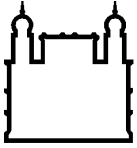


INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós Graduação *Stricto sensu*
Doutorado em Biologia Parasitária

Impacto dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) nos genes humanos da interleucina 28B (IL28B) e da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) sobre o tratamento da Hepatite C

NATHÁLIA MOTTA DELVAUX RAMOS

Rio de Janeiro
2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**IMPACTO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) NOS GENES
HUMANOS DA INTERLEUCINA 28B (IL28B) E DA INOSINA TRIFOSFATO
PIROFOSFATASE (ITPA) SOBRE O TRATAMENTO DA HEPATITE C**

NATHÁLIA MOTTA DELVAUX RAMOS

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo
Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Biologia
Parasitária.

Orientador: Dra Elisabeth Lampe

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ -

RJ

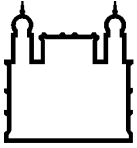
R175 Ramos, Nathália Motta Delvaux

Impacto dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes humanos da interleucina 28B (IL28B) e da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) sobre o tratamento da hepatite C / Nathália Motta Delvaux Ramos. – Rio de Janeiro, 2015.
xv, 135 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.
Bibliografia: f. 76-99

1. IL28B. 2. ITPA. 3. SNP. 4. HCV. 5. Brasil. 6. Anemia. 7. Resposta virológica sustentada. 8. Resolução espontânea. I. Título.

CDD 616.3623



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Nathália Motta Delvaux Ramos

Impacto dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) nos genes humanos da interleucina 28B (IL28B) e da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) sobre o tratamento da Hepatite C

ORIENTADOR: Dra. Elisabeth Lampe

Aprovada em: 31/08/2015

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Natalia Motta de Araujo (Fiocruz-RJ-Brasil)

Prof. Dra. Luciane Almeida Amado (Fiocruz-RJ-Brasil)

Prof. Dra. Luísa Hoffmann (UFRJ-RJ-Brasil)

Prof. Dr. Francisco Campello do Amaral Mello (Suplente/Fiocruz-RJ-Brasil)

Prof. Dra. Maria Inês Pardini (Suplente/UNESP-SP-Brasil)

Rio de Janeiro, 31 de agosto de 2015.

“Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar nos sonhos que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém”.

Renato Russo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a duas pessoas fundamentais na minha vida: meus pais Cláudia e José. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e por me darem a oportunidade de chegar até aqui. Amo vocês!

Agradeço aos meus familiares que são minha base e meus grandes amigos, e que acompanham minha vida bem de perto: Jojô e Elisa (vovós), Cristiane, Márcio (minhas paixões), Alexandre (padrinho), Aline, Felipe, Janir e Jurema. Obrigada pelo carinho, pelas brigas, pelas festas, pelas comidas, enfim, por tudo!

Agradeço também a galera da antiga: Aline, Amanda, Ana Carolina (Phoebe), Bruna, Carolina (Mufasa), Carlos (Cazuza), Ludmilla (Charllote), Maristella (Carneira) e Thiaguinho (Ranza). Amigos, vocês sempre participaram da minha vida e me deram força de uma forma mais que especial e sincera possível e, claro, muita diversão!

Não posso esquecer-me das outras amizades que construí ao longo da vida (entre a iniciação científica e mestrado) e que, de alguma forma me ajudaram. Os “surtados da acrilamida” (Margareth, Helena, Laura, Mauro, Giovani e Dr. Peralta - UFRJ) e os “praguinhas do bem” (Taináh, Nath, Dário, Otacílio, Adeilton e Dr. Octávio - LipMED/IOC). Muito obrigado!

Em especial, agradeço a Dra. Elisabeth Lampe, chefe do Laboratório de Hepatites Virais, que me recebeu de braços abertos e permitiu que eu fizesse parte do grupo. Obrigada pelo suporte e recursos que me foram concedidos para que eu pudesse realizar meus experimentos, pelos conselhos, pela confiança, pelas broncas e pelas experiências vividas durante o doutorado. Enfim, foi fundamental para minha formação! Muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Adilson José de Almeida pela essencial ajuda e ensinamentos na elaboração de etapas importantes e necessárias para a elaboração desta tese e dos artigos publicados. Além disso, a divertida convivência e ao repertório musical maravilhoso! Muito bom!

Agradeço a Dra. Lia Lewis e a Dra. Livia Melo Villar pela disposição em me ajudar

sempre que precisei durante diversos trabalhos exercidos no ambulatório, laboratório, coletas e afins. Muito obrigada mesmo!

