacientes no estudo, exames laboratoriais e acompanhamento dos pacientes estão descritos minuciosamente nos protocolos intitulados, “Comparação Farmacocinética e Farmacodinâmica do BIP48 e Alfapeginterferona 40kDa em Voluntários Sadios - Ensaio clínico de fase I.” Pareceres CEP HCPA nº: 09-581 e CONEP nº 321/2010 e “Avaliação da Eficácia e da Segurança do BIP48 (Alfapeginterferona 2b 48 kDa) Comparado ao Pegasys® (Alfapeginterferona 2a 40 kDa), associados a Ribavirina, no Tratamento de Pacientes com Hepatite Crônica pelo Vírus C: Estudo Randomizado, Aberto, com Análise Cega, Multicêntrico - Ensaio clínico de Fase II/III”, pareceres CEP HCPA nº: 134.833 e CONEP nº 772/2011. E foram registrados no banco de dados de estudos clínicos realizados em todo o mundo, *ClinicalTrials.gov*, identificado por NCT01889849 e NCT01623336, respectivamente.

No estudo clínico de fase I foram avaliados 32 voluntários sadios (VS) divididos em 2 grupos: um grupo foi administrado 180 μ g do produto investigacional BIP48, e outro grupo com 180 μ g do produto Pegasys. As amostras de sangue foram coletadas antes da administração do tratamento (0), e nos tempos de 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120, 168, 216, 264 e 336 horas após administração. Após 15 dias de período de lavagem, para garantir o total clareamento plasmático da molécula do organismo,

foi administrado mais uma dose de cada biofármaco invertendo o produto administrado: voluntários sadios que haviam recebido o BIP48 na 1ª administração receberam o Pegasys na 2ª, e vice e versa.

No estudo clínico de fase II/III participaram 740 pacientes portadores de HCC que foram randomizados, sendo 370 infectados com GT1 e 370 com GT2 ou 3 (GT2/3). Todos os participantes foram submetidos aos tratamentos com Peg-IFN α -2a ou Peg-IFN α -2b com o esquema de uma dose/semana combinado com ribavirina, sendo que os infectados com GT1 no período de 48 semanas e em casos especiais até 72 semanas e pelos GT2/3 no período de 24 ou até 48 semanas, de acordo com os critérios clínicos preconizados pelo Ministério da Saúde, 2011, no protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções (97).

Do total, 24 pacientes formaram uma coorte exploratória para avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica pertinentes ao estudo fase II, e as amostras de sangue total foram coletadas em 16 intervalos de tempos. Os participantes foram submetidos a exames clínicos e laboratoriais pré-tratamento, durante e após o término do tratamento, nenhum dos participantes possuíam coinfeção para Hepatite B e HIV e nem haviam sido previamente tratados. Foram feitas biopsias hepáticas e classificadas de acordo com o sistema de pontuação METAVIR da seguinte forma: F0, sem fibrose; F1, fibrose leve; F2, fibrose moderada; F3, fibrose grave; e F4 com cirrose (98).

O fluxograma indica toda a metodologia utilizada neste estudo e as amostras utilizadas em cada fase, figura 15.

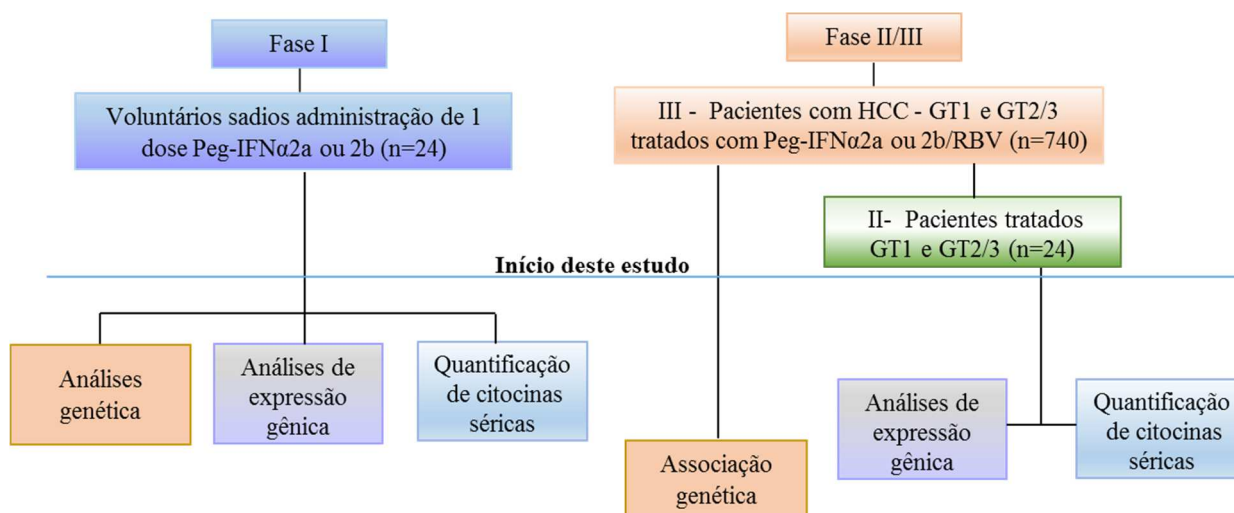


Figura 15. Fluxograma da metodologia. As amostras foram provenientes de dois estudos clínicos para avaliar farmacocinética, farmacodinâmica e eficácia um novo Peg-IFNα2b. GT = genótipo viral.

3.2 Amostras

Para esta pesquisa foram avaliadas amostras de 24 participantes (voluntários sadios) do estudo de fase I e amostras de 740 participantes portadores de HCC GT1, GT2/3 oriundos do estudo fase II/III.

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue total dos indivíduos sadios (n=24) coletadas em tubos tubo PAXgene® (BD Biosciences) nos tempos 0, 24, 72, horas. As amostras de sangue total dos pacientes com HCC e tratados com Peg-IFNα/RBV (740) foram coletadas em tubos contendo EDTA, e para o subgrupo dos pacientes (24) incluídos nas avaliações de farmacocinética e farmacodinâmica as amostras foram coletadas em tubos PAXgene®, nos tempos 0, 1^a, 2^a, 3^a, 12^a semanas durante o tratamento e 3^a semana pós-tratamento. Este trabalho foi submetido ao CONEP (CAAE: 46065015.6.0000.5248).

3.3 Seleção de SNPs

Foram realizadas genotipagem de 12 SNPs localizados próximos ao gene *IFNL3* abrangendo a região do *IFNL2* (IL-28A), *IFNL3* (IL-28B) e *IFNL4* pelo método de “TaqMan™ SNP genotyping Assays” (Life Technologies, CA, EUA). Na tabela 1 estão descritas as variantes, as localizações e o catálogo do fabricante. Os polimorfismos foram selecionados utilizando três estratégias: i) dois SNPs etiquetas (*tag* SNPs) para representar a região IFNL3-IFNL4 foram determinados de acordo com o Projeto Internacional HapMap: rs11879005 e rs2099331 (*tag* SNPs liberação 27, abrangendo 200Kbp da região genômica IFNL3). ii) os polimorfismos: rs12979860, rs8099917, rs8105790, rs8109886, rs8113007, rs11881222 e rs12980275 foram priorizados como candidatos por terem sido previamente associados ao resultado do tratamento com alfa interferona e ribavirina. Finalmente, iii) três SNPs funcionais rs8103142, rs4803221 e rs4803222 foram selecionados por serem variantes de mutação pontual “*Missense*” substituição não sinônima e substituição sinônima e variante 5' UTR, respectivamente.

Tabela 1. Detalhes das sondas TaqMan™ (ThermoFisher Scientific) utilizadas para genotipagem dos SNPs. Localização baseado no banco de dados do 1000genomas conjunto GRCh38 (GRCh38- Assembly build).

Variantes	Localização (chr19.3)	A>a	Número SNP (rs)	Ensaio TaqMan (catálogo)
Upstream	39220263	C>T	rs11879005	C__7820581_10
Upstream	39241143	T>C	rs12980275	AHABEQ1*
Upstream	39241861	T>C	rs8105790	C__43813808_10
Intron	39244283	T>C	rs11881222	AHGJ5L5*
Missense	39244466	T>C	rs8103142	AHCTA3H*
Intron	39248147	G>A	rs12979860	AHBKCW9*
Missense	39248489	C>G	rs4803221	C__31138520_10
5'UTR	39248713	G>C	rs4803222	C__7820457_10
Upstream	39252122	A>C	rs8109886	C__11710100_10
Upstream	39252463	A>T	rs8113007	C__11710097_10
Upstream	39252525	T>G	rs8099917	C__11710096_10
Dowstream	39273910	T>G	rs2099331	C__16118028_20

Abreviações: A= alelo de maior frequência, a= alelo de menor frequência. * Referência para customização de uma sonda para o ensaio, em anexo as sequencias detalhadas.

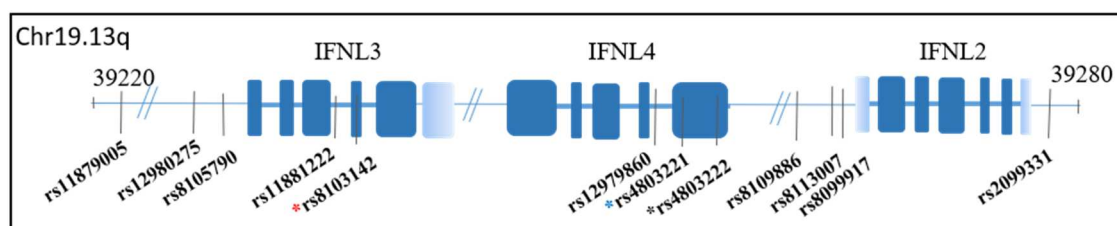


Figura 16. Esquema representativo da região do cromossoma 19.13q, dos genes IFNL2, IFNL3 e IFNL4. Indicando a localização dos 12 SNPs genotipados neste estudo. Baseado nos dados extraídos de NCBI - CCDS (*National Center for Biotechnology Information - The collaborative consensus coding sequence*).

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando kit para extração de DNA (DNeasy Blood & Tissue extration kit), QIAGEN. O RNA genômico foi extraído a partir de amostras de sangue total coletados em tubos PAXgene®, utilizando kit apropriado para esse tipo de tubo (PAXgene blood RNA kit), QIAGEN, de acordo com as

instruções do fabricante. As extrações foram feitas utilizando um equipamento de automação QIAcube da marca Quiagen, foram quantificados utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop ND 1000 Technologies) e o grau de pureza foi calculada pela razão entre as densidades óticas 260 e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) = o resultado deve ser superior a 1,8 para avaliação do DNA e superior 1,75 para RNA (98) e armazenados a -20° C e -70° C até o momento da utilização. Para avaliar a integridade do RNA, foi utilizado a técnica de eletroforese em gel, amostras extraídas foram aplicadas em gel de agarose à 1% em TAE (tampão Tris a 40mM, ácido acético a 20mM e EDTA a 1mM).

3.4 Discriminação alélica

Os polimorfismos foram genotipados pelo ensaio de discriminação alélica, por reação de cadeia de polimerase, em tempo real (qPCR) usando o sistema TaqMan (Life Technologies, EUA), onde cada alelo é discriminado utilizando sondas específicas contendo um marcador fluorescente, cada sonda é marcada com fluoróforos VIC® ou FAM®. Os genótipos são determinados em diferenças de uma única base variante na sequência do DNA por meio da emissão da intensidade de cada de fluorescência, fornecendo o genótipo de cada paciente, indivíduos homocigotos emitem somente fluorescência de um fluoróforo e o heterocigoto emite ambos pigmentos. Estes SNPs estão localizados na região dos éxons, introns do gene *IFNL3* e *IFNL4* e na região intergênica entre 39,22 - 39,27 kb do cromossomo 19.13, figura 16. Análise de cada amostra foi feita para um volume total de 20 µL contendo 10 µL do reagente comercial “TaqMan® Genotyping Master Mix” (Life Technologies, CA, EUA) e 0,5 µL de cada sonda TaqMan, incluindo 2 µL de DNA na concentração entre 20 a 40 ng, posteriormente, aplicadas em uma placa óptica de 96 poços. As informações básicas a respeito de cada SNPs e a referência de cada sonda encontram-se descritos na tabela 1. As reações foram realizadas no termociclador StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies, CA, EUA), foram utilizadas as condições padrões de ciclagem: 30 segundos a 60° C, 10 minutos a 95° C, seguido de 15 segundos a 92° C, 60 segundo a 60° C.

Os genótipos são determinados em função da intensidade de cada fluorescência e os dados são capturados pelo software do StepOne Plus gerando um

gráfico de discriminação alélica, conforme apresentado na figura 17, os dados foram extraídos para uma planilha em Excel para futuras análises.

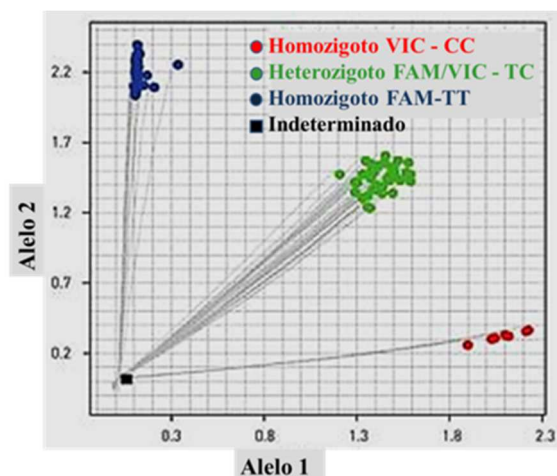


Figura 17. Gráfico representativo de discriminação alélica dos SNPs pelo sistema TaqMan. Cada ponto representa a amostra, onde alelo 1 é marcado com fluoróforo VIC e alelo 2 marcado com FAM. Verde indica indivíduos homozigoto para alelo 1, azuis indivíduos heterozigotos e vermelho indivíduos homozigotos para alelo 2 e em preto controle negativo ou amostras indeterminadas.

3.5 RT-qPCR para avaliar a expressão gênica de citocinas da via do Interferon tipo I e III

3.5.1 Sistema microfluídico de avaliação de expressão gênica simultaneamente

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA utilizando uma mistura de oligonucleotídeos “ramdon primer” e enzima transcriptase reversa kit SuperScript II™ reverse trancrisptase (Thermo Fisher Scientific). Cada amostra foi pré-amplificada com a mistura com 200nM de cada par de primers dos genes de citocinas, quimiocinas e genes constitutivos, como descrito na tabela em anexo, utilizando o reagente, mistura “TaqMan PreAmp Master Mix” e 1,25µL de cada cDNA. As amostras foram amplificadas nas condições, 95° C por 10 minutos, 15 ciclos a 95° C por 15 segundos e 60° C por 4 minutos e manter a 4° C e estocar a -20° C. As amostras foram preparadas em diluente de amostra contendo tampão comercial para expressão gênica “TaqMan gene expression Master mix”, reagente de ligação do DNA e a coloração e EvaGreen (Applid Biosystems Lifetechnologies, USA), adicionar 1,7µL

o cDNA pré amplificado diluído a 1:5 em tampão de suspensão de DNA. Foi preparado a solução pré-primer utilizando reagente de ligação adicionar 5µL em cada orifício e 1,7µL de cada par de primers. Posteriormente, foi aplicado fluído (Control Line Fluid) no chip 96x96 e feito o carregamento no equipamento IFC Controller HX por 20 minutos. Com posterior distribuição das amostras e os primers na placa em seus respectivos orifícios. Assim cada primer foi analisado com cada amostra e amplificados no sistema microfluídico BioMark™, Fluidigm.

3.5.2 Sistema utilizando sondas específicas marcadas com fluoróforos

Devido alta homologia entre os genes do *IFNL2* e *IFNL3*, conduzimos um RT-qPCR utilizando a expressão do gene TaqMan® Master Mix (Applied Biosystems) para medir os transcritos do IFN-λ1, 2, 3 e 4, a partir do cDNA sintetizado como descrito no item 3.4.1. Utilizamos sequencias de primers e sondas marcadas com fluoróforo para detecção específica de acordo com as instruções do fabricante. As sequências de primers/sonda *IFNL3* e *IFNL4* foram projetadas manualmente com base na montagem do genoma humano NCBI (NCBI36 / hg18). Utilizamos a sonda pré-projetada pela IDT (Integrated DNA Technologies) dos *IFNL1* e 2, e os genes constitutivos beta 2 microglobulina (B2M) e 18S.

3.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas no soro pelo ensaio de microarranjo líquido/multiplex

Os soros de 24 voluntários sadios nos tempos 0, 24h 72h após administração dos Peg-IFNα-2a ou Peg-IFNα-2b e soros de pacientes tratados com Peg-IFNα2a ou Peg-IFNα2b e RBV, nos tempos 0, 1^a, 2^a, 3^a, 12^a semana durante o tratamento e 3^a semana após o término do tratamento foram coletados e congelados em freezer -80°C, para posterior dosagem de citocinas. A dosagem foi realizada pelo método MAGPIXLuminex® (kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine - Biorad – EUA), baseada no método de microarranjo líquido/multiplex utilizando plataforma de citometria de fluxo, onde microesferas são conjugadas com anticorpos específicos. O kit utilizado incluiu os sistemas de detecção personalizado para 27 citocinas perfil de Th1 e Th2: IL-1ra e β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17A, fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-b), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófago (GM-CSF), fator estimulador de colônias de granulócitos (G-

CSF), Interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas isoforma BB (PDGF-BB), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), as quimiocinas, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1- β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxina. Os níveis séricos de IFN α foram analisados utilizando o teste imunoenzimático Verikine™ (Human Interferon Alpha Multi-Subtype Serum ELISA Kit – BPL assay science). Os ensaios foram executados conforme as recomendações do fabricante, as amostras e a curva padrão foram diluídas conforme o protocolo e adicionados em uma placa de 96 poços, em duplicata. Amostras com quantidades abaixo do limite de detecção foram registradas como “zero” e amostras acima do limite determinado pela curva padrão foram registrados com o valor mais alto da curva. A quantificação foi feita utilizando o equipamento MAGPIX® System equipado com o software xPONENT versão 3.2 que captura dos dados que são expressos em intensidade fluorescente mediana - MFI (*Median Fluorescent Intensity*). O ensaio imunoenzimático foi medido utilizando o um espectrofotômetro VERSAmax (Molecular Devices). Os dados foram analisados para ambos testes utilizando o programa SoftMax Pro software version 5.4, utilizando a regressão logística de 5 parâmetros e expressos em pg/mL.

3.7 Análises estatísticas

A ferramenta de linguagem R versão 3.4.1 (99) com pacotes adicionais, foi utilizada para agrupar os dados demográficos e clínicos dos participantes deste estudo e os resultados da genotipagem, obtendo as frequências e porcentagem das variáveis, de acordo com as estratificações selecionadas. Foi utilizado o pacote *epiDisplay* versão 3.2.2 (*Epidemiological Data Display Package*) para explorar os dados e apresentar os resultados, utilizando o teste Qui-quadrado para avaliar a diferenças entre as frequências dos dados gerando o valor de p .

Os resultados da genotipagem foram extraídos para um editor de planilhas Excel, para posterior análises nos pacotes estatísticos do ambiente R. As frequências genótípicas e alélicas foram obtidas por contagem direta. O desvio do Equilíbrio Hardy-Weinberg (HWE) de todos os SNPs foram testados usando-se o método descrito por Guo e Thompson em 1992, avaliado pelo teste de Qui-quadrado - χ^2 , considerando o equilíbrio quando o valor de $P > 0,05$ foi utilizado pacote Genetics (Population Genetics) versão 1.3.8.1 e *hwde*-0.61 (100). A associação entre os SNPs

genotipados e o resultado do tratamento foi examinada utilizando o pacote SNPAssoc versão 1.9-2, utilizando cinco modelos genéticos diferentes (padrões de herança): codominante, dominante, recessivo, *overdominant* e log-aditivo identificando o valor da razão de chance, OR - *Odds Ratio*, e o intervalo de confiança de 95%, por regressão logística aplicando a correção do modelo de Bonferroni. O valor de OR > 1 indica genótipo ou alelo está em associação ao risco de o paciente não responder ao tratamento e valor de OR <1 indica associação do paciente que possua este genótipo de responder ao tratamento, ou seja obter a RVS. A análise foi feita sem ajuste e ajustada para as covariáveis: etnia, genótipo viral, tratamento, fibrose e carga viral antes do início do tratamento, covariáveis que apresentaram diferença significativa com *p* valor <0,05. O pacote Haplo.stats, versão 1.7.7 foi utilizado para avaliar haplótipos associados ao risco ou não de influenciar no prognóstico do paciente gerando um valor de OR.

Para análise do LD em pares entre SNPs e construção de haplótipos (101) foi utilizado o software Haploview, gerando gráfico r^2 e a frequência dos blocos de haplótipos da população estudada. O LD é caracterizado pela associação não aleatória entre alelos de diferentes locus, o valor de LD foi definida como forte com valor $r^2 > 0,80$.

Novamente, utilizando a linguagem R, dados gerados pela RT-qPCR por ambas técnicas de expressão genica de 96 citocinas simultaneamente e sistema Taqman, foram analisadas as intensidades brutas de primeiro e segundo planos exportadas da plataforma comercial Fluidigm® e qPCR Via7, foram feitos a correção do background e uma análise exploratória dos dados, foi gerado gráficos de acumulação de fluorescência e curva de fusão de Rn para cada reação em cada gene. Para a quantificação relativa das expressões, os dados de acumulado da fluorescência de cada amostra foram utilizados para ajustar quatro parâmetros de curvas sigmóides usando a biblioteca qPCR (102) para o pacote estatístico R versão 3.4.1 (103). Para cada amplificação, o ciclo de quantificação foi determinado como o máximo da segunda derivada da curva sigmóide ajustada, e a eficiência como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior a essa. Para cada gene, a eficiência estimada pela média de todas as eficiências para cada reação de amplificação dos genes. Os controles endógenos utilizados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelo método geNorm (104). Fatores de normalização foram

estimados para cada amostra usando a média geométrica dos genes normalizados selecionados (104).

Comparações pareadas de médias de expressão normalizadas transformadas por log (base 2) entre os grupos de interesse foram realizadas por contrastes / diferenças (dobras) obtidas após modelos lineares bi e multivariados ajustados por regressões ordinárias de mínimos quadrados. Sempre que a variável de interesse apresentasse mais de dois níveis, os valores de P foram corrigidos pelo método pós-Hoc de Tukey Honest Significant Difference (85). Após todas as comparações pareadas gene-a-gene, conduzimos um ajuste de erro Tipo I para comparações múltiplas seguindo o método de Holm-Bonferroni (105). Diferentes conjuntos de variáveis de confusão foram selecionados por especialistas clínicos e incluídos em modelos multivariados para ajustar os efeitos ajustados para diferentes variáveis de interesse para todos os genes. Em todas as análises, os níveis bicaudais de significância $\leq 0,01$, $0,05$ e $0,1$ foram considerados como "altamente significativos", "significativos" e "sugestivos", respectivamente.

O perfil de citocinas presentes nos soros foram avaliados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 5. Foram aplicados os testes não paramétricos One-way ANOVA, testes Mann Whitney, Kruskal-wallis, Wilcoxon e Friedman com teste de Dunn, foram utilizados para avaliar possíveis diferenças entre os resultados. O teste Spearman foi empregado para analisar a correlação entre os resultados fenotípicos e imunogenéticos.