Agradeço também as outras duas integrantes da equipe que foram importantes para a realização deste projeto: Maristella Matos da Costa (desde os tempos da faculdade) e Vanessa Duarte da Costa. Além disso, foram muito importantes também no ponto de vista pessoal, com elas aprendi, ensinei e me diverti. Foi ótimo! Valeu meninas, adoro vocês!

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório e Ambulatório de Hepatites Virais (LAHEP). Infelizmente, em um laboratório/ambulatório com muitas pessoas é complicado se relacionar estritamente com todos, porém não posso deixar de agradecer a todos sem exceção e, em especial ao Allan, Marcia, Moyra e Vanessa. Vocês me divertem e me ajudam de diversas maneiras! Nossa boa relação e convivência me “salvaram” bastante nos tempos de dificuldades!! Adoro vocês!

Agradeço a Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz e ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC pela oportunidade de participar desta instituição de referência em pesquisa e pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos que integram a coordenação da Pós-Graduação em Biologia Parasitária pelo suporte durante os anos.

Agradeço ao CNPq e a FAPERJ pelo auxílio financeiro que me foi concedido.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ALT	Alanina Aminotransferase
Anti-HCV	Anticorpo contra o vírus da Hepatite C
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Trifosfato de Adenosina
ARMS-PCR	<i>Tetra-primer Amplification-refractory Mutation System-polymerase Chain Reaction</i>
CDC	Centro de Controle de Doenças
cDNA	DNA complementar
C	Core
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CD81	Tetraspanina
CLDN1	Proteína de Junção Celular Claudin-1
CHC	Carcinoma Hepatocelular
BOC	Boceprevir
DAA	Antivirais de Ação Direta
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dDNTP	Didesoxirribonucleosídeos Trifosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
E	Envelope
γ -GT	Gama Glutamiltransferase
GAGs	Glicosaminoglicanas
GWAS	<i>Genome Wide Association Study</i>
HAV	Vírus da Hepatite A
HBV	Vírus da Hepatite B
Hb	Hemoglobina
HCV	Vírus da Hepatite C
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HUGG	Hospital Universitário Gaffré-Guinle

IL28B	Interleucina 28B
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ITPA	Inosina Trifosfato Pirofosfatase
ITP-ase	Inosina Trifosfatase
IFN	Interferon Convencional
IMP	Monofosfato de Inosina
IP	Inibidor de Protease
ITP	Trifosfato de Inosina
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated Genes</i>
JAK-STAT	<i>Janus kinase–signal Transducer and Activator of Transcription</i>
KDa	Quilodalton
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
nm	Nanômetro
NANB	Hepatite Não-A e Não-B
NCR	Região Não Codificante
NR	Não Respondedor
NS	<i>Non-structural</i>
NTPase	Nucleotídeo-trifosfatase
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	Pares de Base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
Poli-U	Polipirimidinas
PEG-IFN	Interferon Peguilado
P7	Proteína 7
qPCR	PCR quantitativa
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido Ribonucléico
RpRd	RNA polimerase dependente de RNA
RVS	Resposta Viroológica Sustentada