4- RESULTADOS

4.1 Características epidemiológicas e clínicas associadas à RVS

Do total de 740 pacientes com HCC tratados, 33 (4,5%) foram excluídos das análises pois não completaram todo o tratamento devido a decisão dos pacientes de abandonar o protocolo, por violação do protocolo ou perda de seguimento e retirada do consentimento. Sendo assim, o presente estudo avaliou uma coorte de 707 pacientes, dos quais 539 (76%) receberam tratamento completo, 130 (18%) tiveram término precoce esperado e 38 (5,4%) tiveram evento adverso. As características demográficas e clínicas de todos os pacientes com HCC submetidos ao esquema de tratamento completo com terapia combinada (Peg-IFN α / RBV), estão apresentados na Tabela 2. Entre os 707 pacientes, 62% obtiveram RVS e 38% não responderam ao tratamento (NR) e foram observadas diferenças significativas nos parâmetros associados ao desfecho do tratamento. A faixa etária ($p=0.982$) e o gênero ($p=0.063$) não apresentaram diferença entre os pacientes que obtiveram RVS e NR, como mostra a tabela 2. Pacientes infectados com GT1 tiveram um menor percentual de RVS (50%) em relação a 78% dos pacientes com GT2/3 ($P < 0,001$). Pacientes de cor negra (etnia auto-atribuída) apresentaram uma taxa 35% ($P = < 0,001$) de RVS enquanto brancos e pardos, 65% e 60%, respectivamente. Indivíduos com maior comprometimento do fígado, com estágio de fibrose F3 e F4 apresentaram menor capacidade de alcance de RVS, com uma porcentagem de 52% ($P = 0,022$), em comparação aos pacientes com estágio F0, F1 e F2 com 67% e 58%, respectivamente. Antes do início do tratamento, pacientes com carga viral $< 5,90$ UI/mL, Log₁₀ obtiveram 72% de RVS, enquanto que pacientes acima 5,91 UI/mL, log₁₀ apresentaram 52%, com P valor $< 0,001$. Entre os dois biofármacos foi visto diferença significativa com $p < 0,001$, onde os pacientes tratados com Peg-IFN α 2a alcançaram uma taxa de RVS de 70% em relação a 55% tratados com Peg-IFN α 2b, sem levar em consideração o genótipo viral. Os dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos neste estudo, apresentaram uma distribuição homogênea na frequência, inclusive a frequência genotípica dos SNPs para ambos tratamentos (dados não mostrados). Desta forma, possíveis efeitos dos fatores preditivos do hospedeiro e do vírus foram minimizados para avaliação da eficácia e segurança dos biofármacos e no desfecho do tratamento.

Tabela 2. Distribuição da frequência dos dados demográficos e clínicos em relação ao desfecho do tratamento dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α 2a ou 2b e RBV. Teste Qui-quadrado.

Características	Pacientes	(%)	RVS	(%)	NR	(%)	P valor
Total	707		441	(0.62)	266	(0.38)	
Gênero							
F	376	(0.51)	247	(0.65)	129	(0.34)	0.063
M	331	(0.45)	194	(0.59)	137	(0.41)	
Genótipo Viral							
GT1	344	(0.49)	171	(0.50)	173	(0.50)	<0.001
GT2/3	363	(0.51)	270	(0.74)	93	(0.26)	
*Etnia							
Branca	564	(0.80)	368	(0.65)	196	(0.35)	<0.001
Parda	91	(0.13)	55	(0.60)	36	(0.40)	
Negra	52	(0.07)	18	(0.35)	34	(0.65)	
Faixa etária							
19 to 42	186	(0.26)	117	(0.63)	69	(0.37)	0.982
43 to 57	366	(0.52)	228	(0.62)	138	(0.38)	
>58	155	(0.22)	96	(0.63)	59	(0.38)	
**Estágio inicial de fibrose							
F0 - 1	359	(0.51)	240	(0.67)	119	(0.33)	0.022
F2	184	(0.26)	107	(0.58)	77	(0.42)	
F3 - 4	64	(0.09)	33	(0.52)	31	(0.48)	
Carga viral inicial (log IU/mL)							
2,65 to 5,90	360	(0.51)	259	(0.72)	101	(0.28)	<0.001
> 5,91	347	(0.49)	182	(0.52)	165	(0.48)	
Tratamento							
IFN α -2a	353	0,50	246	0,70	107	0,30	<0.001
IFN α -2b	354	0,50	195	0,55	159	0,45	

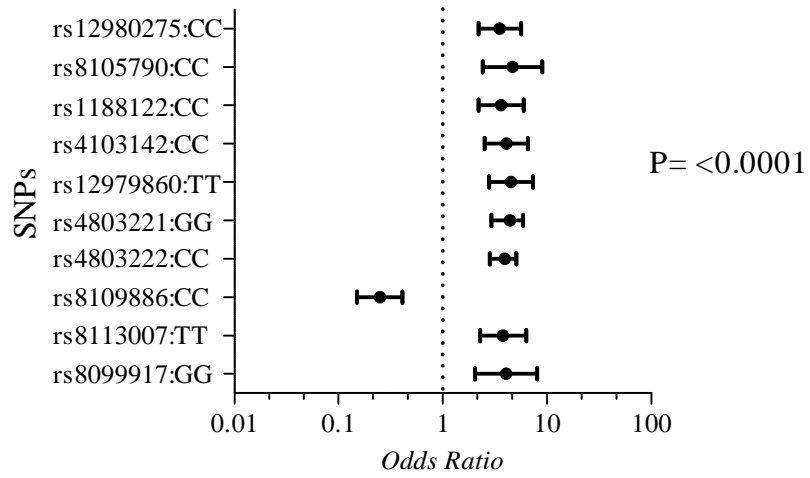
*Etnia auto-declarada; **alguns dados não disponíveis.

4.2 Análises de associação dos SNPs da região *IFNL3* E *IFNL4* com o desfecho do tratamento

Foi observado um desvio significativo do EHW para 6 SNPs rs1188122 (p=0,046); rs8103142 (p =0,047), rs12979860 (p=0,026); rs4803222 (p=0,008); rs8113007 (p =0,005); e rs2099331 (p =0,012), entre o grupo dos pacientes com HCC. Nenhum indivíduo foi excluído a partir de análise do controle de qualidade da genotipagem.

As análises de associação dos genótipos com o desfecho do tratamento demonstraram que 10 SNPs apresentaram genótipos associados ao desfecho do tratamento. Para tal, foram utilizados cinco diferentes modelos genéticos de análise comparativa entre homocigotos dominantes ou recessivos e heterocigotos, os alelos de maior frequência (MAF) foram utilizados como referência para o cálculo. Na tabela 3 está descrito a frequência e valores de OR dos genótipos e carreadores dos SNPs associados ao desfecho do tratamento. Do total, 9 SNPs apresentaram genótipos e carreadores associados ao risco de obter falha terapêutica durante o tratamento com Peg-IFN α /RBV. O maior valor foi gerado pelo genótipo rs12979860-TT que apresentou OR de 4,51 e IC (2,8-7,3), valor de $P=1,89E-09$, seguido pelos rs8103142-CC, OR = 4,08 (2,5-6,6), $P=1,85E-08$; rs8105790-CC, OR = 4,66 (2,4-9,0) $P=1,86E-06$; rs8099917-GG OR = 4,05 (2,0-8,0) $P=2,51E-05$; rs4803221-GG OR=3,9 (2,1-7,2) $P=2,77E-03$; rs4803222-CC OR=3,64 (2,2-6,0) $P=8,59E-05$; rs1188122-CC OR=3,63 (2,2-6,0) $P=1,08E-06$; rs8113007-TT OR=3,79 (2,3-6,3) $P=6,46E-07$; rs12982275-CC OR=3,52 (2,2-5,6) $P=4,62E-07$. Somente o genótipo (CC) do SNP rs8109886 mostrou uma OR=0,25 (0,2-0,4) $P=5,63E-08$ indicando associação à RVS após o término do tratamento, figura 18A. Após o ajuste para possíveis fatores de confundimentos, como genótipo viral, cor, fibrose, carga viral e droga, foi observado um aumento no valor do OR confirmando a relevância do efeito fenotípico das variantes, contudo, um aumento no intervalo de confiança, diminuindo a precisão, conforme ilustrado na figura 18B. A tabela 3 apresenta a distribuição detalhada da frequência dos genótipos e carreadores e valores de OR dos SNPs associados ao desfecho. Esses dados confirmam que o SNP rs12979860 como sendo o marcador com maior potencial de prever o desfecho do tratamento, entre os outros, similar aos dados apresentados em todo mundo.

A



B

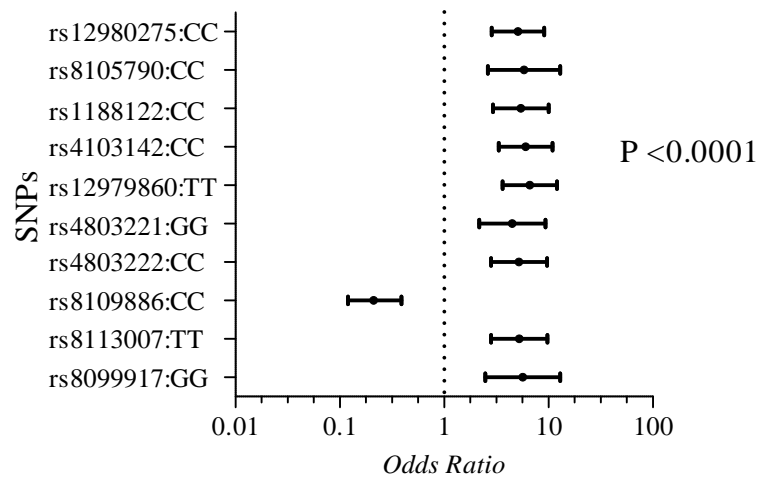


Figura 18 Associação dos variantes em torno da região de *IFNL3* e *IFNL4* com o desfecho do tratamento. Análises genotípica dos SNPs em pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV, a partir de sangue total (n=707). A) modelo não ajustado; B) modelo ajustado pelo confundidores: genótipo viral, Cor, fibrose, carga viral antes da terapia e os biofármacos como covariável.

Tabela 3. Distribuição da frequência dos genótipos e carreadores dos SNPs associados ao desfecho do tratamento e os valores de Odds Ratio.

SNPs	Genótipos Carreadores	Desfecho		não ajustado		ajustado	
		RVS (%)	NR (%)	OR	P-value	OR	Valor de P
rs12980275	T/T	171 (38.8)	60 (22.6)		Referência		
	T/C	219 (49.7)	143 (53.8)	1,9 (1.3-2.7)	4,62E-07	2,6 (1.7-4.0)	2,38E-08
	C/C	51 (11.6)	63 (23.7)	3,5 (2.2-5.6)		5,1 (2.9-9.1)	
	T/T	171 (38.8)	60 (22.6)	1		1	
	carreador C	270 (61.2)	206 (77.4)	2,2 (1.5-3.1)	6,06E-06	3,0 (2.0-4.6)	1,10E-07
rs8105790	T/T	255 (57.8)	113 (42.5)		Referência		
	T/C	171 (38.8)	122 (45.9)	1,6 (1.2-2.2)	1,86E-06	2,2 (1.5-3.3)	4,06E-07
	C/C	15 (3.4)	31 (11.7)	4,7 (2.4-9.0)		5,8 (2.6-13.0)	
	T/T	255 (57.8)	113 (42.5)	1		1	
	carreador C	186 (42.2)	153 (57.5)	1,9 (1.3-2.5)	7,47E-05	2,5 (1.7-3.7)	1,29E-06
rs11881222	T/T	185 (42)	71 (26.7)		Referência		
	T/C	218 (49.4)	142 (53.4)	1,7 (1.2-2.4)	1,08E-06	2,4 (1.6-3.7)	3,37E-08
	C/C	38 (8.6)	53 (19.9)	3,6 (2.21-6.0)		5,4 (2.9-10.1)	
	T/T	185 (42)	71 (26.7)		Referência		
	carreador C	256 (58)	195 (73.3)	2,0 (1.43-2.8)	3,55E-05	2,8 (1.9-4.3)	3,20E-07
rs8103142	T/T	157 (35.6)	49 (18.4)		Referência		
	T/C	229 (51.9)	147 (55.3)	2,1 (1.4-3.0)	1,85E-08	2,87 (1.8-4.5)	1,50E-09
	C/C	55 (12.5)	70 (26.3)	4,1 (2.5-6.6)		6,0 (3.3-10.9)	
	T/T	157 (35.6)	49 (18.4)		Referência		
	carreador C	284 (64.4)	217 (81.6)	2,5 (1.7-3.5)	6,47E-07	3,4 (2.2-5.3)	1,67E-08
rs12979860	C/C	165 (37.4)	50 (18.8)		Referência		
	C/T	227 (51.5)	149 (56)	2,2 (1.5-3.2)	1,89E-09	3,0 (1.9-4.7)	2,59E-10
	T/T	49 (11.1)	67 (25.2)	4,5 (2.8-7.3)		6,6 (3.6-12.1)	
	C/C	165 (37.4)	50 (18.8)		Referência		
	carreador T	276 (62.4)	216 (81.2)	2,6 (1.8-3.7)	9,82E-08	3,5 (2.3-5.5)	4,32E-09
rs4803221	C/C	244 (55.3)	108 (40.6)		Referência		
	C/G	178 (40.4)	125 (47.0)	1,6 (1.2-2.2)	8,71E-03	2,2 (1.5-3.3)	2,77E-03
	G/G	19 (4.3)	33 (12.4)	3,9 (2.1-7.2)		4,5 (2.2-9.4)	
	C/C	244 (55.3)	108 (40.6)		Referência		
	carreador G	197 (44.7)	158 (59.4)	1,8 (1.3-2.5)	1,43E-01	2,5 (1.7-3.6)	3,10E-03
rs4803222	G/G	182 (41.3)	69 (25.9)		Referência		
	C/G	222 (50.3)	146 (54.9)	1,7 (1.2-2.5)	1,36E-03	2,4 (1.5-3.6)	8,59E-05
	C/C	37 (8.4)	51 (19.2)	3,6 (2.2-6.0)		5,2 (2.8-9.7)	
	G/G	182 (41.3)	69 (25.9)		Referência		
	carreador C	259 (58.7)	197 (74.1)	2,0 (1.4-2.8)	2,98E-02	2,8 (1.8-4.1)	5,94E-04
rs8109886	A/A	106 (24)	106 (39.8)		Referência		
	A/C	229 (51.9)	134 (50.4)	0,6 (0.4-0.8)	5,63E-08	0,5 (0.4-0.8)	4,67E-07
	C/C	106 (24)	26 (9.8)	0,3 (0.2-0.4)		0,2 (0.1-0.4)	
	A/A	106 (24)	106 (39.8)		Referência		
	carreador C	335 (76)	160 (60.2)	0,5 (0.3-0.7)	1,03E-05	0,4 (0.3-0.6)	2,03E-05
rs8113007	A/A	182 (41.3)	68 (25.6)		Referência		
	A/T	223 (50.6)	147 (55.3)	1,8 (1.3-2.5)	6,46E-07	2,4 (1.6-3.7)	7,48E-08
	T/T	36 (8.2)	51 (19.2)	3,8 (2.3-6.3)		5,3 (2.8-9.8)	
	A/A	182 (41.3)	68 (25.6)		Referência		
	carreador T	259 (58.7)	198 (74.4)	2,0 (1.5-2.9)	1,84E-05	2,8 (1.9-4.2)	4,36E-07
rs8099917	T/T	264 (59.9)	121 (45.5)		Referência		
	T/G	163 (37)	119 (44.7)	1,6 (1.16-2.1)	2,51E-05	0,3 (0.2-0.6)	9,42E-06
	G/G	14 (3.2)	26 (9.8)	4,1 (2.0-8.0)		5,7 (2.5-12.9)	
	T/T	264 (59.9)	121 (45.5)		Referência		
	carreador G	177 (40.1)	145 (54.5)	1,8 (1.3-2.4)	2,01E-04	0,5 (0.4-0.6)	8,32E-08

4.3 Análises de desequilíbrio de ligação e bloco de haplótipo dos polimorfismos

Os rs12970860 e rs8099917 são os polimorfismos mais relevantes no entorno da região do gene *IFNL3* associados ao desfecho de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α e RBV. Além disso, esses SNPs apresentam distintos valores de LD dependendo da ancestralidade. As análises entre os 12 SNPs na região de *IFNL3* mostraram um forte LD entre os rs12980275, rs1188122, rs8103142, rs12979860, rs4803222 e rs8113007 formando um bloco haplótico principal com o valor $r^2 \geq 0,75$, (figura 19A). Também foi observado bloco entre SNPs rs8105790, rs4803221 e rs8099917 com LD mais forte com valor de $r^2 \geq 0,85$ e o rs8109886 apresentou um LD $r^2 \leq 0.60$ considerado moderado entre todos os outros SNPs. A partir dos dados obtidos, selecionamos os 3 SNPs rs12979860, rs8109886 e rs8099917 que apresentaram LD que funcionam como etiquetas de toda a região e valores de r^2 moderados, como mostra a figura 19B.

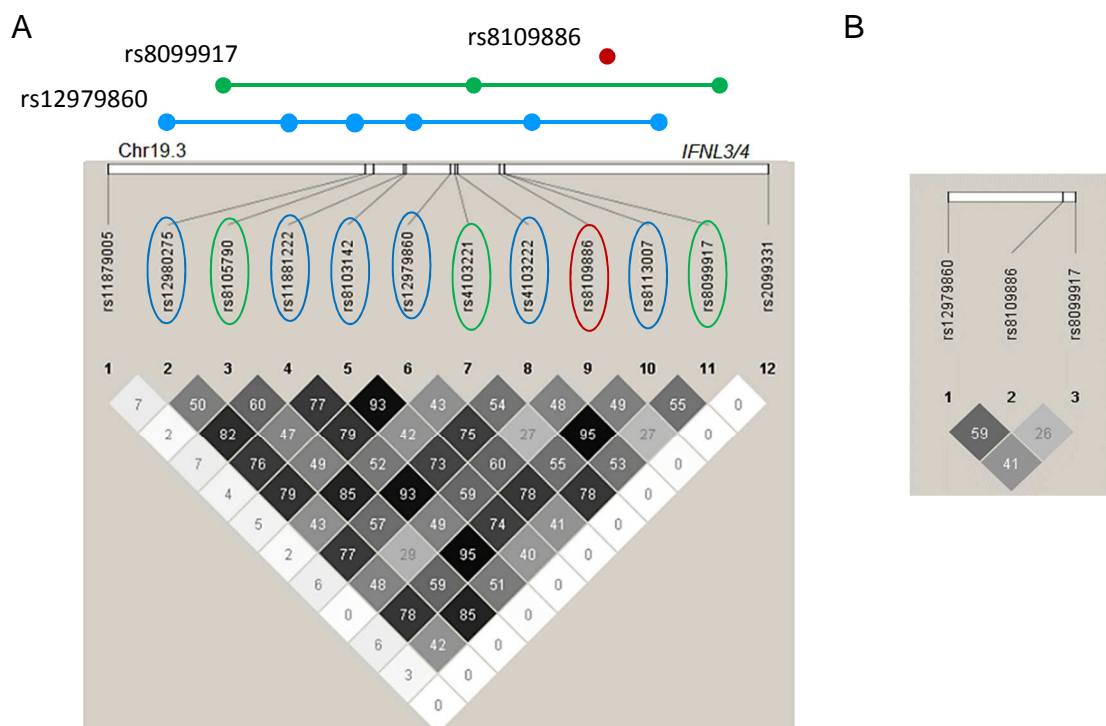
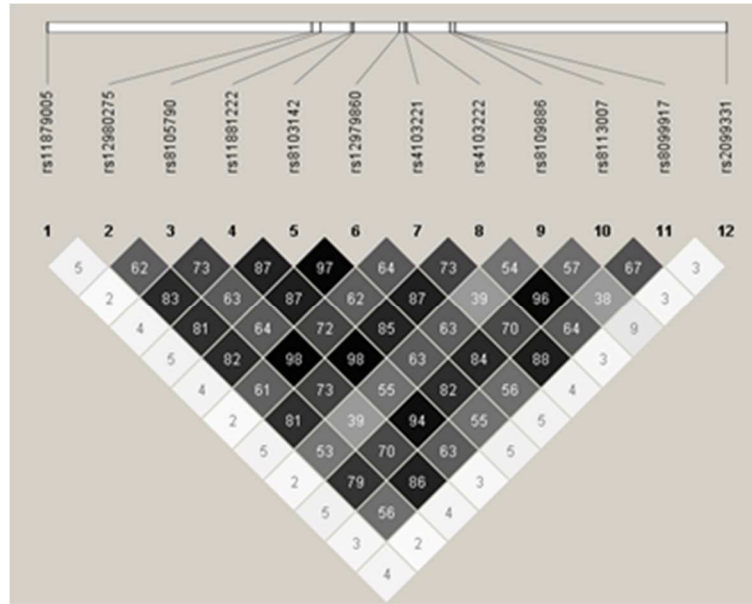


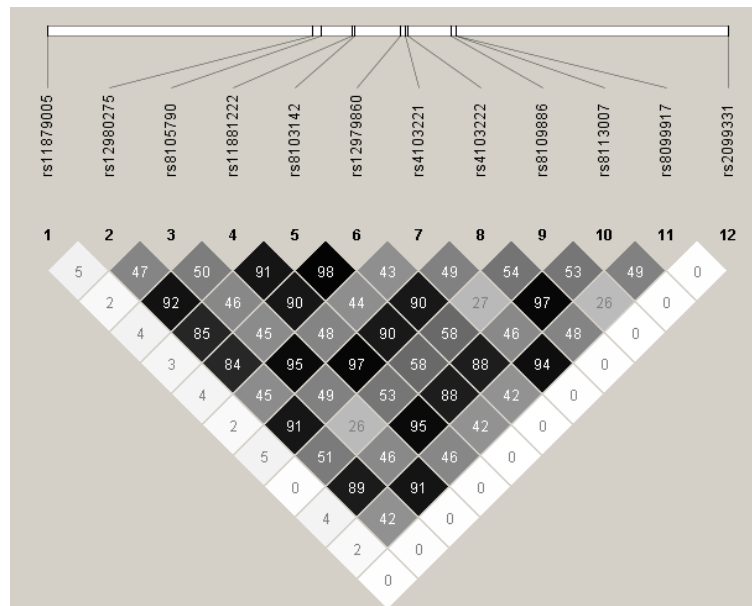
Figura 19 Desequilíbrio de ligação de par em par entre todos SNPs da região do *IFNL3* e *IFNL4*. Genotipagem das amostras de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV, a partir de sangue total (n=707). A) Todas as amostras dos pacientes infectados com HCC, B) DL dos 3 SNPs representativos desta região. Os valores de r^2 são proporcionais a tonalidades das cores: a cor preta equivale a r^2 1, e o tom clareia conforme a diminuição do valor do r^2 , que foi definido pelo método dos intervalos de confiança implementados pelo software Haploview.

Em seguida, foi analisado o LD com dados extraídos do banco 1000 genomas (conjunto-GRCh38), das populações europeia, ameríndias e africanas. Apresentando uma similaridade dos valores de r^2 da população deste estudo com a população ameríndia, próxima da população europeia e bem diferente da população africana, conforme mostra a figura 20.

A



B



C

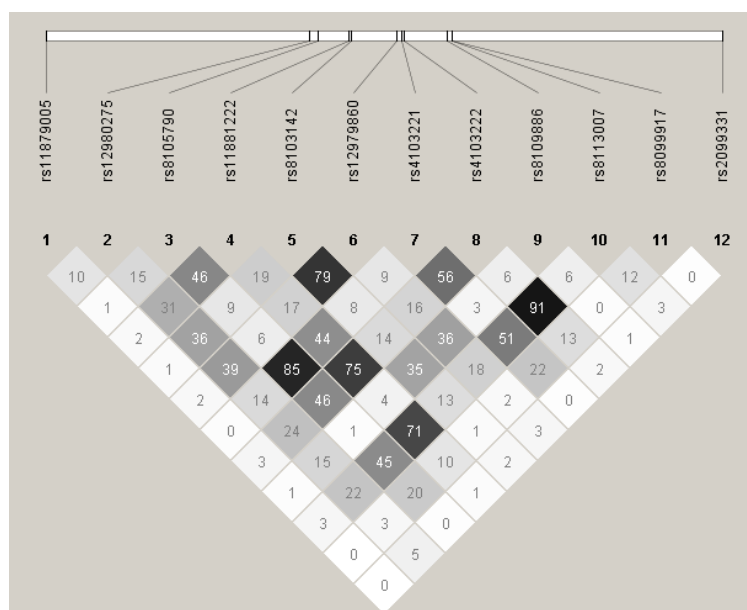


Figura 20. Desequilíbrio de ligação de par em par entre os SNPs da região ao gene *IFNL3* e *IFNL4*. Avaliação da LD a partir dos dados extraídos do 1000genomas. A) população europeia; B) população Ameríndias, C) população africana. Os valores de r^2 são proporcionais a tonalidades das cores: a cor preta equivale a r^2 1, e o tom vai clareando conforme a diminuição do valor do r^2 , foram definidos pelo método dos intervalos de confiança implementados pelo software (haploview).

4.4 Avaliação dos polimorfismos representativos do *IFNL3* E *IFNL4* e o desfecho do tratamento

Os SNPs rs12979860, rs8109886 e rs8099917 foram definidos como *tags* deste bloco de haplótipo, visto que estes representam toda região do *IFNL3* e *IFNL4* específicas deste estudo. Sendo assim, avaliamos os genótipos destes SNPs com relação ao desfecho do tratamento.

As frequências dos genótipos destes três SNPs entre os pacientes tratados, que obtiveram RVS, para rs12979860 (C/C - 78%, C/T-60% e T/T - 42%), para rs8109886 (C/C - 80%, A/C - 63%, A/A - 50%) e para rs8099917 (T/T - 69% T/G - 57%, G/G 35%), figura 21. O rs8109886-C/C apresentou a maior taxa de RVS (80%) entre os outros, e pacientes infectados com GT2/3 apresentaram 85% de RVS, figura 22A e 22B. Isto pode ser explicado, pelo fato de todos os pacientes com genótipo rs8109886-CC serem também homocigotos para rs12979860-CC, ampliando o efeito fenotípico do rs8109886-C/C. Diferenças significativas foram observadas quando comparados os genótipos dos SNPs a rs12979860 (C/C vs C/T $p=0,0091$ e C/C vs T/T $p <0,0001$), rs8109886 (C/C vs A/C $p=0,0118$; C/C vs A/A $p <0,0001$), e rs8099917

(T/T vs G/G $p < 0,0001$) (figura 21). Contudo, o rs12979860 apresentou a maior diferença significativa entre os genótipos de cada SNP, confirmando ser mais forte biomarcador. De fato, o genótipo rs8099917-G/G é um importante preditor de risco de não resposta ao tratamento pelo paciente, com uma taxa de RVS entre todos pacientes $< 40\%$, (figura 21). Principalmente em pacientes GT1 com 18% de RVS somente, conforme mostra a figura 22A.

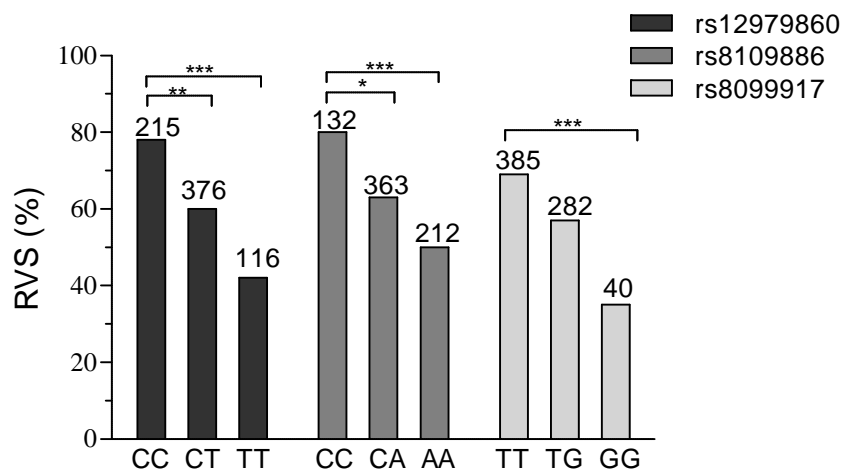
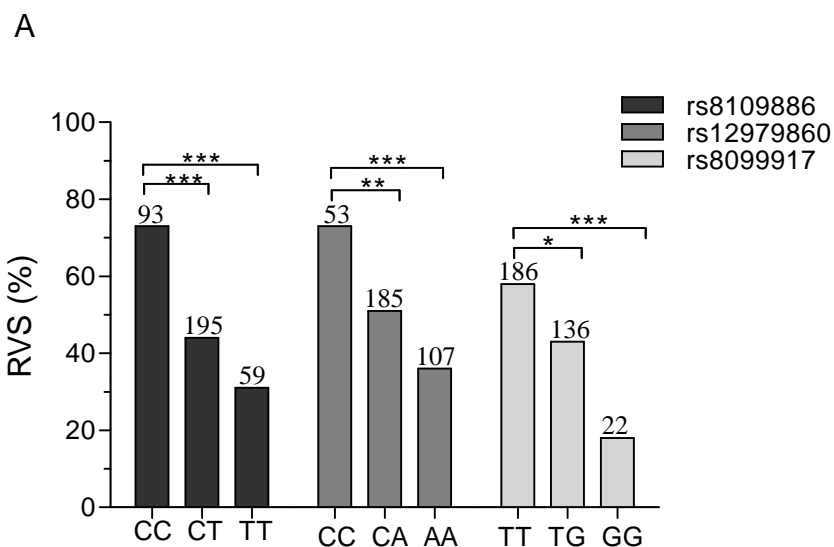


Figura 21. Frequência e a distribuição de RVS em pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α . Análise da porcentagem de indivíduos que apresentaram RVS discriminado por genótipo das variantes rs12979860, rs8109886 e rs8099917. Os números acima das colunas descrevem a quantidade de pacientes submetidos ao tratamento. Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para comparação entre os genótipos (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).



B

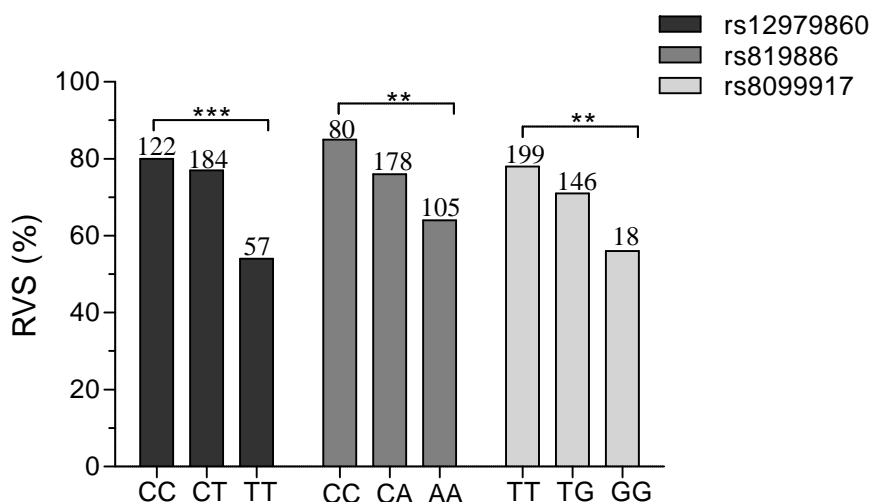
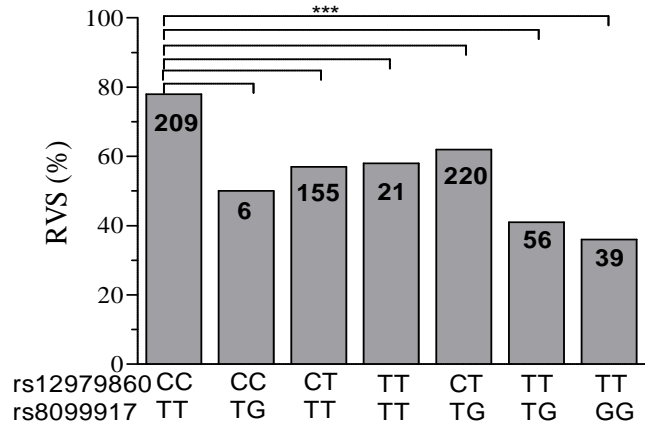


Figura 22. Frequência dos genótipos rs12979860, rs8109886 e rs8099917, dos pacientes com HCC tratados e a porcentagem de RVS obtida, estratificados pelo genótipo viral. Análise da porcentagem de indivíduos que apresentaram RVS discriminado por genótipo das variantes rs12979860, rs8109886 e rs8099917. A) GT1; B) GT2/3. Os números acima das colunas descrevem a quantidade de pacientes submetidos ao tratamento de cada genótipo. Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para comparação entre os genótipos (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

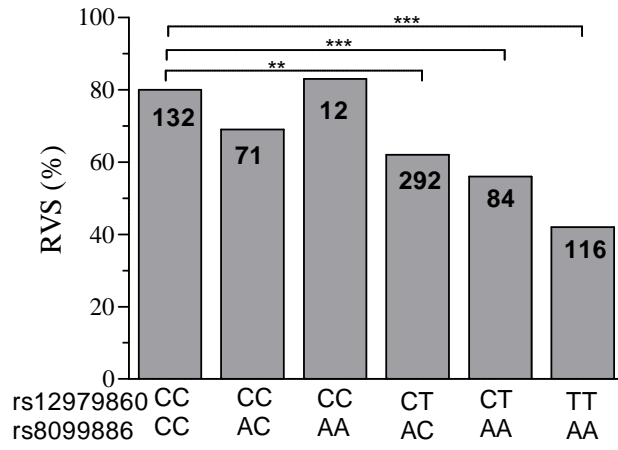
4.5 A relação entre a combinação genotípica do paciente e o resultado do tratamento

Nossos dados mostraram diferenças entre os 3 SNPs na taxa de obtenção de RVS. Sendo assim, avaliamos a probabilidade da combinação dos genótipos em melhorar a predição no desfecho do tratamento. Observou-se que a combinação dos genótipos SNPs do rs12979860 e rs8109886 apresentou um aumento acima de 80% para CC-CC e CC-AA e 69% para CC/AC, sem diferença significativa entre eles, figura 23A. Em contraste, a combinação entre rs12979860 e rs8099917, apresentou taxa de RVS para CC-TT (78%), e as demais combinações gênicas com taxa menor de 61%, com diferença significativa como mostra a figura 23B. Além disso, estes dados sugerem que a combinações de genótipos dos três SNPs foram validadas, ampliando a probabilidade de prever o prognóstico do tratamento (figura 23C).

A



B



C

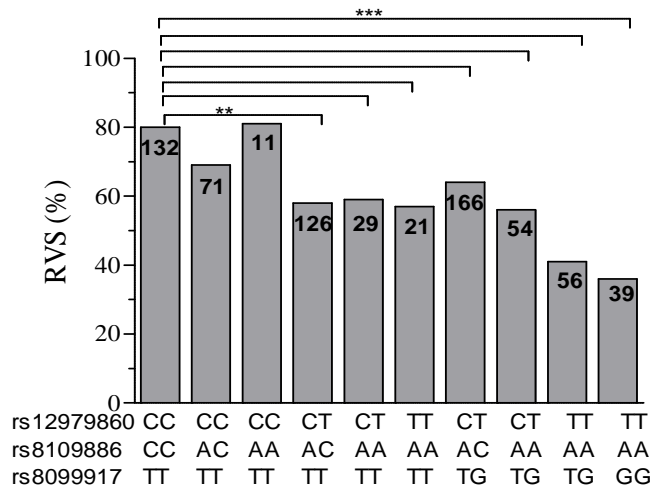
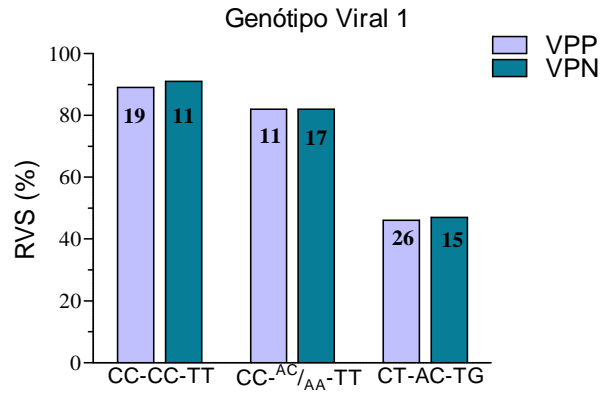


Figura 23. Distribuição da combinação genotípica dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN- α e porcentagem de RVS de cada combinação. Análise da porcentagem de indivíduos que apresentaram RVS discriminado pela combinação gênica. Os números acima das colunas descrevem a quantidade de pacientes submetidos ao tratamento. A) rs12979860 & rs8109886; B) rs12979860 & rs8099917; C) rs12979860 & 8109886 & rs8099917. Os números dentro das colunas descrevem a frequência dos pacientes. (*P<0,05; **P<0,001 a ***P<0,0001), utilizando o teste exato de Fisher.

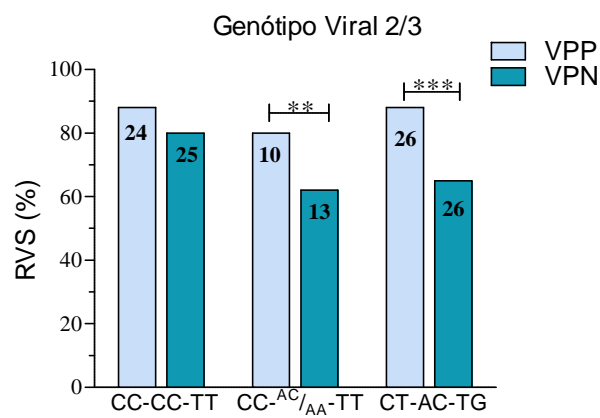
Com foco na terapia personalizada, classificamos os pacientes com HCC com base nos parâmetros demográficos e clínicos preditivos e investigamos se adicionando a combinação genética com os três SNPs contribuiria para melhores estimativas do resultado do tratamento. Para esta proposta, consideramos o genótipo viral como uma variável não-genética e separamos os pacientes em dois grupos de acordo com variáveis prognósticas positivas ou negativas. O primeiro grupo continha pacientes <50 anos de idade com fibrose F0 e F1 (variáveis prognósticas positivas, VPP), e o segundo grupo continha pacientes com idade \geq 50 anos exibindo fibrose F2, F3 ou F4 (variáveis prognósticas negativas, VPN).

Em nossa análise, pacientes infectados pelo VHC GT1 com VPP ou VPN apresentaram pelo menos 82% de RVS, com exceção dos pacientes heterozigotos com 47% de RVS, como mostra figura 24A. Curiosamente, o grupo VPP infectado com o HCV GT1 apresentou taxas de RVS semelhantes ao grupo VPN, não demonstrando diferença significativa. Em relação aos pacientes infectados com HCV GT2/3, o grupo VPP obtiveram acima de 80% de RVS, nas três combinações. Em contraste, no grupo VPN, apenas pacientes homozigotos para o alelo favorável (CC-CC-TT) obtiveram 80% da RVS, demonstrando uma diferença significativa na combinação gênica (CC-AC / AA-TT e CT-AC -TG) entre os dois grupos (VPP e VPN), como mostra na figura 24B. Mais uma vez, os resultados confirmam que a combinação genética pode melhorar a previsão dos resultados do tratamento de pacientes com HCC utilizando a terapia a base de alfapeginterferona. A figura 24C, apresenta os resultados da RVS obtidos por todos os pacientes (GT1 - 39% e GT2/3 - 62%) versus os pacientes com combinações genéticas e não genéticas favoráveis que apresentaram mais de 80% de RVS (figuras 24A e 24B), elevando o percentual de RVS para 86% para GT1 e para 84% para GT2/3. Em resumo, as características de agrupamento da genética do hospedeiro com outras variáveis prognósticas podem elevar a previsão da porcentagem de RVS para o VHC GT1 e GT2/3, bem como, a genética do hospedeiro.

A



B



C

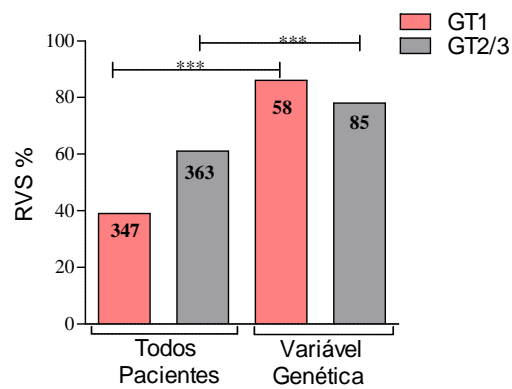


Figura 24. Percentual de RVS em pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV estratificado pela combinação gênica entre o rs12979860, rs8109886 e rs8099917 e pelo genótipo viral, agrupados de acordo com fatores clínicos relacionados com bom prognóstico terapêutico. Análise da porcentagem de indivíduos que apresentaram RVS discriminado pela combinação gênica. A) pacientes com idade < 50 anos, com F0 e F1; B) pacientes \geq 50 anos com F2, F3, F4; C) taxa de RVS entre todos os pacientes e pacientes com variável genética preditiva para o desfecho do tratamento. Foi utilizado o teste exato de Fisher, e obtidos valores de $**P < 0,001$, $***P < 0,0001$. Os números dentro das colunas descrevem a frequência dos pacientes. As combinações dos genótipos estavam na seguinte ordem dos SNPs rs12979860 & rs8109886 & rs8099917.

4.6 Avaliação dos níveis séricos de quimiocinas durante o tratamento.

As diferenças nos níveis de quimiocinas foram avaliadas a partir dos soros de voluntários sadios e pacientes.

No grupo dos voluntários sadios foi observado diferença significativa nos níveis das quimiocinas CCL4 e CXCL10, após administração do Peg-IFN α , caracterizando a indução pelo biofármaco. Foi observado um aumento nos níveis de CCL4 após 24h de administração do Peg-IFN α ($P < 0,016$), figura 25A. Adicionalmente, CXCL10 apresentou um aumento após 24 e 72 horas de administração do fármaco com valor de $P < 0,0001$, e uma leve diminuição nos níveis de CXCL10 de 24 para 72 horas com valor de $P < 0,001$, figura 25B.

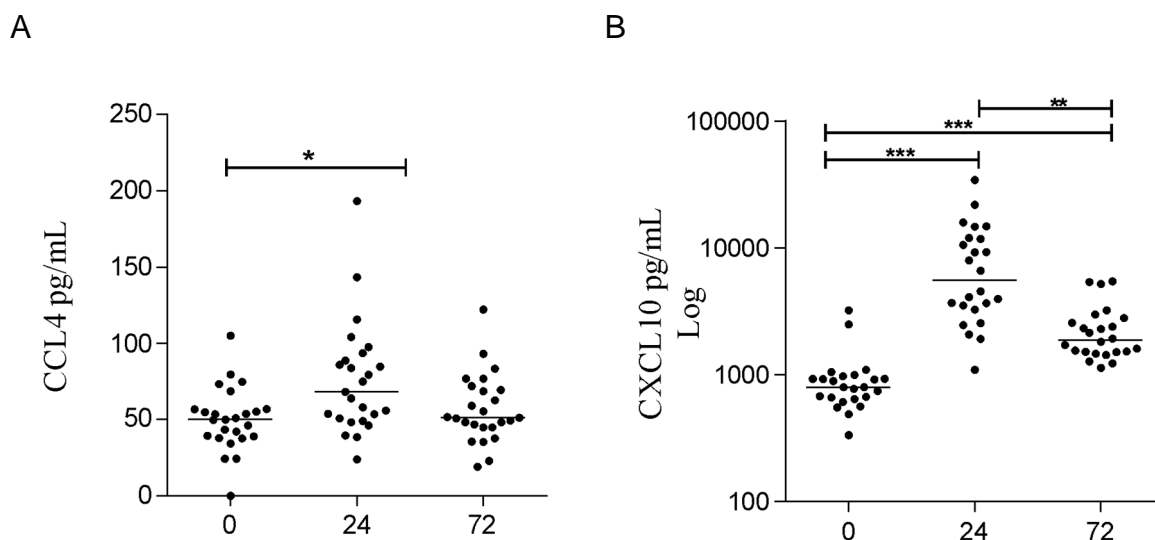
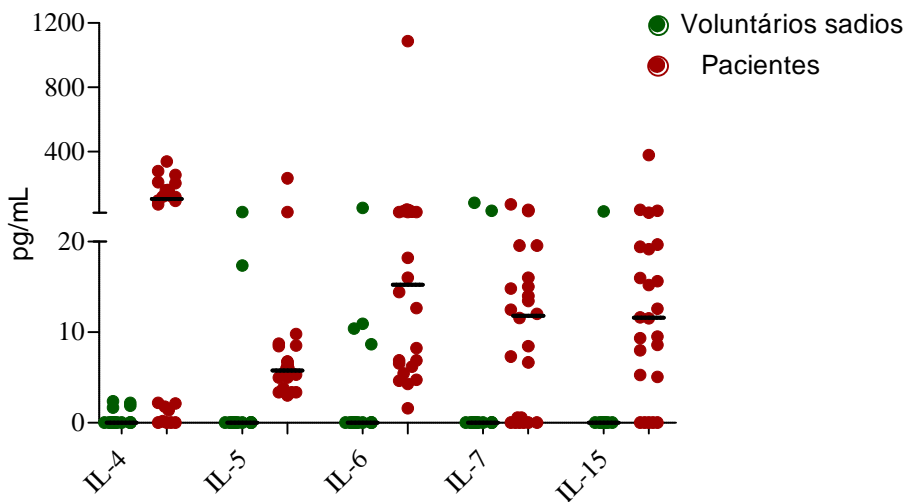


Figura 25. Níveis séricos de CXCL10 e CCL4 induzidas pelos biofármacos em voluntários sadios após administração do Peg-IFN α . Quantificação de citocinas em soro de voluntários sadios que receberam uma dose de 180 μ g do Peg-IFN α -2a ou Peg-IFN α -2b, nos tempos 0, 24 e 72 horas após administração. A) CCL4; B) CXCL10. Teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn's, valores da mediana (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

Pacientes com HCC apresentam níveis de citocinas séricas aumentadas cujas respostas imunológicas têm relação direta com o desenvolvimento e a manutenção da infecção viral (107). Então ao comparar o tempo zero dos voluntários sadios e dos pacientes antes do início do tratamento, foi observado níveis altos na maioria das citocinas dos pacientes. Já em voluntários sadios não foi detectado níveis de várias citocinas como mostra nas figuras 26A e B. Apresentando diferença significativa nos

níveis da quimiocina CCL2 ($P < 0,0001$), e o fator de crescimento PDGF-BB apresentou menor nível em pacientes do que em voluntários sadios ($P = 0,0019$), indicando a indução negativa desta citocina em pacientes com HCC.