RVR	Resposta Viroológica Rápida
RVP	Resposta Viroológica Precoce
RT-PCR	Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
SC	<i>Spontaneous Clearance</i>
SRB1	Scavenger B1 Humano
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STAT	<i>Specifically Targeted Antiviral Therapy</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tampão	Tampão Fosfato Salino
PBS	
Tampão	Tampão Tris-borato-EDTA
TBE	
Tampão TE	Tampão Tris-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
TVR	Telaprevir
UDI	Usuário de Drogas Injetáveis
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) representa um grave problema de saúde pública no Brasil e apesar dos recentes progressos, o tratamento ainda é um dos maiores desafios tanto em termos de efetividade clínica como de custo-benefício. A anemia hemolítica induzida pela ribavirina (RBV) é o principal efeito colateral no tratamento antiviral. Além dos fatores virais, fatores do hospedeiro têm papel fundamental no controle da infecção. Estudos recentes demonstraram que polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes da interleucina 28B (IL28B) estão fortemente associadas com a resolução espontânea (RE) da doença e com resposta virológica sustentada (RVS) e, no gene da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) estão relacionados com a proteção contra a anemia. No gene IL28B, os genótipos CC no rs12979860, e TT no rs8099917 estão associados com a cura espontânea e com a resposta à terapia. No gene da ITPA, os genótipos CC no rs1127354 e AA no rs7270101 apresentam associação com a anemia. No entanto, a maioria dos métodos de identificação destes polimorfismos, atualmente disponíveis, é custosa. O objetivo geral deste trabalho foi determinar o perfil alélico dos genes IL28B e ITPA em amostras de pacientes com hepatite C, avaliar a associação dos polimorfismos do gene IL28B com resolução espontânea e terapêutica e, do gene da ITPA com a redução dos níveis de hemoglobina durante o tratamento antiviral. Neste trabalho, numa etapa inicial para o gene IL28B, quatro metodologias foram avaliadas em termos de especificidade, custo e tempo de execução: *tetra-primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction* (ARMS-PCR), polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP); reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) e sequenciamento nucleotídeo. Devido a próxima localização dos SNPs do gene ITPA, a genotipagem foi realizada por meio de sequenciamento nucleotídico. Um total de 281 amostras de sangue total de pacientes com infecção crônica pelo HCV foi estudado. Protocolos próprios para as técnicas ARMS-PCR e RFLP foram desenvolvidos e otimizados e, os resultados comparados com os do sequenciamento. Todos os métodos foram específicos, contudo o método ARMS-PCR apresentou os melhores resultados de acordo com a análise de custo-benefício. Em um segundo estudo, a frequência de polimorfismos do rs1127354 e rs7270101 do gene da ITPA foi avaliada em 200 pacientes com hepatite C crônica, e em 100 indivíduos saudáveis e, a associação com o desenvolvimento de anemia foi investigado em 97 pacientes que concluíram a terapia antiviral. A frequência global de distribuição alélica em rs7270101 e rs1127354 mostrou altas taxas dos genótipos AA (84,0%) e CC (94,3%), respectivamente, sugerindo que a coorte estudada possui uma grande propensão para o desenvolvimento de anemia induzida pela RBV. Ademais, constatamos uma diminuição progressiva de hemoglobina durante a terapia antiviral, sendo mais significativa na 12^a semana e em pacientes do sexo masculino. No terceiro estudo, analisamos a associação entre os genótipos dos SNPs da IL28B com RE em 24 pacientes com hepatite aguda e em 111 pacientes crônicos com RVS tratados com PEG-IFN/RBV. O genótipo CC (rs12979860) e o genótipo TT (rs8099917) apresentaram associação com RE e o alelo C (rs12979860) apresentou forte associação ($p=0,0045$) com a RVS. Estes dados confirmaram a importância destes genótipos no controle da infecção. Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para um melhor entendimento dos fatores do hospedeiro associados com a eliminação espontânea do vírus, com a RVS e com a anemia induzida pela ribavirina no tratamento antiviral da infecção pelo HCV.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV) infection is a leading public health problem in Brazil. Despite of the recent progress, the treatment is still a major challenge in terms of both clinical- and cost-effectiveness. The ribavirin (RBV)-induced anemia is the major hematological effect of antiviral treatment. In addition to viral factors, the host factors play a fundamental role in infection control. Recent studies have shown that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of interleukin 28B (IL28B) and inosine triphosphate pyrophosphatase (ITPA) are strongly associated with spontaneous clearance (SC) of the virus, with sustained virologic response (SVR) and with protection against anemia. In the IL28B gene, the CC genotype at rs12979860 and TT genotype at rs8099917 are associated with spontaneous clearance of virus and with response to therapy. In ITPA gene, CC genotype in rs1127354 and AA genotype at rs7270101 show association with anemia. However, most of the methods currently available for identifying these polymorphisms are costly. The aim of this study was to determine the allelic profile of IL28B and ITPA genes in samples from patients with hepatitis C, evaluate the association of polymorphisms in IL28B gene with spontaneous and treatment-induced clearance of HCV and, ITPA gene, with development of anemia during antiviral therapy. In this work, initially for IL28 gene, four techniques were evaluated in terms of specificity, cost and time of execution: tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase-chain reaction (ARMS-PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP); chain reaction quantitative polymerase (qPCR) and direct nucleotide sequencing. Due to SNPs location in ITPA gene, genotyping was performed by nucleotide sequencing. A total of 281 whole blood samples from patients with chronic HCV infection were studied. Protocols for ARMS-PCR and RFLP techniques were developed and optimized and the results compared with those of sequencing. All methods were specific; however, ARMS-PCR method showed the best results according to the cost-benefit analysis. In a second study, the frequency of rs1127354 and rs7270101 polymorphisms in ITPA gene was evaluated in 200 patients with chronic hepatitis C, and in 100 healthy individuals, and the association with the development of anemia was investigated in 97 patients who completed the antiviral therapy. The overall allele frequency distribution at rs7270101 and at rs1127354 showed high rates of AA genotypes (84.0%) and CC genotypes (94.3%), respectively. These results suggested that the cohort has a high propensity for the development of RBV- induced anemia. Moreover, we noticed a progressive decrease in hemoglobin during antiviral therapy, more significantly in the 12th weeks and in male patients. In the third study, we analyzed the association between the IL28B SNPs with SC in 24 patients with acute hepatitis and in 111 chronic patients with SVR treated with PEG-IFN/RBV. The CC genotype (rs12979860) and the TT genotype (rs8099917) were associated with SC and the C allele (rs12979860) showed a strong association ($p = 0.0045$) with the SVR. The data confirm the importance of these genotypes in infection control. These results are also important for a better understanding of host factors associated with spontaneous clearance of the virus, with SVR and with RBV-induced anemia in antiviral treatment of HCV infection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Modelo estrutural da partícula viral do HCV. (Echeverría <i>et al.</i> , 2015). Figura adaptada para o português.	03
Figura 1.2	Organização do genoma e processamento da poliproteína do HCV (Echeverría <i>et al.</i> , 2015). Figura adaptada para o português.	04
Figura 1.3	Ciclo replicativo do HCV. (Figura adaptada de Bruijne <i>et al.</i> , 2009). Figura adaptada para o português.	08
Figura 1.4	Árvore evolutiva dos sete genótipos e subtipos do HCV (Echeverría <i>et al.</i> , 2015). Figura adaptada para o português.	09
Figura 1.5	Prevalência global de infecção pelo HCV durante o ano de 2010. Valores em percentual (Lavanchy, 2011). Figura adaptada para o português.	12
Figura 1.6	Representação esquemática do quadro evolutivo da infecção pelo HCV. Somente 20 a 30% dos indivíduos infectados têm cura espontânea, enquanto 80% evoluem para cronicidade (Lavanchy, 2011). Figura adaptada para o português.	15
Figura 1.7	Localização dos SNPs associados com a resposta ao tratamento antiviral no gene IL28B no cromossoma humano 19 (Ahlenstiel <i>et al.</i> , 2010).	20
Figura 1.8	Localização dos SNPs associados com a anemia induzida pela ribavirina no gene ITPA no cromossoma humano 20 (Ahlenstiel <i>et al.</i> , 2010).	24

LISTA DE ANEXOS

Anexo I	E-mail da revista <i>Brazilian Journal of Infectious Diseases</i> referindo-se à submissão do artigo “ <i>Association of IL28B polymorphisms with spontaneous resolution of infection and with treatment response to HCV infection</i> ”, na data de 16/07/2015.	100
Anexo II	<u>Delvaux N</u> , Paula VS, Espírito-Santo MP, Silva EF, Miguel JC, Oliveira JC, Silva AS, Vieira YR, Lampe E, Villar LM. Knowledge about viral hepatitis among participants of Gay Pride Event in Brazil. <i>Braz J Infect Dis.</i> 2013; 17(3):377-8 (doi: 10.1016/j.bjid.2012.09.015).	101
Anexo III	Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, <u>Delvaux NM</u> , Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA and Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. <i>Antivir Ther.</i> 2013; 18 (3PtB):435-44 (doi: 10.3851/IMP2606).	104
Anexo IV	Parecer do Comitê de Ética do Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO.	115
Anexo V	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).	118

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Hepatites Virais.....	01
1.2. Hepatite C: Histórico.....	01
1.3. Vírus da Hepatite C: Organização Genômica.....	02
1.4. Vírus da Hepatite C: Replicação.....	06
1.5. Vírus da Hepatite C: Variabilidade Genética.....	08
1.6. Vírus da Hepatite C: Transmissão.....	09
1.7. Hepatite C: Epidemiologia.....	11
1.8. Hepatite C: Patogênese e Patogenia.....	13
1.9. Hepatite C: Infecção pelo HCV.....	13
1.9.1. Infecção Aguda.....	13
1.9.2. Infecção Crônica.....	14
1.10. Hepatite C: Diagnóstico.....	15
1.11. Hepatite C: Tratamento.....	16
1.12. Fatores Preditivos do Vírus e Hospedeiro.....	18
II. JUSTIFICATIVA.....	25
III. OBJETIVOS.....	27
3.1. Geral.....	27
3.2. Específicos.....	27
IV. RESULTADOS.....	28
4.1. Artigo 1.....	30
4.2. Artigo 2.....	35
4.3. Artigo 3.....	44
V. DISCUSSÃO.....	65
VI. CONCLUSÕES.....	75
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
VIII. ANEXOS.....	100
Anexo I.....	100
Anexo II.....	101
Anexo III.....	104
Anexo IV.....	115
Anexo V.....	118