A



B

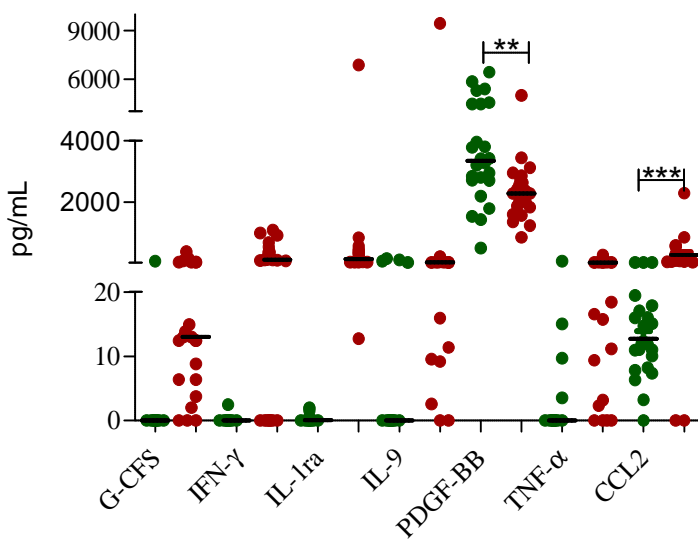


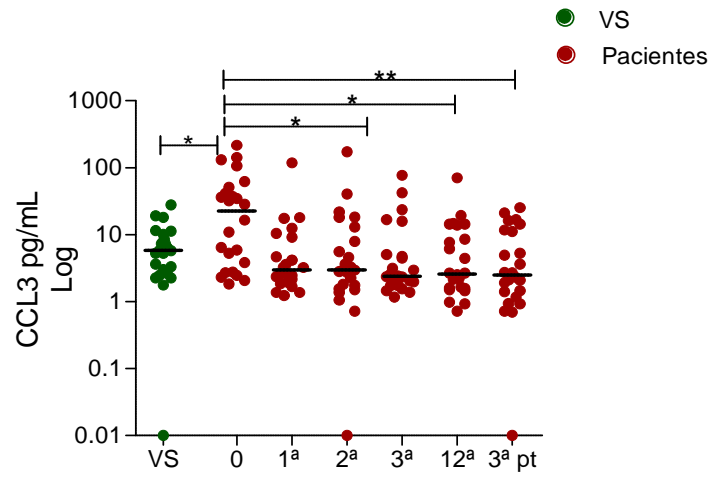
Figura 26. Níveis séricos das citocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC. Quantificação de citocinas no soro de voluntários sadios e pacientes com HCC, antes da administração da pegalinterferona. A) IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-15 e B) G-CFS, IFN- γ , IL-1ra, IL-9, PDGF-BB, TNF- α e CCL2. As diferenças entre os níveis de citocinas foram avaliadas utilizando o teste estatístico Mann Whitney (** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

Entretanto, ao avaliarmos os pacientes ao longo do tempo de tratamento, foi observado diferença significativa entre tempo 0 em relação aos demais tempos, somente nos níveis das quimiocinas, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10, demonstrando o efeito induzido pela terapia, figuras 27 e 28. CCL3 e CCL4 apresentaram diminuição logo na primeira semana de tratamento se mantendo até o final do tratamento, com diferença significativa, como mostra figuras 27A e 27B. Curiosamente, tanto CCL3 como CCL4 apresentaram dois grupos de pacientes, os que apresentavam níveis altos e outros que apresentavam níveis baixos, durante e depois do tratamento. Dentro do grupo com altos níveis de CCL3 e CCL4, 67% não responderam ao tratamento, eram infectados com GT1 e foram tratados com Peg-IFNa2b.

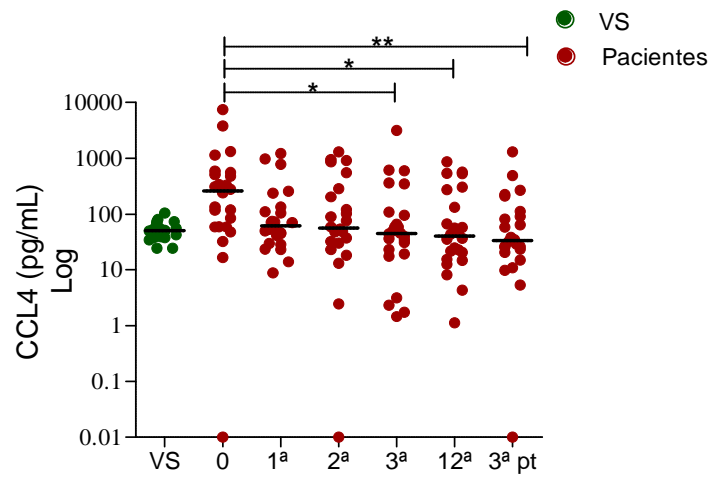
Alta produção de CCL5 foi observada a partir da segunda semana de tratamento, em um grupo de pacientes apresentando diferença significativa com valor de $P < 0,001$. Dentro do grupo de alto produtores de CCL5 ($n=8$), 75% foram pacientes NR e GT1 e 62% foram tratados com Peg-IFNa2b (figura 27C). Visto que, não foi observado diferença entre os VS e os pacientes, demonstrando que níveis altos de CCL5 possa estar relacionado a inflamação hepática. Foi observado que 78% dos pacientes que tinham níveis altos de CCL5 também apresentavam níveis altos para CCL4, entretanto, não foi visto correlação entre as duas quimiocinas.

Os níveis da quimiocina CXCL8 tiveram um declínio logo na primeira semana de tratamento ficaram baixos, permanecendo assim durante e depois do tratamento. Entretanto, no grupo dos VS não foi detectado CXCL8, (figura 28A). Foi identificado um aumento na produção da quimiocina CXCL10 logo nas primeiras horas, induzidos pelo tratamento. Os níveis de CXCL10 foram diminuindo no decorrer do tratamento, porém um determinado grupo de pacientes mantiveram níveis altos, eram os mesmos pacientes com alta produção de CCL4. Demonstrando diferença significativa entre os tempos 0 e 12^a semana e 3^a semana pós tratamento com valor de $P < 0,05$, como mostra na figura 28B.

A



B



C

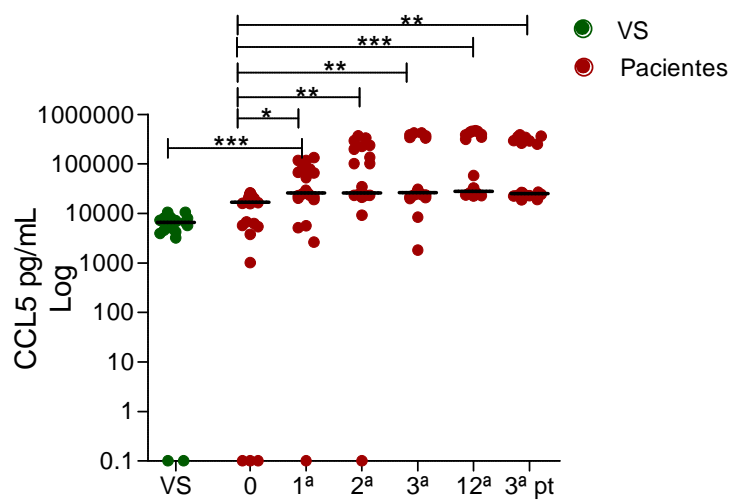


Figura 27. Níveis séricos das quimiocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α . Quantificação de citocinas no soro de voluntários sadios (VS) e dos pacientes tratados com Peg-IFN α /RBV, nos tempos 0, 1^a, 2^a, 3^a, 12^a durante o tratamento e 3^a semana pós-tratamento. A) CCL3; B) CCL4; C) CCL5. As diferenças entre os níveis de citocinas foram avaliadas utilizando o teste estatístico Mann Whitney (*P<0,01, **P<0,001, ***P<0,0001).

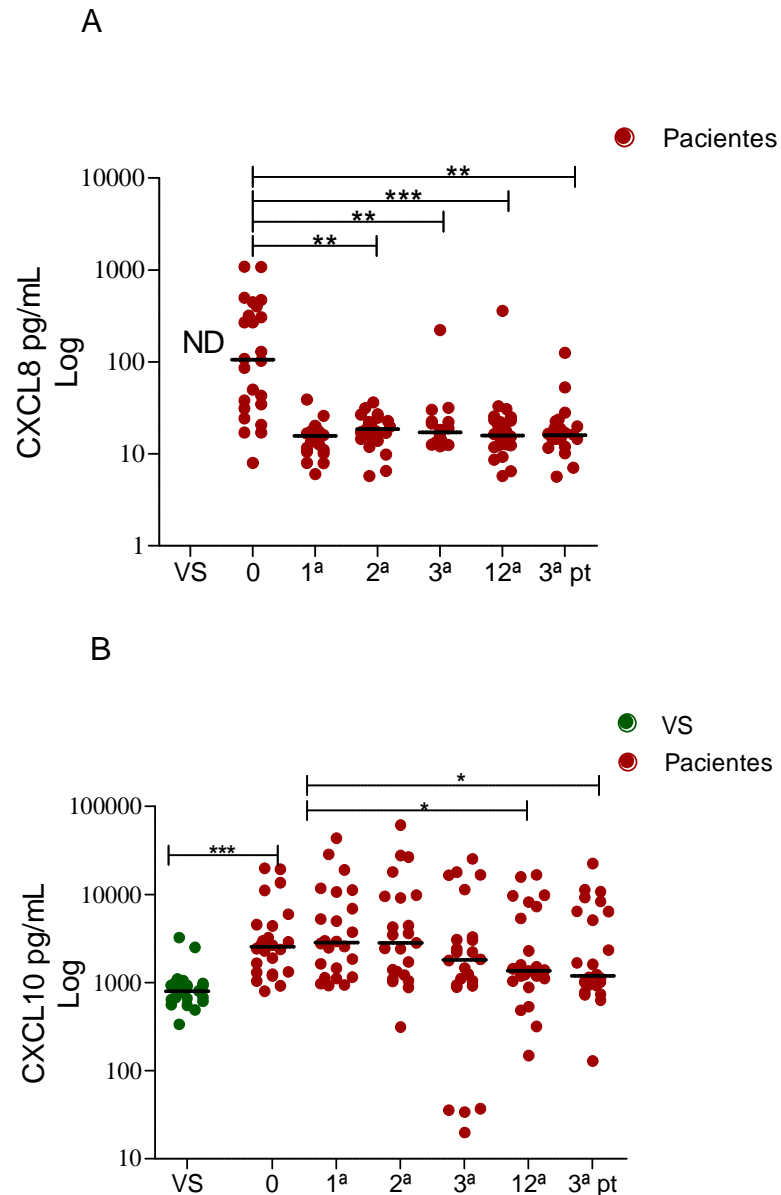
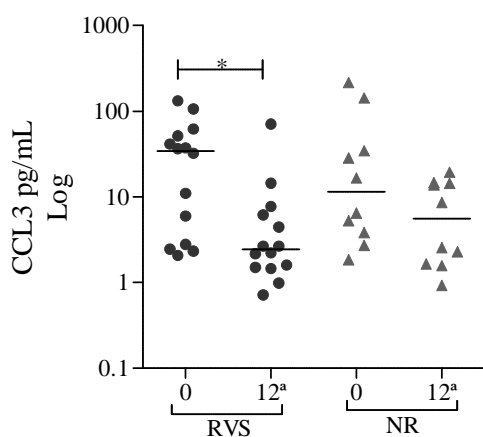


Figura 28. Níveis séricos das quimiocinas dos voluntários sadios e dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α . Quantificação de citocinas no soro de voluntários sadios (VS) e dos pacientes tratados com Peg-IFN α /RBV, nos tempos 0, 1^a, 2^a, 3^a, 12^a semanas durante o tratamento e 3^a semana pós-tratamento. A) CXCL8; B) CXCL10 Foi utilizado teste estatístico Kruskal-Wallis para as análises (*P<0,01, **P<0,001, ***P<0,0001).

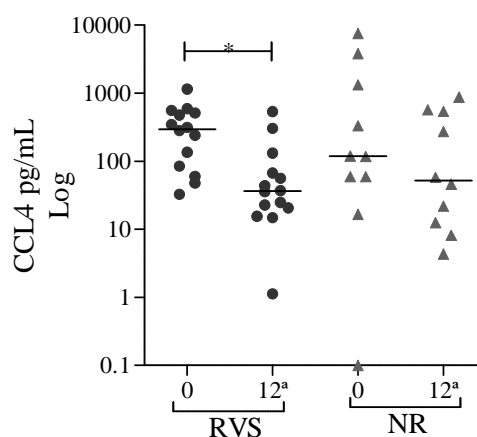
4.7 Níveis de CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10 estão relacionados à resposta ao tratamento.

Notavelmente, houve diferenças na produção sérica das quimiocinas, agrupando pacientes com níveis altos e baixos, e, portanto, foi avaliado a relação desta quimiocinas com o desfecho do tratamento. Os níveis das citocinas foram analisados em 0 e 12^a semana de tratamento, visto que esse é o tempo que define a resposta virológica precoce (RVP), um fator preditivo de prognóstico entre respondedores e não respondedores. Diferenças significativas entre as seguintes quimiocinas foi observada: CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10, figura 29. Níveis altos de CCL3 e CCL4 em pacientes com RVS antes do tratamento e um declínio na 12^a semana, $P=0,01$ e $P=0,02$ respectivamente (figuras 29A e B). A quimiocina CCL5 apresentou um aumento após o tratamento e a diferença significativa entre os tempos foi maior nos pacientes não respondedores ($P<0,0001$) do que nos pacientes com RVS ($P<0,001$), figura 29C. Devido ao perfil do nível de CXCL10 durante o tratamento, avaliamos os tempos antes e na 1^a semana de tratamento, pacientes não respondedores apresentaram maior produção de CXCL10 na primeira semana de tratamento com valor de $P=0,028$, figura 29D. Sendo assim, CCL3, CCL4 e CXCL10 podem ser considerados bons biomarcadores de resposta ao tratamento.

A



B



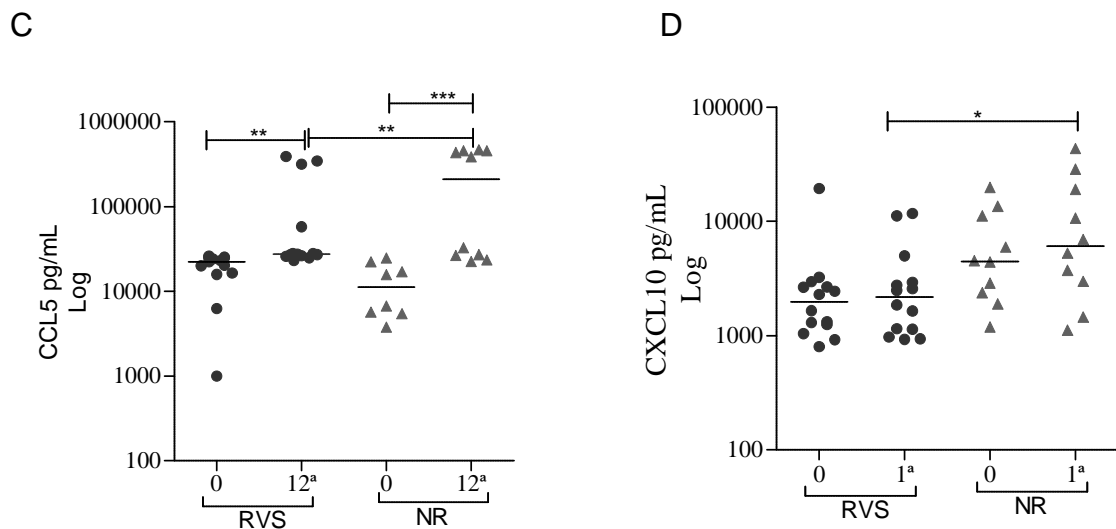


Figura 29 Diferença nos níveis das quimiocinas estratificados por RVS e NR. Quantificação de quimiocinas em soro dos pacientes tratados com Peg-IFN α /RBV, estratificados pela resposta virológica sustentada (RVS) e não resposta (NR). Nos tempos 0 e na 12^a semana do tratamento para A) CCL3; B) CCL4; C) CCL5 e tempo 0 e na 1^a semana de tratamento D) CXCL10. Teste Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de dunn's (*P<0,01, **P<0,001, ***P<0,0001).

4.8 Avaliação funcional dos polimorfismos em relação aos níveis de citocinas séricas.

Visando compreender o papel funcional dos SNPs da região do *IFNL3* e *IFNL4*, decidimos investigar o perfil dos níveis das citocinas em relação aos genótipos do polimorfismo rs12979860, por ser o mais forte preditor. De modo geral foi observado que em pacientes com genótipo CC-rs12979860, os níveis séricos das citocinas são menores do que em pacientes com alelo de risco (CT ou TT). Já para os níveis séricos dos IFN- α , que não apresentaram diferença entre pacientes tratados com IFN α -2a ou IFN α -2b, foi observado maior nível de IFN- α nos pacientes homocigotos CC em relação ao TT, com diferença significativa na 12^a semana de tratamento (figura 30A), porém, não ficou caracterizado nesta coorte que a modulação dos níveis séricos de IFN- α influencia na obtenção de RVS, figura 30B.

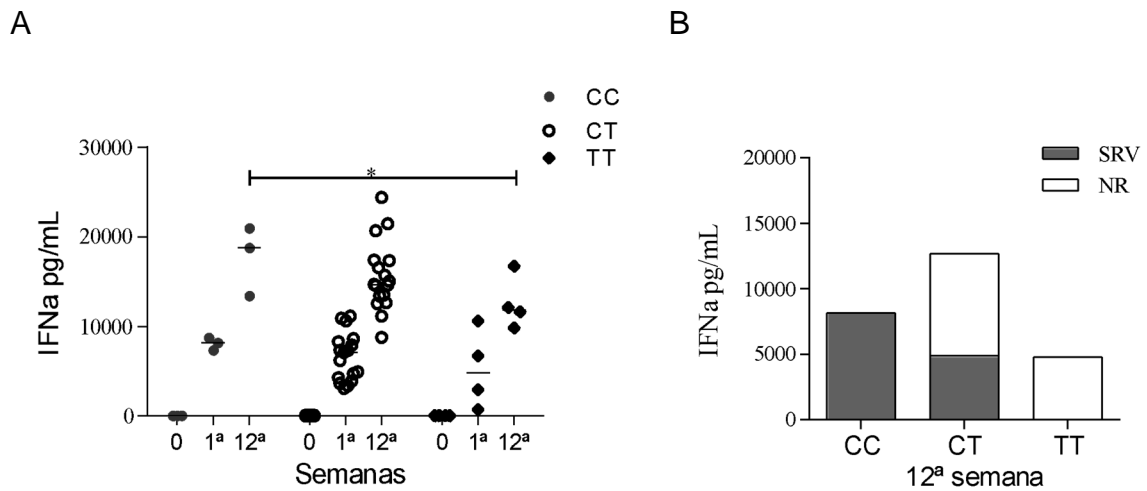


Figura 30. Níveis séricos de IFN- α dos pacientes com HCC estratificados pelos genótipos do SNP rs12979860 e o desfecho do tratamento. Quantificação dos níveis IFN- α , de amostras do soro de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV nos tempos 0, 1ª e 12ª semana de tratamento. A) estratificado pelos genótipos do rs12979860; B) estratificado por pacientes que obtiveram RVS e NR, agrupados pelo genótipo, tempo 12ª semana de tratamento. Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (* $P < 0,05$).

Os níveis séricos de CCL4 mostraram diferença significativa quando comparados os genótipos CC <CT e CC <TT ($P < 0,001$) no grupo de pacientes antes do tratamento (figura 31B). Esses dados sugerem que o genótipo preditor (CC) parece regular a produção desta quimiocina, visto que dos pacientes com alelo de risco (T) apresentava níveis mais altos do CCL4. Apesar do número pequeno de pacientes homocigoto (CC), confirmamos este dado, quando observado o mesmo perfil de modulação no grupo controle com genótipo preditor (figura 31A). Os níveis baixos CCL4 estão relacionados a RVS, visto que, esses respondedores, carreadores do alelo C, apresentaram níveis menores de CCL4 antes do tratamento (figura 31C).

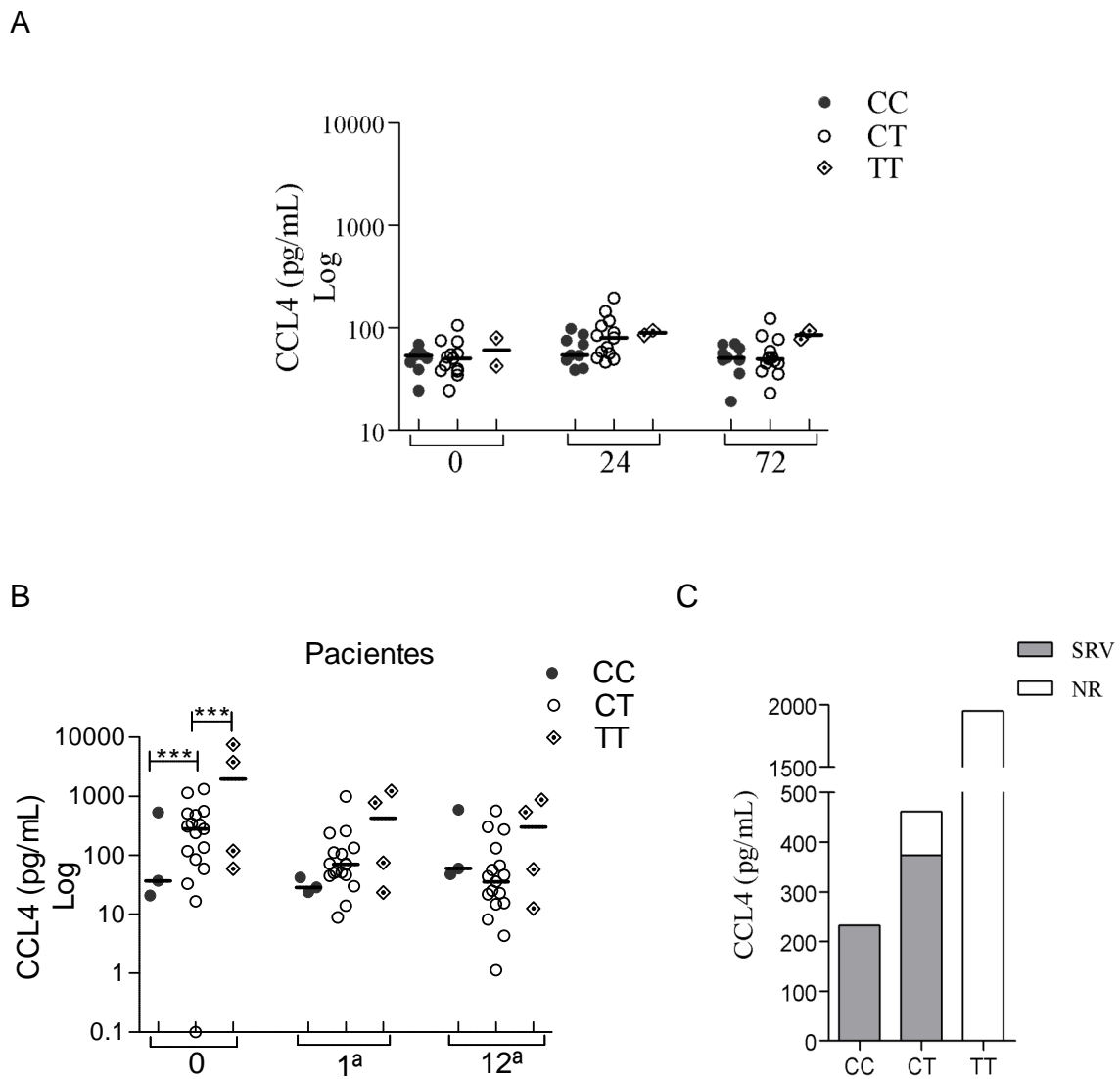


Figura 31. Níveis séricos de CCL4 estratificados por genótipos para rs12979860. Quantificação da quimiocina de CCL4 em soros de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -/RBV, tempos 0, 1^a e 12^a semana de tratamento e amostras dos voluntários sadios nos tempos 0, 24 e 72h após administração de uma dose de Peg-IFN α . A) voluntários sadios; B) em pacientes com HCC e C) níveis séricos CCL4 antes do tratamento em pacientes que obtiveram RVS ou NR. Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (**P<0,0001).

Em relação ao CXCL10, 24 horas após a administração do fármaco, todos os genótipos apresentaram aumento nos níveis de CXCL10. Porém, homocigoto alelo (C) apresentou menor incremento, onde foi observada diferença significativa entre o genótipo CC e CT com $P < 0,01$ (figura 32A). Os resultados demonstrados em voluntários sadios confirmam o efeito fenotípico de modulação do SNP rs12979860-CC nos níveis de CXCL10. No grupo de pacientes, foi observado níveis baixos de CXCL10 no genótipo CC, com uma diferença significativa entre o genótipo CC <CT e CC <TT ($P < 0,05$), na primeira semana de tratamento. Foi observado um efeito de

modulação nos níveis de CXCL10 em pacientes com genótipo CC favorável, pois os níveis de CXCL10 permaneceram os mesmos durante o tratamento. O grupo dos pacientes não respondedores apresentaram maior nível de CXCL10 antes do tratamento e uma leve diminuição dessa citocina durante a primeira semana (figura 32B). A modulação do CXCL10 pode ser correlacionada com o resultado favorável da terapia genotípica, uma vez que os níveis mais elevados de CXCL10 foram encontrados em pacientes com alelos de risco, associados ao desfecho de não-respondedores, como mostrado na figura 32C.

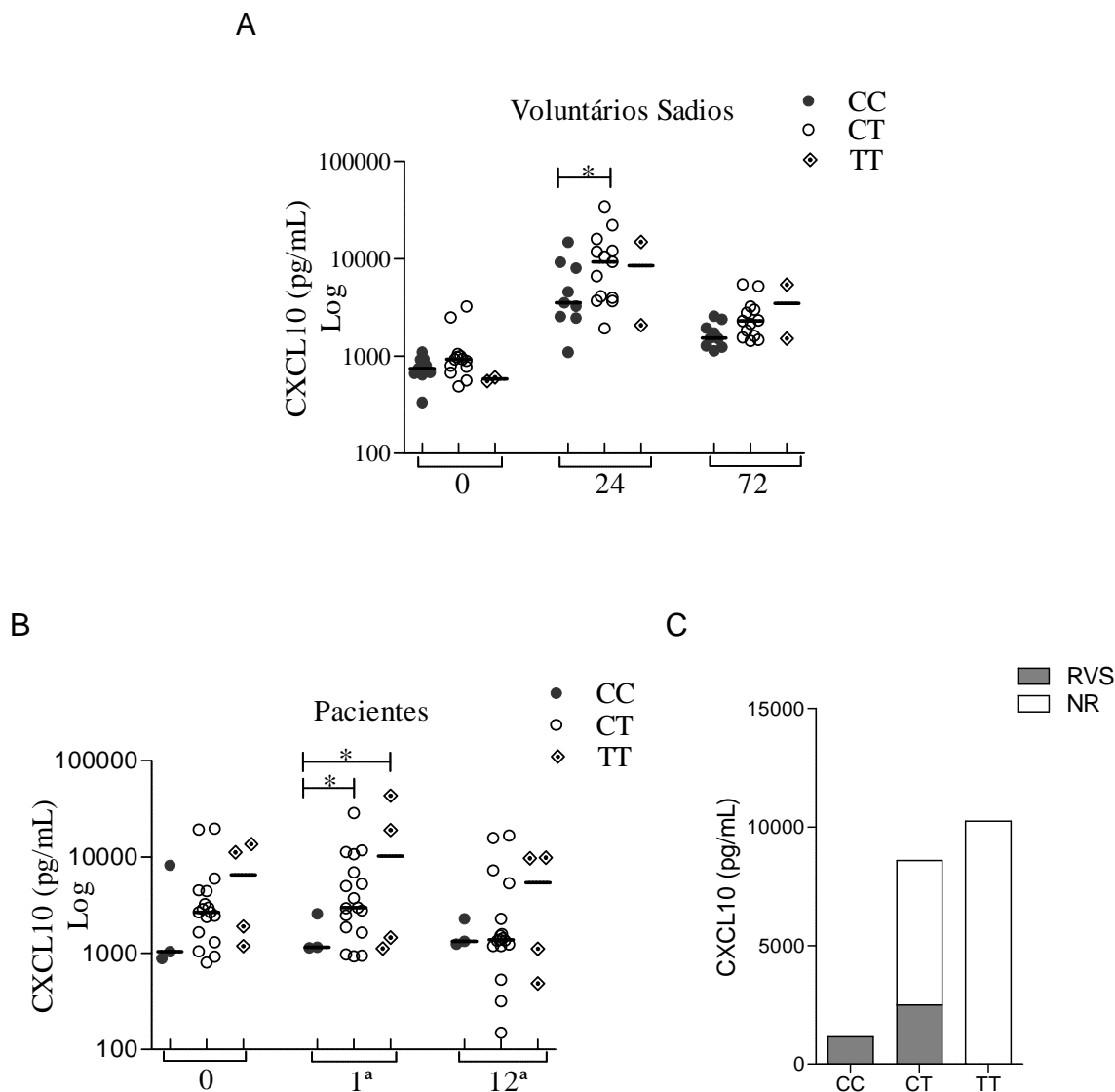


Figura 32. Níveis séricos de CXCL10 estratificados por genótipos para rs12979860. Quantificação da quimiocina de CXCL10 nos soros de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -/RBV, tempos 0, 1^a e 12^a semana de tratamento e amostras dos voluntários sadios nos tempos 0, 24 e 72h após administração de uma dose de Peg-IFN α . A) voluntários sadios; B) em pacientes com HCC e C) níveis séricos CXCL10 da 1^a semana de tratamento em pacientes que obtiveram RVS ou NR. Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (*P<0,05).

4.9 Avaliação dos níveis de expressão gênica do *IFNA1*, *IFNL3* e *IFNL4*

Foram avaliados no sangue periférico os níveis de expressão gênica das citocinas IFN α e IFN- λ e, curiosamente, níveis mais altos do *IFNA1* foram encontrados nos voluntários sadios quando comparados aos pacientes com HCC (figura 33B). Foram encontrados níveis altos de RNAm de *IFNLA1* antes da administração do biofármaco no grupo de voluntários sadios com um sutil aumento após administração do fármaco e diminuição após 72h dos níveis de *IFNA1* com diferença significativa entre os tempos (figura 33A). Entretanto, a expressão de *IFNA1* dos pacientes tem um aumento na primeira semana do tratamento e diminui na 12^a semana e 3^a pós-tratamento, figura 33B.

Em contrapartida, não foi detectado aumento na expressão gênica dos *IFNL1*, 2, 3 e 4 nas amostras dos voluntários sadios e os IFNL λ -1 e 2 não foram detectados nas amostras de pacientes com HCC. Pacientes com HCC apresentaram aumentos nos transcritos de RNAm tanto de *IFNL3* quanto de *IFNL4* no tempo 0 e os níveis foram diminuindo ao longo do tempo (figuras 34A e B), estes níveis foram mais altos do que os níveis do *IFNA1*. O *IFNL3* apresentou diferença significativa tempo 0 > 12^a > 3^apt (P<0,0001), 1^a>12^a semana (P<0,01), figura 34A. Já *IFNL4* apresentou diferença significativa entre a 1^a>12^a (P<0,05) e 1^a>3^apt (P<0,0001), demonstrando o efeito induzido pelo biofármaco, figura 34B. Na avaliação do polimorfismo do rs12979860, em relação os genes *IFNL3* e *IFNL4* não foi observado diferença significativas entre os genótipos preditores CC e o de risco TT, apresentando diferença significativa entre os pacientes heterozigotos antes do tratamento e na 12^a de tratamento, como mostra as figuras 34C e 34D.

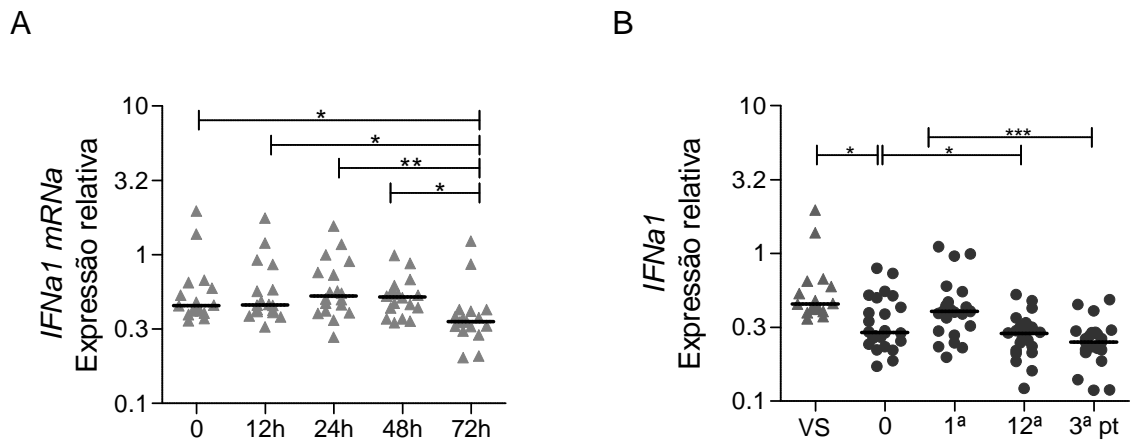


Figura 33 Níveis de expressão gênica mRNA do *IFNA1*. Quantificação da expressão do gênica do *IFNA1* a partir de sangue total de voluntários saudáveis nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 horas após administração de uma dose do Peg-IFN α e de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV, tempos 0, 1^a e 12^a semana de tratamento e 3^a semana pós-tratamento. A) voluntários saudáveis (n=18); B) paciente com HCC (n=24) e tempo 0 dos voluntários saudáveis (VS). Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (*P<0,01, **P<0,001, ***P<0,0001).

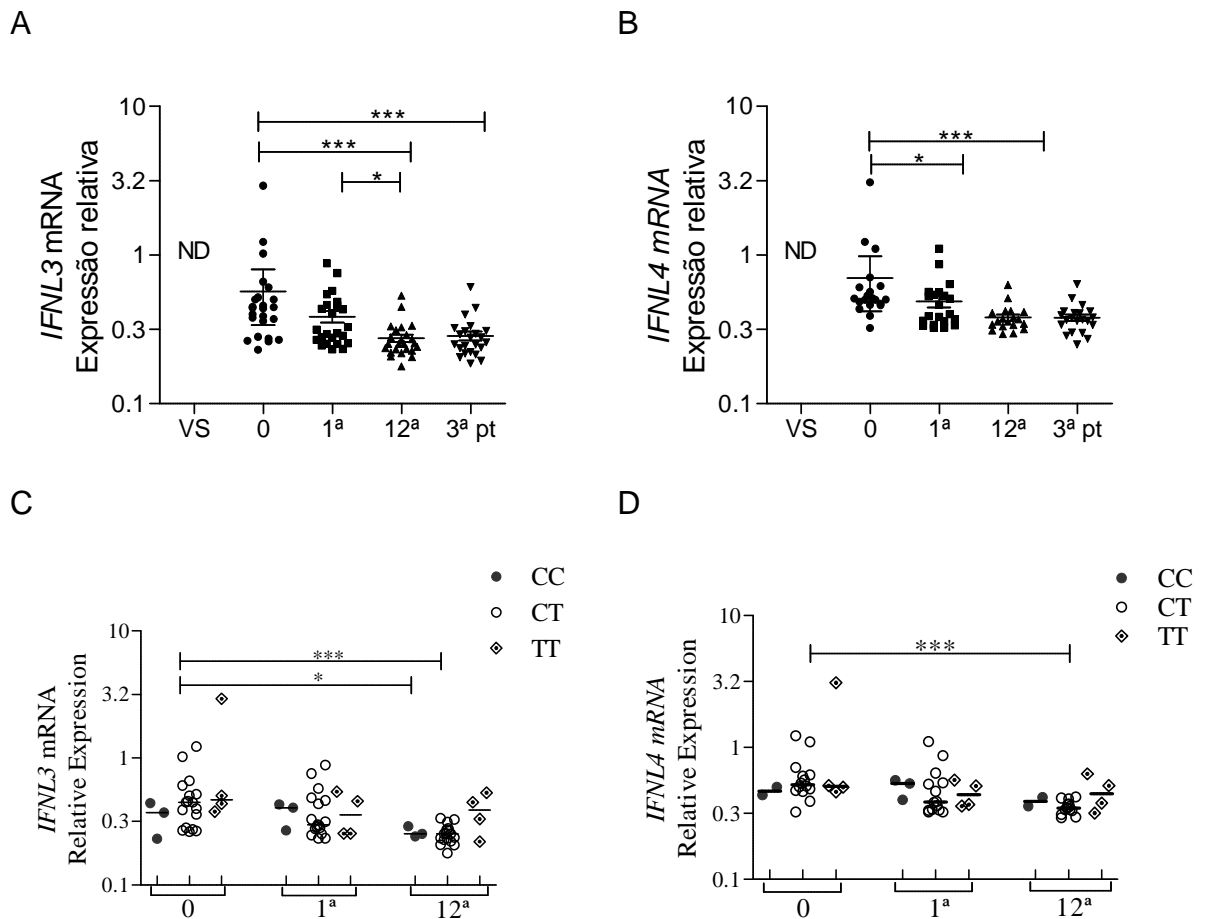


Figura 34. Níveis de expressão gênica dos genes *IFNL3* e *4*. Quantificação da expressão do genica do *IFNL3* e *4* a partir de sangue total de pacientes com HCC (n=24) tratados com Peg-IFN α /RBV, tempos 0, 1^a, 12^a semana de tratamento e 3^a semana pós-tratamento. A) *IFNL3*; B) *IFNL4*; e estratificado pelos genótipos do rs12979860, C) *IFNL3* e D) *IFNL4*. Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (*P<0,01, **P<0,001, ***P<0,0001)

4.10 - Avaliação dos níveis de expressão gênica da assinatura genica da via de sinalização do IFN tipo I.

O desfecho do tratamento dos pacientes com HCC está relacionado direta e indiretamente nos níveis de expressão genica de citocinas e ISGs antes e ao longo do tratamento. Devido ao número pequeno de amostras avaliadas, fizemos análises exploratória de dados somente dos genes com perfil pró-inflamatório, regulatórios e da via do interfeiron tipo I. Foram avaliados os genes *IFNAR*, *STAT2*, *STING* *TICAM1*, *TBK1*, *TBX21* *IRF3*, *IRF7*, *IRF9*, *IFI6*, *IFI35*, *IFIH1*, *IFIT1*, *IFIT2*, *IFIT5*, *IFITM1*, *IFITM3*, *IFI6*, *IFI16* *IFI35*, *IFI44*, *IFIH1*, *RIG-I*, *RNASEL*, *ISG15*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *OASL*, *CXCL10*, *SOCS3* (os nomes das abreviações estão descritos na lista das siglas).

A análise da expressão gênica de citocinas no sangue periférico entre os tempos 0, 1^a e 12^a semana de tratamento, 3^a semana pós-tratamento, a maioria apresentou altos níveis expressos antes do início do tratamento, com exceção dos genes *IFNA1*, *IFNAR* e *IFHI* (figura 35). De modo geral, apresentaram um declínio na primeira semana de tratamento, com um leve aumento nos tempos 12^a semana e 3^a pós-tratamento, demonstrando diferença significativa ($P < 0,05$) entre o tempo 0 e os tempos 1^a 12^a utilizando o teste one-way ANOVA Kruskal-wallis, e teste Dunn's para comparações múltiplas.

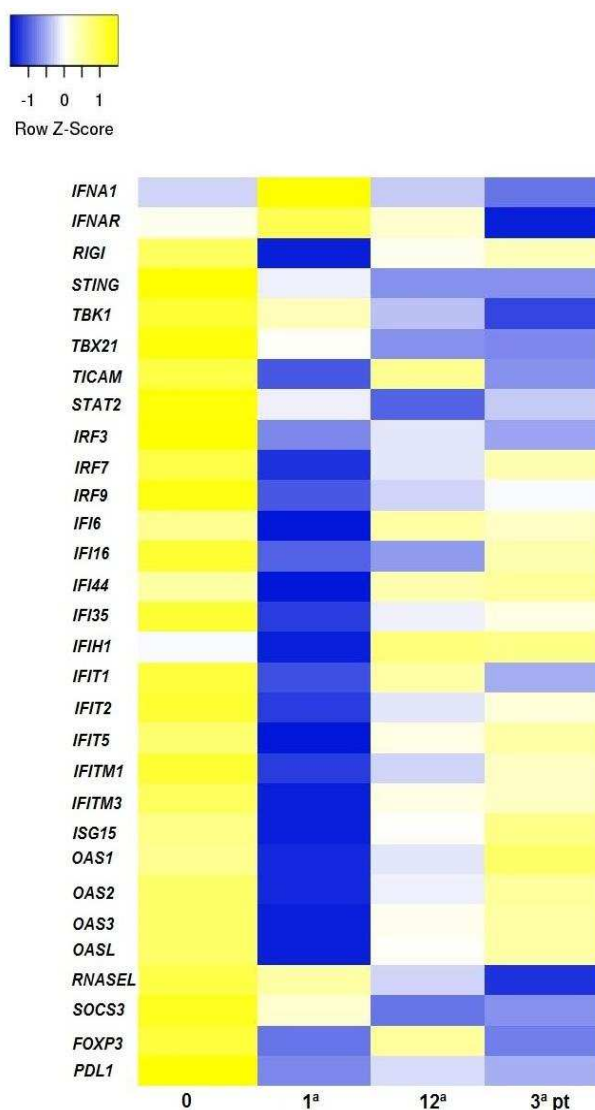


Figura 35. Gráfico Heat map (gráfico de calor) do perfil de expressão dos genes da via do interferon tipo I. Quantificação da expressão dos genes da via de sinalização do IFN tipo I a partir de sangue total em pacientes com HCC (n=24) tratados com Peg-IFN α /RBV, tempos 0, 1ª, 12ª semana de tratamento e 3ª semana pós-tratamento. Representando a mediana dos valores normalizados.

Na avaliação entre pacientes com HCC respondedores e não respondedores, os genes *IFI44*, *IFITM1* e *OAS1* apresentaram níveis mais altos em não respondedores do que os pacientes o RVS, sugerindo que a regulação negativa de genes relacionadas com bom prognóstico, (figura 36). Por outro lado, observou-se a regulação positiva dos genes *IFI6*, *IFIH1*, *RIGI* e *RNASEL* antes do tratamento em pacientes que evoluem favoravelmente com o RVS. Os níveis da expressão destes genes entre os diferentes biofármacos, Peg-IFN α 2a e 2b não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (figuras 36 e 37).

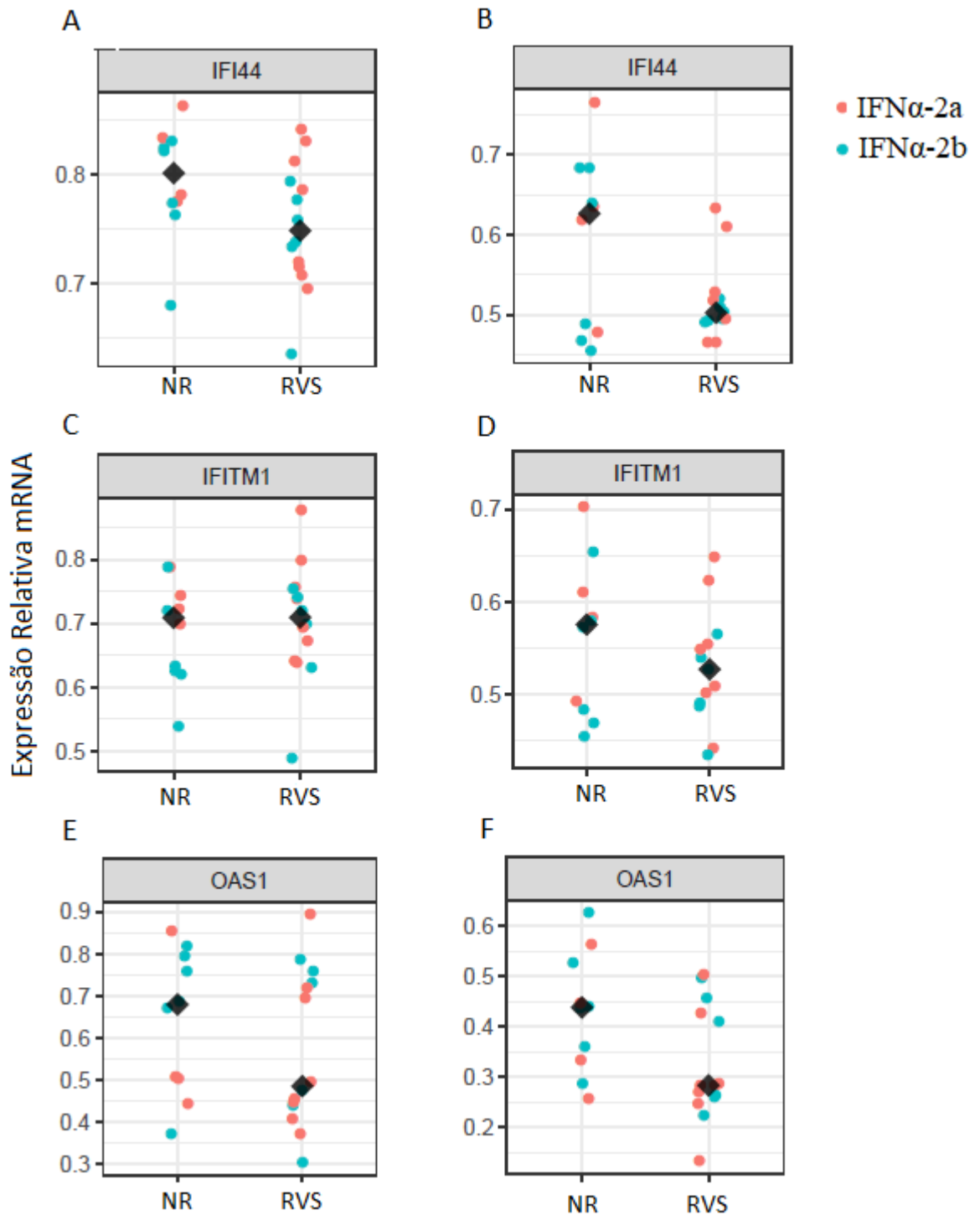


Figura 36. Perfil de expressão relativa de mRNA de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -2a/2b, entre respondedores e não respondedores. Quantificação da expressão dos genes da via de sinalização do IFN tipo I a partir de sangue total de pacientes com HCC (n=24) tratados com Peg-IFN α /RBV, tempos 0, 1^a semana de tratamento. Apresentando níveis mais altos entre os não respondedores. A) *IFI44*; B) *IFITM1* e C) *OAS1*- tempo 0; B) *IFI44*, D) *IFITM1* e F) *OAS1* – tempo 1^a semana de tratamento.

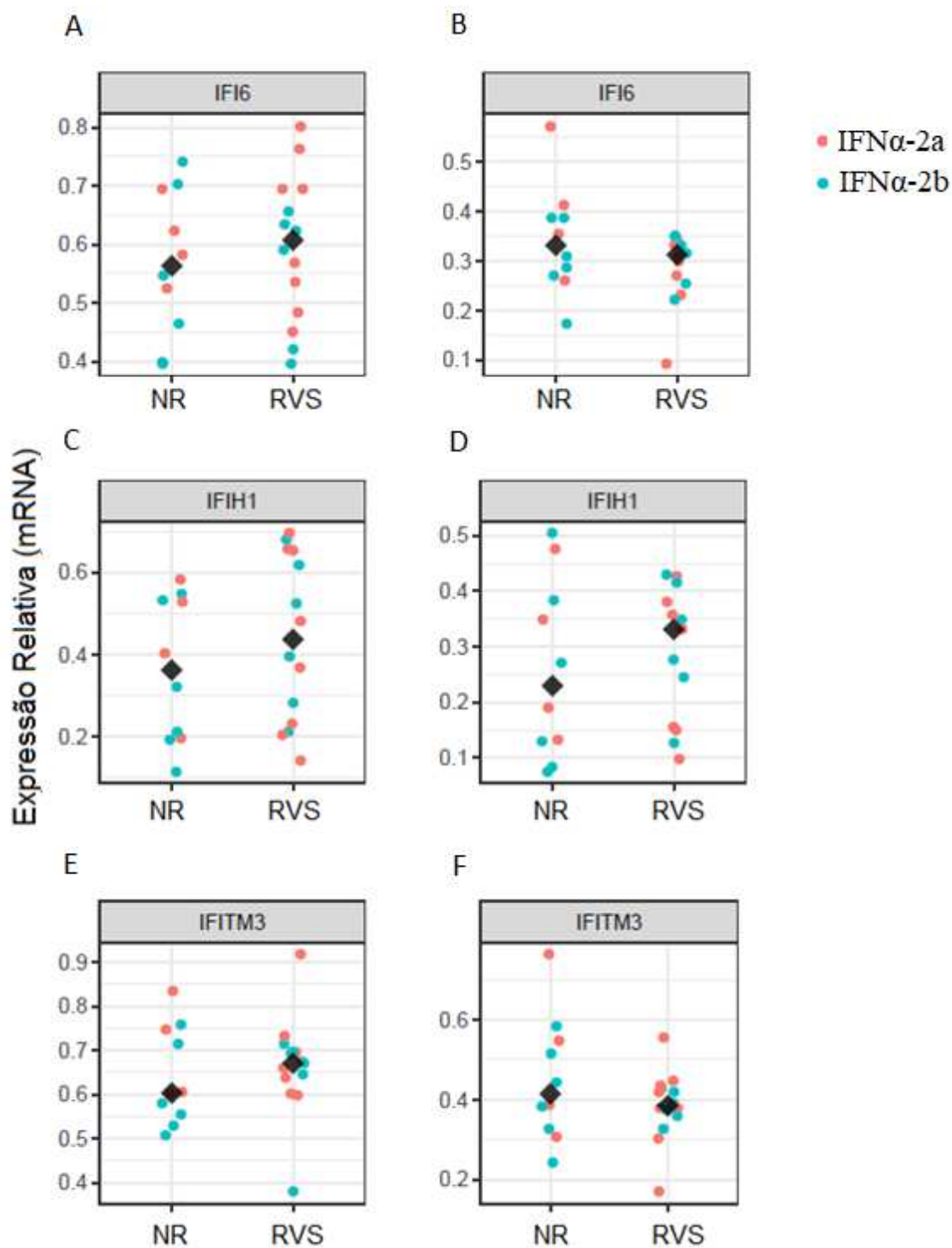


Figura 37. Perfil de expressão relativa de mRNA de pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α -2a/2b, entre respondedores e não respondedores. Quantificação da expressão dos genes da via de sinalização do IFN tipo I a partir de sangue total de pacientes com HCC (n=24) tratados com Peg-IFN α /RBV. A) IFI6; B) IFIH e C) IFITM3 – tempo 0; B, D e F – tempo 1^a semana de tratamento.