I. INTRODUÇÃO

1.1. Hepatites Virais

As hepatites virais são doenças causadas por diferentes agentes etiológicos virais que têm em comum o tropismo pelo fígado. Apresentam semelhanças clínico-laboratoriais, mas como são causadas por diferentes vírus e por apresentarem diferentes modos de transmissão, apresentam grandes diferenças epidemiológicas e de evolução clínica. A distribuição das hepatites virais é universal, sendo que a magnitude dos diferentes tipos varia de acordo com a região. No Brasil, também há grande variação regional na prevalência de cada hepatite (Ferreira e Silveira, 2004; MS, 2008a).

Atualmente, existem cinco tipos de vírus já caracterizados: A, B, C, D e E, e para fins de vigilância epidemiológica, as hepatites podem ser agrupadas de acordo com a transmissão: fecal-oral (vírus A e E) e parenteral (vírus B, C e D). As hepatites virais têm grande importância pelo número de indivíduos atingidos e pela possibilidade de complicações das formas agudas e quanto à cronificação (Ferreira e Silveira, 2004; MS, 2008b). Os quadros clínicos agudos são muito diversificados, variando desde formas subclínicas até formas de insuficiência hepática aguda grave. Na maioria dos casos os sintomas predominantes são fadiga, anorexia, náuseas, mal-estar geral e adinamia (redução da força muscular). Já os casos de hepatite crônica (somente para as hepatites B, C e D), na grande maioria, são assintomáticos ou oligossintomáticos. De modo geral, as manifestações clínicas da hepatite crônica aparecem apenas em fases adiantadas de acometimento hepático (MS, 2008b).

1.2. Hepatite C: Histórico

Anteriormente à descoberta do vírus da hepatite C (HCV) por Choo e colaboradores (Choo *et al.*, 1990), muitos anos se passaram onde diversos episódios de hepatite pós-transfusional eram descritos e caracterizados como hepatite não A-não B (NANB) (Gocke *et al.*, 1969; Okochi *et al.*, 1970). Desta forma, os bancos de sangue implementaram exames para detecção, tanto do vírus da hepatite B (HBV) quanto do vírus da hepatite A (HAV), no sangue de todos os doadores voluntários. Apesar dessas medidas preventivas, continuaram a ocorrer casos de hepatite NANB em cerca de 90 a 95% dos casos pós-

transfusionais (Feinstone *et al.*, 1975). Com isso, a terminologia hepatite NANB, introduzida em 1975, viria a manter-se até a identificação do HCV.

Durante os 15 anos seguintes, diversos estudos com chimpanzés foram realizados na tentativa de esclarecer qual seria o agente responsável pela transmissão da hepatite NANB. Com o advento da biologia molecular, o vírus NANB que tinha sido inoculado em animais teve seu material genético isolado para a construção de uma biblioteca de DNAs complementares (cDNAs), para posterior clonagem, e conseqüentemente, produção de proteínas. Logo, foi possível o desenvolvimento de testes sorológicos, utilizando antígenos produzidos para detectar anticorpos no soro de paciente cronicamente infectado com hepatite NANB (Gocke *et al.*, 1969; Alter *et al.*, 1989). Com a utilização deste exame, foi visto que cerca de 80% dos indivíduos infectados com o vírus NANB soroconvertiam, possibilitando assim, a identificação do HCV. Sendo assim, com este teste sorológico de primeira geração, foi possível obter um controle na disseminação das hepatites pós-transfusionais, reduzindo de 70% para 1,5% a incidência da hepatite C pós-transfusional. Subseqüentemente, essa porcentagem foi reduzida a quase zero (Alter *et al.*, 2000). No Brasil, a implantação de testes para a triagem de doadores de sangue tornou-se obrigatória em 1994, diminuindo assim, a transmissão da hepatite C através de transfusões (Donahue *et al.*, 1992, Busch *et al.*, 2005).