Foi ainda analisado a relação do polimorfismo rs12979860 com os níveis de expressão gênica durante a primeira semana de tratamento que mostrou diferença significativa entre os genótipos. Pacientes homozigotos alelo (C) apresentaram níveis

mais baixos do que os pacientes com alelo de risco (T) para os genes *IFI6*, *IFI16*, *IRF9* e *RIGI* com $P < 0,05$, figuras 38A, B, D e E. Enquanto que, os níveis dos genes *IFIH1* e *RNASEL* foram sutilmente mais altos para pacientes com genótipo CC, figura 38C e F.

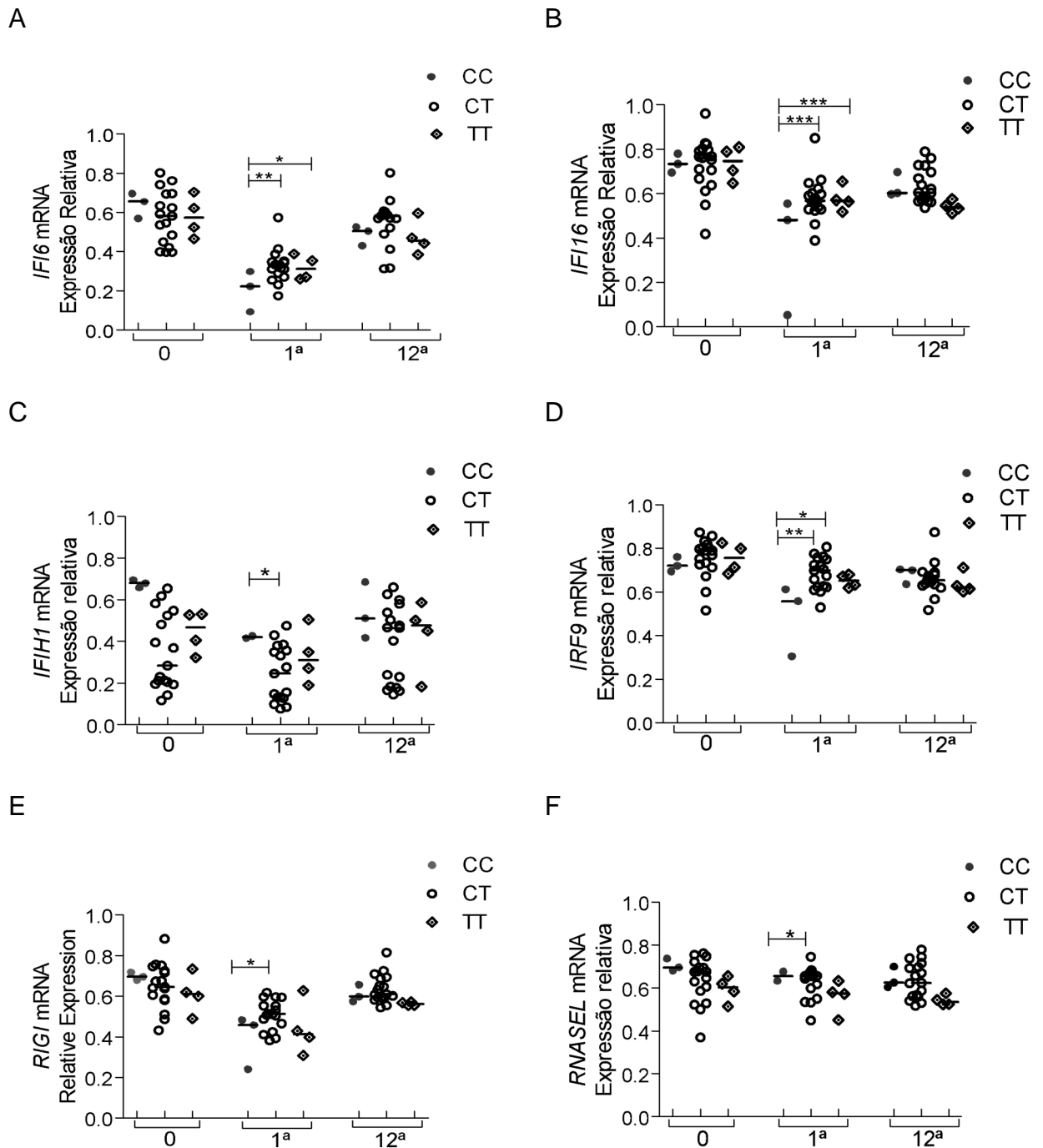


Figura 38. Níveis de expressão genes da via de sinalização do IFN tipo I dos pacientes com HCC tratados com Peg-IFN α + RBV estratificados pelo genótipo SNP rs12979860. Quantificação da expressão dos genes da via de sinalização do IFN tipo I a partir de sangue total de pacientes com HCC (n=24) tratados com Peg-IFN α /RBV no s tempos 0, 1^a e 12^a semana de tratamento. A) *IFI6*; B) *IFI16*; C) *IFIH1*; D) *IRF9* e E) *RIGI* e F) *RNASEL*. Teste Kruskal-wallis e Dunn's teste de comparações múltiplas (* $P < 0,01$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$).

5- DISCUSSÃO

A demonstração de que os SNPs regulam as respostas à terapia antiviral é uma característica dos estudos de GWAS que buscam marcadores preditivos altamente precisos e econômicos. Os SNPs da região IFN- λ estão relacionados à resposta ao tratamento da HCC, bem como sua relação com a eliminação espontânea do HCV (76,91). Anteriormente, foram descritos fatores demográficos e clínicos como preditores associados à resposta terapêutica antiviral, entretanto, estudos relatam o polimorfismo na região do *IFNL3* como sendo considerados os mais fortes preditores associados ao desfecho do tratamento da HCC (106).

Este é o primeiro estudo que engloba um número maior de SNPs da região do *IFNL3* E *IFNL4* entre os brasileiros, que tem uma arquitetura genética caracterizada por uma mistura de três linhagens paternas, formadas por ancestrais Ameríndios, Europeus e Africanos, com distribuição heterogênea dentro das regiões do país. A maioria dos estudos de associação de variantes do gene *IFNL3* em pacientes brasileiros com HCC tratados com Peg-IFN α /RBV são focados nos polimorfismos rs12979860 e rs8099917, onde os genótipos CC ou TT, respectivamente, apresentam forte associação a desfechos favoráveis (107–110). Contudo, vários SNPs das regiões IFN- λ tem sido associados com a resposta ao tratamento com terapia baseada no IFN- α como, rs8105790, rs11881222, rs8103142, rs28416813, rs4803219, rs10853727, rs8109886 rs8099917 e rs7248668 e rs12980275 (85–87).

Curiosamente o impacto de variantes genéticas na região do IFNL sob as taxas de RVS é maior em europeus quando comparado a africanos em pacientes infectados com HCV. Com a descrição do locus de IL-28B (*IFNL3* E *IFNL4*) e especialmente o genótipo rs12979860-CC a precisão da taxa de resposta ao tratamento por IFN- α e a resolução da infecção pelo HCV entre indivíduos de ascendência Europeia e Africana foi entendida. Os carreadores de T, que são os alelos com mau prognóstico, apresentam maior frequência em Africanos (76,91) e por isso, pacientes com ascendência europeia apresentam taxa de RVS três vezes maior do que afro-americanos e duas vezes mais na população hispânica (91). O alelo C é o mais comum na população mundial com exceção na população Africana (85). No Brasil, o genótipo CC em rs12979860 tem diferentes frequências no nordeste (24%), sudeste (32%) e sul (35%). Por outro lado, o genótipo TT de maior risco apresenta maior frequência na região do nordeste em torno de 21%, seguido por 18% e 11%, sudeste e sul, respectivamente (107,108,111). Estes dados estão alinhados com o relato cujo

marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) de ascendência africana foi significativamente maior na região nordeste em relação ao sudeste (108). Em nossa coorte, observamos uma frequência de CC (30%), CT (53%) e TT (16%), apresentando um LD similar aos ameríndios e europeus. Confirmando, o esperado pois a maioria dos indivíduos estudados foram provenientes da região sul.

No presente estudo corroboramos os dados publicados, confirmando a associação de vários SNPs e que o rs12979860 é o mais forte preditor na obtenção de RVS dos pacientes tratados com Peg-IFN α . Contudo, o SNP rs8109886-CC apresentou maior taxa de RVS entre os pacientes, este efeito pode ser explicado pelo fato de que todos os pacientes rs8109886-CC carregavam os genótipos preditores rs12979860-CC e rs8099917-TT, amplificando o efeito fenotípico deste SNP. Assim, identificamos o polimorfismo rs8109886-CC tão forte quanto rs12979860, e mais forte do que o rs8099917, em prever a RVS em esquemas de tratamento baseados em interferon alfa. Visto que, o genótipo de menor frequência do rs8109886-CC identifica especificamente o haplótipo (CCT) favorável na obtenção de RVS, amplificando o efeito fenotípico deste SNP. Demonstrando que o SNP rs8109886 é um importante marcador na população brasileira, sua identificação pré-tratamento pode ser usada como estratégia para personalizar o tratamento dos pacientes infectados pelo VHC, os quais forem indicados para terapia com Peg-IFN α /RBV, individualmente ou juntamente com rs12979860 e rs8099917. Sendo assim, estes três SNPs rs12979860, rs8109886 e rs8099917 podem ser considerados etiquetas SNPs (tagSNPs) representativos desta região, que podem fornecer informações suficientes sobre outros SNPs que não necessariamente precisam ser genotipados. A combinação entre os genótipos preditores destes SNPs aumentou a taxa de cura e consequentemente obteve um bom prognóstico, contribuindo para identificar com maior probabilidade os pacientes capazes de alcançar a RVS no tratamento de HCC com Peg-IFN α , além de agregar conhecimento aos dados existentes da população brasileira.

Foi abordado o efeito da combinação genotípica entre estes três SNPs, a taxa de RVS foi acima de 80% em pacientes com alelos preditores dos polimorfismos rs12979860, rs8109886 e rs8099917, CC-CC-TT e CC-AC-TT, respectivamente, aumentando a chance de predição. Fatores preditivos estão associados ao prognóstico desfavorável a terapia com Peg-IFN α , como: GT1, sexo masculino, fibrose hepática avançada, co-infecções, resistência à insulina, baixa adesão ao

tratamento, alta carga viral e ascendência africana. No entanto, a cinética viral, a presença de cirrose hepática e o GT3 são fatores que influenciam as taxas de RVS na terapia com AADs (112). Em seguida, esses marcadores genéticos, possivelmente em conjunto com outros fatores preditivos, poderiam ser usados para otimizar os regimes de tratamento e a duração em contextos com recursos limitados, aumentando a eficácia e as chances de RVS. Portanto, é de grande importância a inclusão do rs8109886 no ensaio de PCR em tempo real de detecção simultânea dos SNPs rs12979860 e rs8109917 (113). Como descrito neste estudo, a taxa de RVS para GT1 foi de 86% e para GT2/3 de 84%, em pacientes com combinação de variáveis preditivas. Sendo assim, a terapia personalizada pode melhorar a taxa de RVS e diminuir os eventos adversos. Interessante ainda que, estudos têm mostrado que os polimorfismos na região do IFN- λ também estão associados com o desfecho do tratamento de paciente com HCC tratados com os inibidores de proteases, os AADs, (112), apresentando assim a possibilidade de diminuir o tempo da administração dos AADs em pacientes homocigotos do alelo C (rs12979860) (114), gerando assim uma substancial economia para a Saúde Pública.

Os genes *IFNL3* e *4* codifica as proteínas IFN- λ 3 e 4, que pertencem a família de interferon tipo III caracterizada por uma poderosa atividade antiviral. É bem conhecido por sua capacidade de controlar a replicação viral pela ativação de vias de sinalização celular que induz ISGs (95), ambas proteínas IFN- λ 3 e IFN- λ 4 estimulam o mesmo conjunto de ISGs (115). Estão relacionados a promover resposta antiviral contra vários patógenos humanos, incluindo os vírus da hepatite B e da imunodeficiência humana. Também foi demonstrada a capacidade do IFN- λ na inibição da replicação do DENV-2 (116). Além disso, foi descrito que fetos de camundongos fêmeas com ausência de sinalização IFN tipo III aumentaram a replicação do ZIKV na placenta e no feto quando infectados no final da gestação. Reciprocamente, o tratamento de camundongos grávidas com IFN- λ 2 reduziu a infecção pelo ZIKV (117).

Curiosamente, nenhum desses três SNPs (rs12979860, rs8109886 e rs8099917) estão localizados na região codificadora do *IFNL3* ou *4*, e o mecanismo pelo qual essa variante afeta a resposta às terapias do HCV ainda não está claro. As variantes genéticas não-codificadoras podem ter efeitos funcionais impactados pela estrutura do RNA, podendo ser regulado por variante próximo ou distante do gene.

Os SNPs rs368234815 e rs117648444, são descritos como os SNPs funcionais desta região localizados na região exônica do *IFNL4* (85,93). Contudo, o forte LD observado em muitas populações na região do *IFNL*, dificulta a identificação das reais variantes funcionais responsáveis pelos fenótipos. O alelo rs368234815-ΔG, que cria um quadro de leitura aberta para um novo interferon humano, o IFN-λ4, está associado à diminuição da capacidade de eliminação do HCV, conseqüentemente uma menor taxa de RVS (85). Enquanto que, rs117648444 apresenta uma substituição de um aminoácido na proteína do IFN-λ4, alterando uma prolina para uma serina (P70S) com substancial modificação na atividade antiviral do IFN-λ4 (85), o polimorfismo rs117648444-IFNλ4-S70 foi associado a uma maior taxa de RVS (93).

Recentemente, o SNP rs12979860 foi descrito estar localizado na região intrônica do novo IFN tipo III designado *IFNL4* e 367 pares de bases de uma variante dinucleotídica funcional (rs368234815, anteriormente descrito como ss469415590; *IFNL4*-TT/ΔG) localizado dentro do primeiro exon *IFNL4*, possui um forte LD com estes três polimorfismos funcionais (rs368234815, rs117648444 e rs4803217) menos na população africana, embora esses dados careçam de replicação independente (93,115). Outro estudo descreve que o rs4803217 influencia na regulação da eficiência da tradução de mRNA pela *IFNL3* 3'UTR em células HeLa, possivelmente alterando funcionalmente as AREs (118). Estudos de análise epigenética no IFN-λ3 mostraram que em indivíduos infectados pelo VHC GT1, rs12979860 genótipos C/C tinham níveis de metilação mais baixos em relação a C/T ou T/T, conseqüentemente, rs12979860-CC teriam uma atenuação na expressão gênica pela inibição da transcrição. No entanto, nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de metilação do IFNλ-3 e expressão de mRNA no sangue periférico, mas o autor sugeriu que a metilação pode regular um gene diferente naquela região (119).

O sistema imunológico de pacientes com HCC permanece em constante atividade para controlar a infecção, apresentando assim níveis séricos altos de citocinas pró-inflamatória e regulatórias, algumas destas quimiocinas foram identificadas como biomarcadoras (120). Similar aspecto fenotípico foi observado antes do tratamento neste estudo, níveis altos de citocinas e quimiocinas do perfil de resposta imunológica Th1 e Th2. A quimiocina CCL5 é comumente induzida por macrófagos e células de Kupfer em contato com VHC, atuando na ativação de moléculas inflamatórias e marcadores de fibrose nas células estreladas hepáticas, e podem desempenhar um papel significativo na inflamação hepática e na fibrose (121).

Neste estudo, alta produção de CCL5, foi observada em pacientes não respondedores a partir da 2ª semana de tratamento, sugerindo ser um biomarcador para progressão da doença hepática. Como demonstrado, em pacientes com doença hepática crônica e em modelo animal onde CCL5 e CCR5 estão super expressos, e com a deleção do CCL5 gerou diminuição de apoptose, a proliferação compensatória e a fibrogênese devido à redução da infiltração de células imunológicas (122).

Em relação as quimiocinas, CCL3 e CCL4, foi observado altos níveis séricos nos pacientes antes do tratamento e baixo nível na 12ª semana de tratamento foram associadas a RVS, sendo que a distribuição heterogênea dos níveis de citocinas demonstrou existir uma variável de confusão. Ao estratificarmos pelo genótipo do rs12979860, foi observado diferença significativa na concentração de CCL4 em pacientes homocigotos do alelo C que apresentaram efeito modulador, concluindo que níveis baixos desta citocinas estão associados com a RVS. Estes resultados corroboram com estudos que mencionam níveis séricos basais elevados dessas quimiocinas, associados à não resposta no soro e no fígado (123). Portanto, sugerimos o CCL4 como um forte biomarcador. Outro relato descreve níveis séricos altos de CCL4 antes do tratamento como o único fator que está independentemente associado à não resposta ao tratamento com terapia com IFN- α (111). Além disto, níveis baixos de CCL4 pré-tratamentos podem prever com segurança um resultado favorável do tratamento (124), de acordo com observado neste estudo.

Altos níveis da quimiocina CXCL10 também são associados à inflamação e patogênese da infecção crônica pelo VHC, assim como foram associados à falha do tratamento (125,126). O CXCL10 codifica uma proteína induzida por IFN- γ (IP-10), que é um fator quimiotático para neutrófilos. As quimiocinas CCL4 e CXCL10 são secretadas por vários tipos de células em resposta a IFNs, em especial CCL4, que desempenha um papel crucial no recrutamento de células T em sítios infectados promovendo inflamação e dano tecidual (127). Quimiocinas e seus receptores são centrais na inflamação hepática associada ao HCV (128), estando envolvidas na imunopatogênese da hepatite crônica (123). Os nossos resultados, demonstraram que baixos níveis de CXCL10 estão associados a obtenção da RVS. Sendo assim, sugerimos que CXCL10 também pode ser utilizada como biomarcadores na predição do sucesso do tratamento.

No presente estudo foi observado que indivíduos com genótipo rs12979860-CC mantiveram os níveis CCL4 e CXCL10 não alterados em relação ao tempo de

tratamento. Entretanto, na comparação entre os alelos preditivo e de risco, observou-se diferentes padrões de secreção dessas quimiocinas. De fato, os níveis destas quimiocinas podem prever um clareamento efetivo do HCV, indicando que o esse balanço está associado ao bom prognóstico (125,129). Observou-se que altas quantidades de CXCL10 foram associadas com a falta de resposta ao tratamento, e os níveis equilibrados de CXCL10 em pacientes indicaram alcance de RVS, como também foi visto este efeito de modulação nos níveis de CXCL10 nos voluntários sadios. Entretanto, estudos demonstraram que pacientes infectados pelo GT1 tratados com Peg-IFN α /RBV que há aumento dos níveis séricos basais de CXCL10, bem como uma resposta virológica bem-sucedida caracterizada por uma redução acentuada dos níveis de quimiocinas intra-hepáticas (120). Uma limitação no nosso estudo foi ter baixo número de pacientes nos subgrupos de homozigotos CC para rs12979860 e 8109886, o que reflete que existiu um viés de seleção positiva para o alelo desfavorável a rs12979860-T e 8109996-A em nosso coorte.

A resposta à terapia baseada em IFN α depende da expressão de ISGs em pacientes antes do início do tratamento e as variações próximas ao loci *IFNL3* (IL28B) se correlacionam com a indução do ISG no fígado (120). Um recente estudo analisou detalhadamente, a associação entre expressão hepática dos IFNs tipos I, II e III e os ISGs, confirmando que a expressão hepática do *IFNL2/3* e *IFNL4* é a principal responsável pela indução de ISGs na resposta à infecção pelo HCV (130).

Curiosamente, voluntários sadios apresentaram níveis mais altos de *IFNA1* do que os pacientes com HCC, sugerindo uma regulação negativa do gene *IFNA1* nesses indivíduos. Corroborando com os dados obtidos a partir de amostras de chimpanzés com infecção aguda, apresentando níveis mínimos de IFN- α no fígado e não detectáveis no sangue (77). Este fato, pode ser explicado pelas análises *in vitro*, utilizando células Huh-7.5 (linhagem celular de fígado humano) infectadas com HCV, que exibiu uma resposta antiviral ineficaz ao tratamento com IFN- α , enquanto que com IFN- λ produziu uma forte e sustentada resposta antiviral. Demonstrou-se que as células infectadas cronicamente induziram estresse do RE e autofagia que regulou negativamente o receptor do IFN tipo I (*IFNAR1*), mas não os receptores dos IFNs tipo II e III, resultando na sinalização JAK-STAT pelo IFN- α defeituosa. Podendo ser explicado, pelo fato, de que as células epiteliais do fígado expressam abundantemente IFN- λ e seus receptores (131).

Em acordo com os dados da literatura, os resultados encontrados neste estudo, sugerem que os ISGs da via de sinalização do IFN tipo I e III foram regulados positivamente pelos IFN- λ 3 e 4. Estudos demonstraram que um aumento na expressão de ISGs no fígado antes do tratamento do paciente responde mal à terapia com Peg-IFN α /RBV (120), enquanto que baixos níveis estão associados a uma resposta favorável ao tratamento. O alelo protetor correlaciona-se com uma menor expressão de ISGs e, naqueles com o alelo de risco, níveis mais baixos de IFN- λ 3 intra-hepático foram associados com maior expressão de ISG (Mx1 IFI44 e IFIT1) (88), corroborando com os níveis mais altos do IFI44, encontrados neste estudo, se relacionaram com indivíduos não respondedores. Visto em outro estudo o polimorfismo funcional da região do IFN- λ rs368234815- Δ G mostrou a correlação com altos níveis de ISGs e probabilidade de não responder ao tratamento com Peg-IFN α .

Estudos descrevem que pacientes com HCC apresentam níveis séricos mais baixos de IFN- λ 1 (IL29) do que em pacientes com HCA que obtiveram eliminação viral espontânea (132). Outro estudo, também descreveu níveis menores de IFN- λ 2 (IL28A) e IFN- λ 3 (IL28B) nos pacientes com HCC do que nos pacientes com eliminação viral espontânea. Devido a regulação na tradução de mRNA, diferenças sutis nos níveis do gene *IFNL3* como parte funcional do genótipos, relatadas em alguns estudos podem subestimar as diferenças reais nos níveis de proteína IFN- λ 3 (118,133). Enquanto que, pacientes com genótipos rs12979860-CC apresentaram maiores níveis de IFN- λ 1 e IFN- λ 3 do que pacientes com genótipo TT (96). Contudo, há dados divergentes na literatura em relação aos níveis desta citocina. Níveis IFN- λ 3 mais elevados estão relacionados com depuração viral de pacientes tratados com peg-IFN α /RBV, e o genótipo rs12979860-CC correlaciona com os níveis mais altos, observados em tecido do fígado ou em células do sangue periférico (86,87,132,133), enquanto em um estudo não, não identificamos uma diferença nos níveis de expressão entre os genótipos de *IFNL3* (rs12979860) em PBMCs como nos subgrupos de células como monócitos, células NK e dendríticas (134,135).

Entretanto, neste estudo, foi observado uma sutil diferença da expressão gênica do *IFNL3* e 4 entre os genótipos do SNP rs12979860. Corroborando com estudo que analisou diferenças nos níveis de IFN- λ 3 entre os genótipos do rs12979860, onde indivíduos com eliminação viral espontânea genótipo CC tinham altos níveis IFN- λ 3, enquanto que, foi observado em pacientes com HCC menores níveis de IFN- λ 3 e sem diferença significativa entre os genótipos. Além disso,

observamos níveis altos da expressão gênica *IFNL3* e *4*, nas amostras dos pacientes com HCC antes do tratamento e o declínio após o início do tratamento, o que difere do relato onde níveis séricos de IFN- λ 3 com níveis mais baixos antes do tratamento e um aumento na 4ª semana de tratamento estaria associado a bom prognóstico. Em contrapartida, em nossas análises foram observados níveis menores do *IFNA1* antes do tratamento, notavelmente, os *IFNL3* e *IFNL4* tiveram um declínio logo após o início do tratamento e o *IFNA1* teve o aumento, demonstrando o efeito antagonista do *IFNL3* e *IFNL4* sobre o gene do *IFNA1*, como também os níveis séricos do IFN- α , como descrito na literatura. Recentes evidências relatam que expressão de ISGs no fígado correlaciona com o IFNL, mas não com IFN tipo I (130).

Nossos dados não apresentaram diferença significativas nos níveis de mRNA a partir de sangue entre as variáveis, do desfecho do tratamento, entre os dois tipos de alfapeinterferonas. Entretanto, apresentou diferenças significativas entre os genótipos do rs12979860 dos genes *IFI6*, *IFI16*, *IRF9*, *IFIH1* e sutil diferença dos genes *RIG-1* e *RNASEL*. Apresentando níveis mais baixos dos genes induzidos pelo interferon, *IFI6* e *IFI16*, em pacientes homocigotos do alelo preditor rs12979860. Foi descrito que a expressão destes genes *IFI6* e *IFI16* foi altamente preditiva para eventual responsividade da terapia combinada Peg-IFN α /RBV, maior expressão foram associados com resposta mais fraca (136). O gene *IFIH1* desempenha um papel importante na resposta imune inata desencadeada pela infecção viral, foi observado sutil diferença entre os genótipos com níveis mais altos para o rs12979860-CC.

Portanto, podemos sugerir que o papel de níveis de IFN- λ regulados geneticamente poderia ser a modulação com ajuste fino dos níveis de IFN- α e de ISGs necessários, onde níveis ótimos ou moderados são capazes de controlar a replicação viral e a progressão inflamatória enquanto que níveis elevados não seriam tão eficientes. Assim, os SNPs rs12979860 e rs8099917 podem ser sítios para fatores de transcrição e alvos de metilação resultando na regulação da expressão de *IFNL3*, onde uma menor expressão de ISGs nos haplótipos respondedores em resposta a terapia por IFN- α (137) (128)(127)(126)(126)(125)(124)(123). Um estudo *in vitro* avaliou a expressão de ISGs induzidos pelos IFN- α e IFN- λ recombinantes em células Huh-7.5 (138), e observou a fosforilação de STAT1 e STAT2 após tratamento com IFN- λ ocorreu mais rapidamente e foi eliminada mais rápido do que a estimulação pelo IFN- α . Os resultados obtidos também com bloqueio dos receptores IFNs tipo I, II e III,

demonstrou uma cinética de fosforilação distinta associada a cada receptor, foi observado que o IFN- λ induz a ativação da maioria dos genes induzidos pelo IFN- α , embora com cinética diferente sugerindo que múltiplas proteínas precisam interagir perfeitamente para construir uma rede antiviral eficiente.

Embora os DAAs atualmente sejam a terapia padrão para o CHC, induzindo 90% da RVS nos pacientes do VHC-GT1, a maioria dos indivíduos em todo o mundo não tem acesso a esse esquema de tratamento, principalmente por seu alto custo. No entanto, muitos países em desenvolvimento mantêm a terapia baseada em IFN como a opção de tratamento (139). Assim, o Peg-IFN α permanece uma opção para pacientes infectados pelo VHC, para o genótipo viral 3, com falhas de DAA, bem como crianças, pacientes com coinfeção por VHB, particularmente aqueles com alta probabilidade de resposta (70,114).

Em resumo, nossos dados sugerem que a combinação de genótipos rs12979860, rs8109886 e rs8099917 são preditores mais precisos de bom prognóstico, durante o tratamento com Peg-IFN α /RBV de pacientes com HCC da população brasileira. Como foi sumarizado na figura 39, nosso estudo demonstrou que o aumento da RVS foi independente do genótipo viral e está intrinsecamente correlacionado com seus alelos preditivos. De fato, o genótipo preditor desencadeou nos pacientes com HCC um perfil fenotípico caracterizado por um balanço entre *IFNL3* e *IFNL4* e *IFNA1*, além de um padrão equilibrado nos níveis de ISGs e quimiocinas.

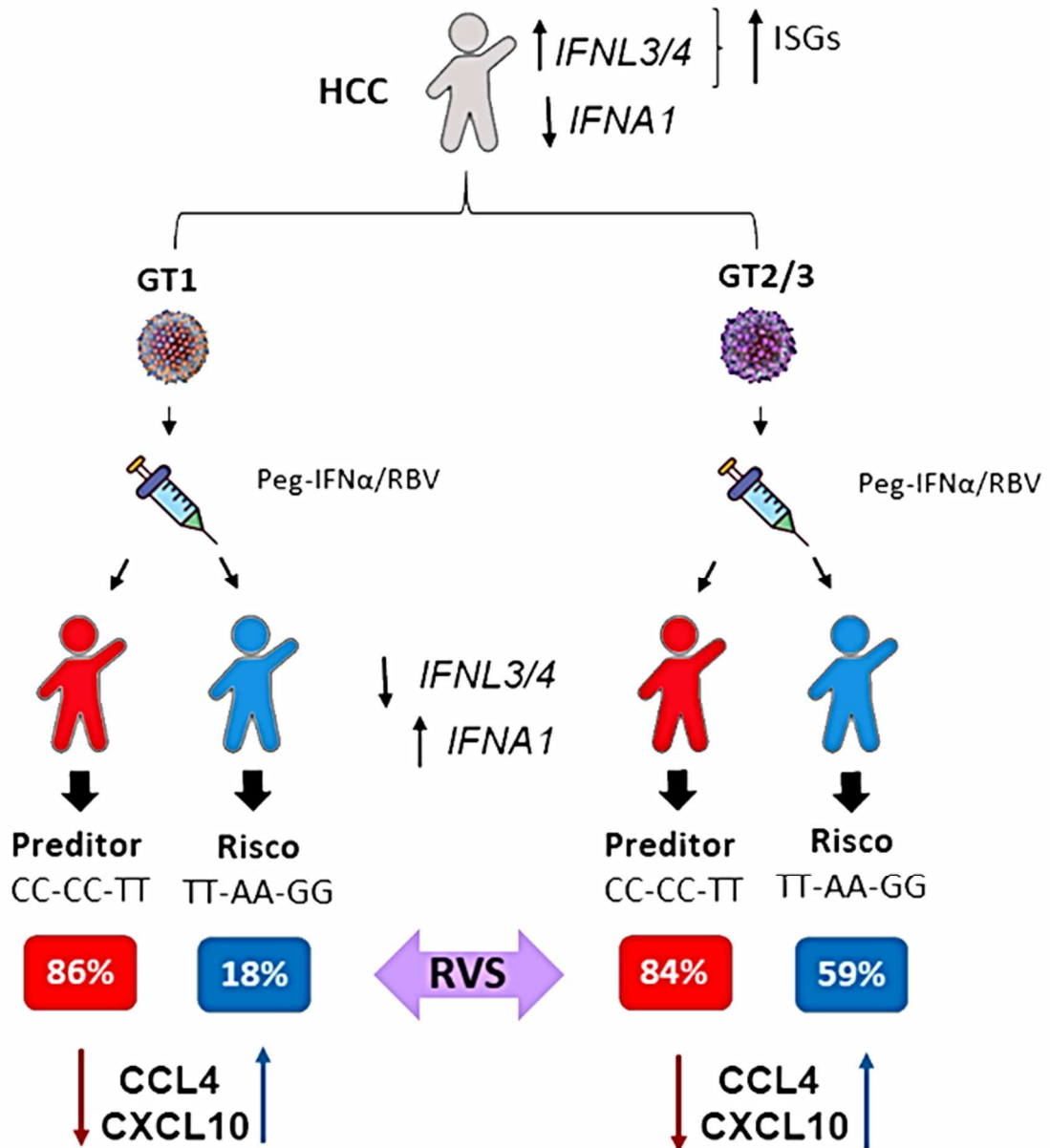


Figura 39. Modelo esquemático mostrando os principais achados deste estudo. Pacientes com HCC são incapazes de eliminar o VHC, apresentam aumento da expressão de ISGs (Genes estimulados por interferon), aumento da expressão de *IFNL3* E *IFNL4* e diminuição da expressão *IFNA1*. Após o início do tratamento, pacientes infectados, tanto com genótipo viral GT1 ou GT2/3, passaram a apresentar baixa expressão de *IFNL3* E *IFNL4* e aumento da expressão de *IFNA1*. Notavelmente, a combinação gênica dos SNPs rs12979869-CC/rs8109886-CC/rs8099917-TT se mostrou um importante fator preditivo, independente do genótipo viral, ampliando a predição da RVS. Os baixos níveis séricos das quimiocinas CCL4 e CXCL10 foram relacionados com a RVS, sendo modulados pelo genótipo preditor rs12979860-CC.

6- CONCLUSÕES

Foi confirmado a associação de polimorfismos da região do gene *IFNL3* E *IFNL4* (rs8103142, rs8105790, rs8113007, rs1188122, rs12982275, rs12979860, rs4803221, rs4803222, rs8109886 e rs8099917), com o desfecho ao tratamento com alfapeginterferona, nesta coorte da população brasileira.

A arquitetura genica da região do *IFNL3* e *IFNL4* é similar as populações ameríndias e europeia, com similar LD, onde os SNPs rs12979860, rs8100886 e rs8099917, podem representar todo este bloco de haplótipo.

O SNP rs8109886-CC é um forte preditor de desfecho do tratamento com a terapia a base de Peg-IFN α , carrega os genótipos preditores, rs12979860-CC e rs8099917-TT.

A combinação dos genótipos rs12979860-CC, rs8109886-CC e rs8099917-TT juntamente com fatores preditivos do hospedeiro e do vírus GT1 e GT2/3, podem auxiliar no tratamento personalizado, obtendo uma melhor taxa de RVS nos pacientes submetidos a terapia.

Foi demonstrado o efeito induzido pelo SNP rs12979860 em relação aos níveis das quimiocinas pró-inflamatórias CCL4 e CXCL10, mostrando diferentes padrões entre os alelos preditivo e o de risco.

Nossos dados sugerem um efeito antagonista entre IFN- λ e IFN- α . E que pacientes com HCC possuem níveis altos de ISGs podem ter sido induzidos pelo IFN tipo III e não pelo IFN tipo I.

Foi identificado que as quimiocinas CCL3, CCL4 e CXCL10 podem ser consideradas biomarcadores do perfil de resposta ao tratamento. Enquanto que, a quimiocina CCL5 poderia ser utilizada como biomarcador na progressão da doença hepática.

Não foi demonstrado diferença significativa, nos níveis séricos e nem na transcrição de mRNA de citocinas analisadas neste estudo, entre os dois biofármacos.

A genotipagem destes SNPs rs12979860, rs8109886 e rs8099917, poderá ser utilizada em pacientes com HCC submetidos aos novos tratamentos com AADs, visando avaliar seu efeito na resposta ao esquema terapêutico.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med*. 10 de abril de 1975;292(15):767–70.
2. 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*. 21 de abril de 1989;244(4902):359–62.
3. WHO P. Epidemiological Update Yellow Fever. PAHO/WHO; 2017.
4. Find the Missing Millions Campaign [Internet]. Find the Missing Millions. [citado 12 de novembro de 2018]. Disponível em: <http://www.worldhepatitisalliance.org/missing-millions/about/>
5. PetruzzIELlo A. Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis C Virus (HCV) Related Hepatocellular Carcinoma. *Open Virol J*. 2018;12:26–32.
6. Hepatitis C [Internet]. 2018 [citado 12 de agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
7. Moosavy SH, Davoodian P, Nazarnezhad MA, Nejatizadeh A, Eftekhari E, Mahboobi H. Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. *Electron Physician*. outubro de 2017;9(10):5646–56.
8. Lemoine M, Cooke GS. The Egyptian hepatitis C programme: A model of HCV treatment intervention? *Journal of Hepatology*. 1º de abril de 2018;68(4):638–9.
9. Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol*. 2006;44(1 Suppl):S6-9.
10. Papadopoulos N, Papavdi M, Pavlidou A, Konstantinou D, Kranidioti H, Kontos G, et al. Hepatitis B and C coinfection in a real-life setting: viral interactions and treatment issues. *Ann Gastroenterol*. junho de 2018;31(3):365–70.
11. PetruzzIELlo A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol*. 14 de setembro de 2016;22(34):7824–40.
12. Smith DB, Bukh J, Kuiken C, Muerhoff AS, Rice CM, Stapleton JT, et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology*. janeiro de 2014;59(1):318–27.
13. Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World Journal of Hepatology*. 27 de fevereiro de 2018;10(2):186.
14. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes - Messina - 2015 - *Hepatology* - Wiley Online Library [Internet]. [citado 28 de junho de 2019].

15. Possuelo LG, Perin D, Breunig PF, Schroeder DF, Allgayer MF, Darsie C, et al. Hepatitis C: evaluation of outcomes and georeferencing of cases in Santa Cruz do Sul, Brazil, between 2002 and 2015. A cross-sectional study. *Sao Paulo Med J*. abril de 2018;136(2):109–15.
16. Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso RMA, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis*. 1º de fevereiro de 2013;13:60.
17. da Fonseca JCF, Brasil LM. [Hepatitis C virus infection in the Amazon Brazilian region]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004;37 Suppl 2:1–8.
18. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol*. novembro de 2009;51(5):939–48.
19. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJD, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. janeiro de 2005;38(1):41–9.
20. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JID, et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol*. agosto de 2014;13(4):386–93.
21. Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol*. 27 de fevereiro de 2018;10(2):186–212.
22. Dustin LB, Bartolini B, Capobianchi MR, Pistello M. Hepatitis C virus: life cycle in cells, infection and host response, and analysis of molecular markers influencing the outcome of infection and response to therapy. *Clin Microbiol Infect*. outubro de 2016;22(10):826–32.
23. Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virology Journal*. 2011;8(1):161.
24. Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*. 21 de fevereiro de 2007;297(7):724–32.
25. Maasoumy B, Wedemeyer H. Natural history of acute and chronic hepatitis C. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. agosto de 2012;26(4):401–12.
26. Miao Z, Xie Z, Miao J, Ran J, Feng Y, Xia X. Regulated Entry of Hepatitis C Virus into Hepatocytes. *Viruses*. 09 de 2017;9(5).
27. Benova L, Mohamoud YA, Calvert C, Abu-Raddad LJ. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 15 de setembro de 2014;59(6):765–73.

28. Ridzon R, Gallagher K, Ciesielski C, Ginsberg MB, Robertson BJ, Luo CC, et al. Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needle-stick injury. *N Engl J Med*. 27 de março de 1997;336(13):919–22.
29. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções. Livrotab; 2015.
30. Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol*. outubro de 2016;65(1 Suppl):S2–21.
31. Kalinina O, Norder H, Mukomolov S, Magnius LO. A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol*. abril de 2002;76(8):4034–43.
32. Moriishi K, Matsuura Y. Structural Proteins of HCV and Biological Functions. In: Miyamura T, Lemon SM, Walker CM, Wakita T, organizadores. *Hepatitis C Virus I: Cellular and Molecular Virology* [Internet]. Tokyo: Springer Japan; 2016 [citado 12 de novembro de 2018]. p. 105–27. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-4-431-56098-2_6
33. Vercauteren K, Mesalam AA, Leroux-Roels G, Meuleman P. Impact of lipids and lipoproteins on hepatitis C virus infection and virus neutralization. *World J Gastroenterol*. 21 de novembro de 2014;20(43):15975–91.
34. Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol*. maio de 2009;90(Pt 5):1055–70.
35. Zhong J, Gastaminza P, Cheng G, Kapadia S, Kato T, Burton DR, et al. Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 28 de junho de 2005;102(26):9294–9.
36. Griffin SDC, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett*. 30 de janeiro de 2003;535(1–3):34–8.
37. von Hahn T, Rice CM. Hepatitis C virus entry. *J Biol Chem*. 15 de fevereiro de 2008;283(7):3689–93.
38. Slater-Handshy T, Droll DA, Fan X, Di Bisceglie AM, Chambers TJ. HCV E2 glycoprotein: mutagenesis of N-linked glycosylation sites and its effects on E2 expression and processing. *Virology*. 5 de fevereiro de 2004;319(1):36–48.
39. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA*. 9 de maio de 2006;103(19):7408–13.

40. Kim DW, Gwack Y, Han JH, Choe J. C-terminal domain of the hepatitis C virus NS3 protein contains an RNA helicase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 4 de outubro de 1995;215(1):160–6.
41. Perni RB, Almquist SJ, Byrn RA, Chandorkar G, Chaturvedi PR, Courtney LF, et al. Preclinical profile of VX-950, a potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of hepatitis C virus NS3-4A serine protease. *Antimicrob Agents Chemother.* março de 2006;50(3):899–909.
42. Nomura-Takigawa Y, Nagano-Fujii M, Deng L, Kitazawa S, Ishido S, Sada K, et al. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol.* julho de 2006;87(Pt 7):1935–45.
43. Jones DM, Patel AH, Targett-Adams P, McLauchlan J. The hepatitis C virus NS4B protein can trans-complement viral RNA replication and modulates production of infectious virus. *J Virol.* março de 2009;83(5):2163–77.
44. Macdonald A, Crowder K, Street A, McCormick C, Harris M. The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity. *J Gen Virol.* março de 2004;85(Pt 3):721–9.
45. Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD. Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA.* maio de 2001;7(5):710–21.
46. Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, et al. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* julho de 2006;80(14):6964–72.
47. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, et al. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest.* 1º de agosto de 1996;98(3):706–14.
48. Koziel MJ. Cellular Immune Responses against Hepatitis C Virus. *Clinical Infectious Diseases.* 1º de julho de 2005;41(Supplement 1):S25–31.
49. Dessouki O, Kamiya Y, Nagahama H, Tanaka M, Suzu S, Sasaki Y, et al. Chronic hepatitis C viral infection reduces NK cell frequency and suppresses cytokine secretion: Reversion by anti-viral treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* março de 2010;393(2):331–7.
50. Boonstra A, Woltman AM, Janssen HLA. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 1º de dezembro de 2008;22(6):1049–61.
51. Boonstra A, Woltman AM, Janssen HLA. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 1º de dezembro de 2008;22(6):1049–61.

52. Boltjes A, Movita D, Boonstra A, Woltman AM. The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Journal of Hepatology*. 1º de setembro de 2014;61(3):660–71.
53. Shata MT, Anthony DD, Carlson NL, Andrus L, Brotman B, Tricoche N, et al. Characterization of the immune response against hepatitis C infection in recovered, and chronically infected chimpanzees. *J Viral Hepat*. novembro de 2002;9(6):400–10.
54. Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han J-H, Hanson HL, Ghrayeb J, et al. HCV Persistence and Immune Evasion in the Absence of Memory T Cell Help. *Science*. 24 de outubro de 2003;302(5645):659–62.
55. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*. março de 2005;5(3):215–29.
56. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine*. abril de 2002;8(4):379–85.
57. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest*. novembro de 2000;106(10):1239–49.
58. Lee YA, Friedman SL. Reversal, maintenance or progression: what happens to the liver after a virologic cure of hepatitis C? *Antiviral Res*. julho de 2014;107:23–30.
59. Larrubia J-R. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*. 2008;14(47):7149.
60. Harvey CE, Post JJ, Palladinetti P, Freeman AJ, Ffrench RA, Kumar RK, et al. Expression of the chemokine IP-10 (CXCL10) by hepatocytes in chronic hepatitis C virus infection correlates with histological severity and lobular inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 1º de setembro de 2003;74(3):360–9.
61. Santantonio T, Fasano M, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, et al. Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance. *J Hepatol*. março de 2005;42(3):329–33.
62. Feld JJ, Hoofnagle JH. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*. 18 de agosto de 2005;436(7053):967–72.
63. Marcellin P, Boyer N, Gervais A, Martinot M, Pouteau M, Castelnau C, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. *Ann Intern Med*. 15 de novembro de 1997;127(10):875–81.

64. Di Bisceglie AM, Shindo M, Fong TL, Fried MW, Swain MG, Bergasa NV, et al. A pilot study of ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology*. setembro de 1992;16(3):649–54.
65. Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, Perelson AS, Layden TJ. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology*. julho de 1997;26(1):226–31.
66. Nieforth KA, Nadeau R, Patel IH, Mould D. Use of an indirect pharmacodynamic stimulation model of MX protein induction to compare in vivo activity of interferon alfa-2a and a polyethylene glycol-modified derivative in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. junho de 1996;59(6):636–46.
67. Zeuzem S, Herrmann E, Lee JH, Fricke J, Neumann AU, Modi M, et al. Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. *Gastroenterology*. maio de 2001;120(6):1438–47.
68. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçales FL, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 26 de setembro de 2002;347(13):975–82.
69. Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med*. 7 de dezembro de 2006;355(23):2444–51.
70. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções [Internet]. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, HIV/Aids e Hepatites Virais. 2018 [citado 12 de agosto de 2018]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-hepatite-c-e-coinfeccoes>
71. Poordad F, McCone J, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 31 de março de 2011;364(13):1195–206.
72. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1012912>. 2011 [citado 12 de agosto de 2018]. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1012912?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov
73. Sen GC. Viruses and Interferons. *Annual Review of Microbiology*. 2001;55(1):255–81.
74. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol*. janeiro de 2003;4(1):69–77.
75. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R | *Nature Immunology* [Internet]. [citado 12 de novembro de 2018]. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni873>

76. 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*. 8 de outubro de 2009;461(7265):798–801.
77. Park H, Serti E, Eke O, Muchmore B, Prokunina-Olsson L, Capone S, et al. IL-29 Is the Dominant Type III Interferon Produced by Hepatocytes During Acute Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology*. dezembro de 2012;56(6):2060–70.
78. Hemann EA, Gale MJ, Savan R. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. *Front Immunol* [Internet]. 2017 [citado 25 de setembro de 2018];8. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01707/full>
79. Bruening J, Weigel B, Gerold G. The Role of Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection and Therapy [Internet]. *Journal of Immunology Research*. 2017 [citado 25 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2017/7232361/abs/>
80. Thomson SJP, Goh FG, Banks H, Krausgruber T, Kotenko SV, Foxwell BMJ, et al. The role of transposable elements in the regulation of IFN- λ 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 14 de julho de 2009;106(28):11564–9.
81. Manry J, Laval G, Patin E, Fornarino S, Itan Y, Fumagalli M, et al. Evolutionary genetic dissection of human interferons. *The Journal of Experimental Medicine*. 19 de dezembro de 2011;208(13):2747–59.
82. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. janeiro de 2003;4(1):63–8.
83. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld J-C, Paludan SR, Klucher K, et al. Interferon- λ Contributes to Innate Immunity of Mice against Influenza A Virus but Not against Hepatotropic Viruses. *PLoS Pathog* [Internet]. 12 de setembro de 2008;4(9). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2522277/>
84. Mordstein M, Neugebauer E, Ditt V, Jessen B, Rieger T, Falcone V, et al. Lambda Interferon Renders Epithelial Cells of the Respiratory and Gastrointestinal Tracts Resistant to Viral Infections. *Journal of Virology*. 1º de junho de 2010;84(11):5670–7.
85. 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. *Nature Genetics*. 6 de janeiro de 2013;45(2):164–71.
86. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon- α and ribavirin therapy. *Nature Genetics*. outubro de 2009;41(10):1100–4.
87. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon- α and

- ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*. outubro de 2009;41(10):1105–9.
88. Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut*. 1º de setembro de 2011;60(9):1284–93.
89. rs12979860 (SNP) - Population genetics - Homo sapiens - Ensembl genome browser 94 [Internet]. 2018 [citado 9 de outubro de 2018]. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=19:39247647-39248647;v=rs12979860;vdb=variation;vf=142457941#population_freq_SAS
90. Homo sapiens - Ensembl genome browser 94 [Internet]. [citado 12 de novembro de 2018]. Disponível em: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index
91. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*. 17 de setembro de 2009;461(7262):399–401.
92. Yan KK, Guirgis M, Dinh T, George J, Dev A, Lee A, et al. Treatment responses in Asians and Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol*. 7 de junho de 2008;14(21):3416–20.
93. Terczyńska-Dyla E, Bibert S, Duong FHT, Krol I, Jørgensen S, Collinet E, et al. Reduced IFN λ 4 activity is associated with improved HCV clearance and reduced expression of interferon-stimulated genes. *Nature Communications*. 23 de dezembro de 2014;5:5699.
94. THOMAS E, GONZALEZ VD, LI Q, MODI AA, CHEN W, NOUREDDIN M, et al. HCV Infection Induces a Unique Hepatic Innate Immune Response Associated With Robust Production of Type III Interferons. *Gastroenterology*. abril de 2012;142(4):978–88.
95. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis L-L, Coltescu C, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology*. maio de 2005;128(5):1437–44.
96. Bruening J, Weigel B, Gerold G. The Role of Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection and Therapy [Internet]. *Journal of Immunology Research*. 2017 [citado 24 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2017/7232361/abs/>
97. Dst BM da SS de V em SD de, Virais A e H. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções [Internet]. 2015 [citado 8 de julho de 2016]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_diretrizes_hepatite_co_coinfeccoes.pdf
98. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. agosto de 1996;24(2):289–93.

99. Ritz C, Spiess A-N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics*. 1º de julho de 2008;24(13):1549–51.
100. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. junho de 1992;48(2):361–72.
101. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 15 de janeiro de 2005;21(2):263–5.
102. Ritz C, Spiess A-N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics*. 1º de julho de 2008;24(13):1549–51.
103. R: a language and environment for statistical computing [Internet]. [citado 20 de setembro de 2018]. Disponível em: <https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing>
104. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 18 de junho de 2002;3(7):RESEARCH0034.
105. Holm S. A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1979;6(2):65–70.
106. Cavalcante LN. Predictive factors associated with hepatitis C antiviral therapy response. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(12):1617.
107. Ramos JA, Ramos AL de A, Hoffmann L, Perez R de M, Coelho HSM, Ürményi TP, et al. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. novembro de 2012;107(7):888–92.
108. Rizzo SRCP, Gazito D, Pott-Junior H, Latini FRM, Castelo A. Prevalence of IFNL3 gene polymorphism among blood donors and its relation to genomic profile of ancestry in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. novembro de 2016;20(6):619–22.
109. Moreira JP, Malta F de Mello, Diniz MA, Kikuchi L, Chagas AL, Lima L de SB, et al. Interferon lambda and hepatitis C virus core protein polymorphisms associated with liver cancer. *Virology*. junho de 2016;493:136–41.
110. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo ALD, Machado TMB, Lemaire DC, Mendes CMC, et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. *Liver International*. outubro de 2011;n/a-n/a.
111. 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 Research and Human Retroviruses*. 26 de julho de 2011;28(2):215–9.
112. Cavalcante LN, Lyra AC. Predictive factors associated with hepatitis C antiviral therapy response. *World J Hepatol*. 28 de junho de 2015;7(12):1617–31.
113. Melis R, Fauron C, McMillin G, Lyon E, Shirts B, Hubley LM, et al. Simultaneous Genotyping of rs12979860 and rs8099917 Variants Near the IL28B Locus Associated with HCV Clearance and Treatment Response. *J Mol Diagn*. julho de 2011;13(4):446–51.
114. Muir AJ. IL28B in the era of direct-acting antivirals for hepatitis C. *J Clin Gastroenterol*. março de 2013;47(3):222–7.
115. Bhushan A, Chinnaswamy S. Identifying causal variants at the interferon lambda locus in case-control studies: Utilizing non-synonymous variant rs117648444 to probe the role of IFN- λ 4. *Gene*. 20 de julho de 2018;664:168–80.
116. Palma-Ocampo HK, Flores-Alonso JC, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J, Flores-Mendoza L, Herrera-Camacho I, et al. Interferon lambda inhibits dengue virus replication in epithelial cells. *Virology Journal* [Internet]. dezembro de 2015 [citado 19 de março de 2018];12(1). Disponível em: <http://www.virologyj.com/content/12/1/150>
117. Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, Kovacs A, et al. Gestational Stage and IFN- λ Signaling Regulate ZIKV Infection In Utero. *Cell Host & Microbe*. setembro de 2017;22(3):366-376.e3.
118. Lu Y-F, Mauger DM, Goldstein DB, Urban TJ, Weeks KM, Bradrick SS. IFNL3 mRNA structure is remodeled by a functional non-coding polymorphism associated with hepatitis C virus clearance. *Scientific Reports* [Internet]. dezembro de 2015 [citado 27 de março de 2018];5(1). Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep16037>
119. Smith KR, Suppiah V, O'Connor K, Berg T, Weltman M, Abate M, et al. Identification of improved IL28B SNPs and haplotypes for prediction of drug response in treatment of hepatitis C using massively parallel sequencing in a cross-sectional European cohort. *Genome Medicine*. 2011;3(8):57.
120. Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, et al. Hepatic ISG Expression Is Associated With Genetic Variation in Interleukin 28B and the Outcome of IFN Therapy for Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology*. agosto de 2010;139(2):499–509.
121. Sasaki R, Devhare PB, Steele R, Ray R, Ray RB. Hepatitis C virus-induced CCL5 secretion from macrophages activates hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2017;66(3):746–57.
122. Mohs A, Kuttkat N, Reißing J, Zimmermann HW, Sonntag R, Proudfoot A, et al. Functional role of CCL5/RANTES for HCC progression during chronic liver disease. *Journal of Hepatology*. 1º de abril de 2017;66(4):743–53.

123. Lin C-C, Su S-H, Jeng W-J, Huang C-H, Teng W, Chen W-T, et al. CCL4 is the only predictor for non-responder in GT-1 CHC patients with favorable IL28B genotype when treated with PegIFN/RBV. *BMC Gastroenterology* [Internet]. dezembro de 2017 [citado 4 de setembro de 2018];17(1). Disponível em: <https://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12876-017-0724-4>
124. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, Sørbye SW, Paulssen EJ, Kvamme JM, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 $^{\circ}$ de fevereiro de 2011;17(2):204–9.
125. Kurelac I, Lepej SZ, Grljic I, Gorenec L, Papic N, Dusek D, et al. Chemokine CXCL10 at week 4 of treatment predicts sustained virological response in patients with chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res*. agosto de 2012;32(8):386–91.
126. Darling JM, Aerssens J, Fanning G, McHutchison JG, Goldstein DB, Thompson AJ, et al. Quantitation of pretreatment serum interferon- γ -inducible protein-10 improves the predictive value of an IL28B gene polymorphism for hepatitis C treatment response. *Hepatology*. janeiro de 2011;53(1):14–22.
127. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *New England Journal of Medicine*. 9 de fevereiro de 2006;354(6):610–21.
128. Wald O, Weiss ID, Galun E, Peled A. Chemokines in hepatitis C virus infection: Pathogenesis, prognosis and therapeutics. *Cytokine*. 1 $^{\circ}$ de julho de 2007;39(1):50–62.
129. Florholmen J, Kristiansen MG, Steigen SE, Sørbye SW, Paulssen EJ, Kvamme JM, et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α , MIP-1 β and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. *Clinical Microbiology and Infection*. 1 $^{\circ}$ de fevereiro de 2011;17(2):204–9.
130. 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.
131. Chandra PK, Bao L, Song K, Aboulnasr FM, Baker DP, Shores N, et al. HCV Infection Selectively Impairs Type I but Not Type III IFN Signaling. *Am J Pathol*. janeiro de 2014;184(1):214–29.
132. Langhans B, Kupfer B, Braunschweiger I, Arndt S, Schulte W, Nischalke HD, et al. Interferon-lambda serum levels in hepatitis C. *Journal of Hepatology*. 1 $^{\circ}$ de maio de 2011;54(5):859–65.
133. Rallón NI, Soriano V, Naggie S, Restrepo C, McHutchison J, Vispo E, et al. Impact of IL28B gene polymorphisms on interferon- λ 3 plasma levels during

- pegylated interferon- α /ribavirin therapy for chronic hepatitis C in patients coinfecting with HIV. *J Antimicrob Chemother.* maio de 2012;67(5):1246–9.
134. O'Connor KS, Ahlenstiel G, Suppiah V, Schibeci S, Ong A, Leung R, et al. IFNL3 mediates interaction between innate immune cells: Implications for hepatitis C virus pathogenesis. *Innate Immun.* 1º de agosto de 2014;20(6):598–605.
135. Fukuhara T, Taketomi A, Motomura T, Okano S, Ninomiya A, Abe T, et al. Variants in IL28B in Liver Recipients and Donors Correlate With Response to Peg-Interferon and Ribavirin Therapy for Recurrent Hepatitis C. *Gastroenterology.* 1º de novembro de 2010;139(5):1577-1585.e3.
136. Pfeffer LM, Li K, Fleckenstein JF, Marion TN, Diament J, Yang CH, et al. An Interferon Response Gene Signature Is Associated with the Therapeutic Response of Hepatitis C Patients. *PLOS ONE.* 11 de agosto de 2014;9(8):e104202.
137. Shindo H, Maekawa S, Komase K, Miura M, Kadokura M, Sueki R, et al. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. *Journal of Viral Hepatitis.* 1º de abril de 2013;20(4):281–9.
138. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, Macdonald MR, et al. Interferons α and λ Inhibit Hepatitis C Virus Replication With Distinct Signal Transduction and Gene Regulation Kinetics. *Gastroenterology.* dezembro de 2006;131(6):1887–98.
139. Echeverría N, Chiodi D, López P, Sanchez Ciceron A, Angulo J, López-Lastra M, et al. IL28B gene polymorphism rs12979860, but not rs8099917, contributes to the occurrence of chronic HCV infection in Uruguayan patients. *Virol J [Internet].* 2 de março de 2018 [citado 5 de dezembro de 2018];15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5833045/>

8- ANEXOS

8.1 Anexo A – Tabelas com sequencias dos genes

Tabela 1 - Listagem dos pares de sequências senso e antisense dos genes analisados neste estudo.

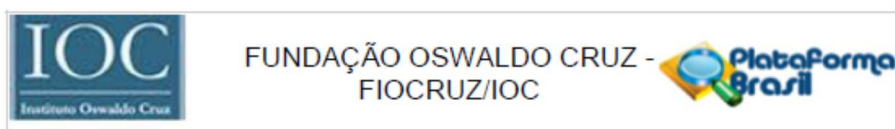
Genes	Sequencia Sense (5' → 3')	Sequencia anti-sense (5' → 3')
AIRE	GCCTGCCAAGGATGACACT	AAGGTGTGCTCGCTCAGAA
BCL2	CCCCTGGTGGACAACATC	CAGCCAGGAGAAATCAAACAG
CASP5	TGGCTGCTCTTCTGCAAATC	GTCTGCGGTCTCTCTCTTT
CCL22	GAAACACTTCTACTGGACCTCAGAC	TCTTCACCCAGGGCACTCT
CCR6	ACAATGAGCGGGGAATCAAT	AGCCTGGAGAACTGCCTGAC
CCR7	GTGGTGGCTCTCCTTGTCAT	TGTGGTGTGTCTCCGATGT
CD19	GGCAGCGGCTACGAGAAC	GGCTGGGTCAGCTCTTCAT
CD209	TTCACCTGGATGGGACTTTC	CTTGAAGCTGGGCAACAGAG
CD3E	TGAGGGCAAGAGTGTGTGAG	CCCCAGTGATGCAGATGTC
CD4	AGAGCCACTCAGCTCCAGAA	GAGACCTTTGCCTCCTTGTT
CD46	TTGCCATAGTTGTTGGAGTTG	CACCATCTGCTTTCCTTTC
CD48	GACCAGCATTCAAGTCACT	TAGTTCTCAGGCAGGCTCTCA
CD68	CGACCTGCTCTCCCTGAG	CACTGGGGCAGGAGAAACT
CD83	GAAACCTAAGTGGCAAGGTGAT	CAGGACAATCTCCGCTCTGT
CD8A	AACCACAGGAACCGAAGAC	TCCCTCAAAGGAAGGATCTC
CFB	GGATATGGAAAACCTGGAAGA	GAAGGGCGAATGACTGAGAT
CFH	CAGAACCACCAAATGCTTACA	TGTTTGGCTGTCCACCTTAAT
CLEC5A	ACGGCTTCATTACCACAAGG	TGTGGATCCTTTTCCTTTC
CTLA4	GCAGTTAGTTCGGGGTTGTT	GTTGGGGGCATTTTCACATA
CXCL10	TTCCTGCAAGCCAATTTTGT	CCTTTCCTTGCTAACTGCTTTC
CXCL13	GTGGGAATGGTTGTCCAAGA	TTCAGCTTGAGGGTCCACAC
DOK2	GCATGGAGGAAAATGAATTGTA	GCACCTCTCACTGGCTTCTG
EBI3	CTGGCCCTTCCAGAGAT	CACAGCCCTGAGGATGAAG
FOXP3	AGAAGCAGCGGACACTCAAT	CTTGTGCAGACTCAGGTTGTG
GATA3	CCAAGCGAAGGCTGTCTG	TCCTCCAGAGTGTGGTTGTG
GNLY	CTCGTGGCCGGAGAAACT	TTCCACAGGACAAGGTGAGA
GZMA	TGATTGGAATGAATATGGTTTTG	CAACAAAGGGCTTCCAGAAT
GZMB	GGGGGACCCAGAGATTAATA	TGCCATTGTTTCGTCCATAG
IFI16	TTGAATTGGCACCGAAAAGT	TTTCTTGTTTTCTGCTTCTGA
IFI35	GGTTTGCTAGGGATGGAGTG	ACTGGCTGCGACCTGATCT
IFI44	GGGAGCTGGACCCTGTAATA	TTTCTCCCTTAGATTCCCTATT
IFI6	CTGGTCTGCGATCCTGAATG	ATACTTGTGGGTGGCGTAGC
IFIH1	CTAGCCTGTTCTGGGGAAGA	CACTTCTTTTGCAGTGCTTTGT
IFIT1	AGAACGGCTGCCTAATTTACAG	TCAGGCATTTTCATCGTCATC
IFIT2	GCACTGCAACCATGAGTGA	GGAGTTTTCTCCCTCCATCAA
IFIT5	CATGAGTGAAATTCGTAAGGACAC	ACCTCAAACAGATCAATGTCTTC
IFITM1	TTCTTGAAGTGGTGTGTCTG	CCCAGATGTTTCAGGCACTTG
IFITM3	CGCCTACTCCGTGAAGTCTA	GGGATGACGATGAGCAGAAT
IFNa1	GCCATCTCTGTCTCCATGA	TGGTAGAGTTCGGTGCAGAAT
IFNAR	TGCTGCGAAAGTCTTCTTGA	CGATTTGTTCTCAGAAGTTGA
IFNB	CATTACCTGAAGGCCAAGGA	CAGCATCTGCTGGTTGAAGA
IFNG	TGACCAGAGCATCCAAAAGA	ATTGCTTTGCGTTGGACATT
IGF1	TGCCCAAGACCCAGAAGTAT	CCCTCTACTTGCCTTCTTCA
IKZF2	TTTCTCTGGTGCCTTTTGAAGA	GAGCTTTTCCCCACAAACT

Tabela 2 - Listagem dos pares de sequências senso e antisenso dos genes analisados neste estudo.

Genes	Sequencia Sense (5' → 3')	Sequencia anti-sense (5' → 3')
IL12A	CCAAGAATGAGAGTTGCCTAAA	TAAGGCACAGGGCCATCATA
IL13	CTGGTCAACATCACCCAGAA	TGCAGCCTGACACGTTGAT
IL15	TGCAAAGTAACAGCAATGAAGTG	CATTCCCATTAGAAGACAAACTG
IL17A	GGAATCTCCACCGCAATGA	GCTGGATGGGGACAGAGTT
IL18	TTTAAGGAAATGAATCCTCCTGAT	TTCAAATTGCATCTTATTATCATGTC
IL1A	TGTGACTGCCAAGATGAAG	CCGTGAGTTTCCCAGAAGAA
IL1B	GGACAGGATATGGAGCAACAA	TCTTTCAACACGCAGGACAG
IL2	AGCTCAAAGCAAAAACCTTTCAC	TGTTGTTTCAGATCCCTTTAGTTC
IL21	TGAATGACTTGGTCCCTGAAT	TGACTTTAGTTGGGCCTTCTG
IL22RA1	CAGACCGGACATGGACCTAC	AGGCGGCTTGGTGACATA
IL23A	TGGGACACATGGATCTAAGAGAA	GTCACAGCCATCTCCACACT
IL23R	GCTGGTGTCTATGGAGGAATTA	TTTCCTTGGTTGGCAGTTCT
IL2RA	GCCTCGTCACAACAACAGATT	CTCAGGAGGAGGACGCTGAT
IL5	GAGACCTTGGCACTGCTTTC	TGCACAGTTGGTGATTTTTATG
IL7	ATAGCACTGGTGATTTTGATCTC	CTTTGTTGGTTGGGCTTCAC
IL9	TTGTCTCTGTTTGGGCATTC	TGCATGGTGGTATTGGTCAT
IRF3	TCGAGGTGACAGCCTTCTAC	GCCTCACGTAGCTCATCACT
IRF7	TGATGCTGCGGGATAACTC	CCTGTGGTGGTGGGACAG
IRF9	TCCAGCCATACTCCACAGAA	AGGCTCTACACCAGGGACAG
ISG15	GAGAGGCAGCGAACTCATCT	CCAGCATCTTCACCGTCAG
LAG3	CACCTCCTGCTGTTTCTCATC	GTCTTGGTCGCCACTGTCTT
MARCO	CCAGGGAGTGAAAGGATCTTC	TCGGTTACTACTGCCGACAA
MSR1	GGGATACCCAGGTGTTCAAG	TCTCCCAAACAAAACACTTCA
OAS1	GGCTGAATTACCCATGCTTTA	ATCGTCGGTCTCATCGTCTG
OAS2	GTTGGTGTGGCATCTTCTG	CCACAACCTCCTGGTGTCTG
OAS3	TGTTGGAGACTTCTGAAACAG	ATGCAGCACAGGGCAGAT
OASL	AAATTTCTGCCATCCTTCAG	TGGCTTTCACATACTGCTGGTA
OSM	CCAGCTCCAGAAGCAGACA	TGCTCTCTCAGTTTAGGAACATC
PDL1	AGGGAGAATGATGGATGTGAA	CGTCTCCTCAAATGTGTATCA
PRF1	AAGACCCACCAGGACCAGTA	AGCGGGGGAGTGTGTACC
PTPRC	AGGGATGGATCTCAGCAAAC	TGCGTAGAGCTTTTACCACTTG
RIG-I	AAGCCTTGGCATGTTACACAG	GGCTTGGGATGTGGTCTACT
RNAse L	ACCTGGGCCTTCTGAACATT	CGGATGAACTTTAGCAGATCAC
SLAMF7	GAGTACGACACAATCCCTCACA	CATCTTTTTTCGGTATTTCCACAG
SOCS3	AAGGACGGAGACTTCGATTC	GGAAACTTGCTGTGGGTGAC
STAT2	CCAGATTTGCCCTGTGATCT	AAACCTCATCCACGGTGTTC
STING	ATATCTGCGGCTGATCCTGC	CATCTGCAGGTTCTGGTAGG
TBK1	GAAGGGCGACGCTTAGTCTT	ACCCCTGTTATTGCCTTAGCC
TBX21	CCAACAATGTGACCCAGATG	TCTCCGTCGTTACCTCAA
TICAM1	GGATCCCTGATCTGCTTGG	GAGGTGGTGAAGGCATGTTT
TLR5	CCCTCTGCCCTAGAATAAGA	AAGGCTATTCGGCCATCAA
TNFAIP6	CCAGGCTTCCCAAATGAGTA	CAAGCAACCTGGGTCTCTT
TNFRSF18	GAGTGGGACTGCATGTGTGT	CACTGGAAGCCAAAACCTGAA
TNFRSF9	GTTGTAAACGGGGCAGAAA	CTGGAAATCGGCAGCTACA
TREX1	AGACCCTCTCAGACAGTCGAA	GACAGCAGATGGTCTTGGCT
TWIST1	CATGTCCGCGTCCCACTA	CATTTTCTCCTTCTCTGGAACA
18S	AGGATGAGGTGGAACGTGTG	CTTCACGGAGCTTGTGTCC
B2M	AGATAGTTAAGTGGGATCGAGACA	ATTA AAAAGCAAGCAAGCAGAA
GAPDH	AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT	CAACAGCCTCAAGATCATCAGCAA

8.2 Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

Figura somente da primeira e última folha do parecer consubstanciado emitido pelo CEP, contendo o número e a aprovação.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISES DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS E POLIMORFISMO DA IL-28B EM PACIENTES COM HCC E VOLUNTÁRIOS SADIOS APÓS ADMINISTRAÇÃO DE IFN- γ PEGUILADO

Pesquisador: Andréa Marques Vieira da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46065015.6.0000.5248

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.222.573

Apresentação do Projeto:

A doença causada pelo HCV é um significativo problema de saúde pública em todo mundo, com amplo impacto pessoal, social e econômico. Estima-se que 170 milhões de pessoas são infectadas com HCV. A terapia padrão para a hepatite C crônica (HCC) é a combinação da interferon peguilado (INF-PEG) e ribavirina (RBV) tendo como objetivo primário controlar a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral. Uma série de fatores virais e do hospedeiro: genótipo viral, carga viral, gênero e estágio de fibrose foram identificados como preditores de RVS (5) entre estas se destacam o papel dos polimorfismos gênicos. Estudos recentes têm sugerido que variantes do polimorfismo de base única (SNP) localizados próximos ao gene IL28 mostram ser promissores na relação com a RVS à infecção pelo HCV. Por exemplo, pacientes com genótipo CC no SNP 12979860 apresentam aproximadamente o dobro de RVS quando comparado a pacientes com o genótipo TT para este mesmo SNP. O padrão de RVS na população brasileira pode não estar associado aos mesmos SNPs descritos na literatura. Diversos estudos sugerem que estas diferenças genéticas podem também ter um impacto na resposta imunológica e porem no

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 1.222.573

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 10 de Setembro de 2015

Assinado por:
Maria Regina Reis Amendoeira
(Coordenador)