1.3. Vírus da Hepatite C: Organização Genômica

O HCV é o agente etiológico da hepatite crônica anteriormente denominada de hepatite NANB. O HCV é classificado como sendo o único representante do gênero *Hepacivirus*, dentro da família *Flaviviridae* (Thiel *et al.*, 2005). Suas partículas são esféricas, envelopadas com projeções na superfície e medem aproximadamente 55 a 65 nanômetros (nm) de diâmetro (Kaito *et al.*, 1994). Um modelo esquemático da estrutura da partícula viral é apresentado na figura 1.1.

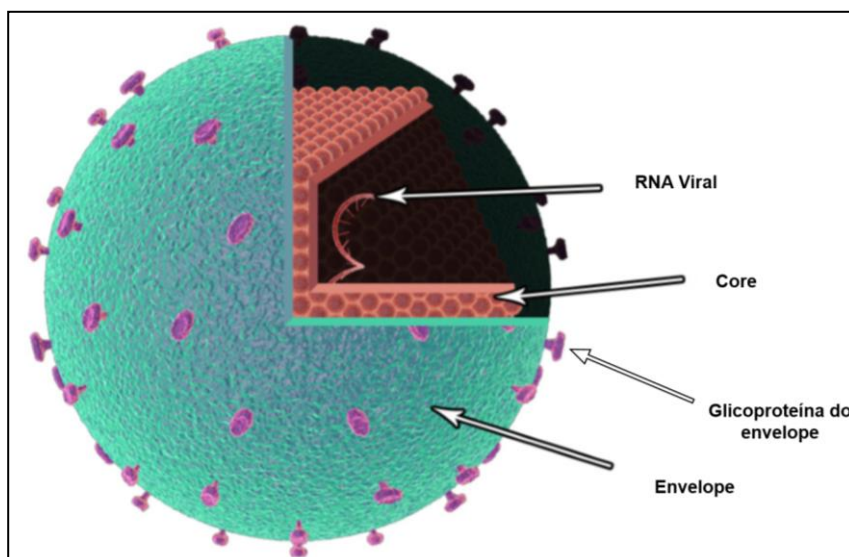


Figura 1.1: Modelo estrutural da partícula viral do HCV (Echeverría *et al.*, 2015). Figura adaptada para o português.

O genoma viral é constituído de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, de polaridade positiva, com aproximadamente 9.400 nucleotídeos. O genoma do HCV é organizado em três regiões: uma região 5' não-codificante (5' NCR); seguida por uma região codificante, sendo uma única e longa fase de leitura aberta (*Open reading frame* - ORF), e uma região 3' não-codificante, que contém uma sequência altamente conservada de 98 nucleotídeos essencial para a replicação do vírus (3' NCR).

A região 5' NCR apresenta cerca de 340 nucleotídeos e contém um sítio interno de entrada ribossomal (*Internal ribosome entry site* - IRES), responsável pela tradução da poliproteína que dará origem às proteínas estruturais e não estruturais (Lukavsky, 2009). É a região utilizada para o diagnóstico do HCV por técnicas de biologia molecular, uma vez que é altamente conservada entre os isolados do vírus.

A região 3' NCR é composta por uma pequena região altamente variável de aproximadamente 40 nucleotídeos; um trecho formado por polipirimidinas (poli-U) com tamanho variável entre os isolados de HCV; seguido de uma região altamente conservada, denominada de cauda X, com cerca de 98 nucleotídeos. Esta região parece estar associada à infectividade e replicação viral, assim como na tradução protéica (Friebe & Bartenschlager, 2002; Lan *et al.*, 1999).

A ORF do HCV abrange quase que todo o genoma viral e codifica uma poliproteína precursora de cerca de 3.000 aminoácidos que é clivada em proteínas estruturais e proteínas não-estruturais. As proteínas estruturais são o Core (C), Envelope 1 (E1),

Envelope 2 (E2) e p7, e estão localizadas na extremidade aminoterminal (N-terminal), enquanto que as proteínas não-estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B localizam-se na extremidade carboxiterminal (C-terminal) (Choo *et al.*, 1991). As proteínas não estruturais são responsáveis pela replicação e empacotamento do genoma viral dentro do capsídeo, o qual é formado pelas proteínas estruturais (Sharma, 2010; Suzuki, 2011) (Figura 1.2).

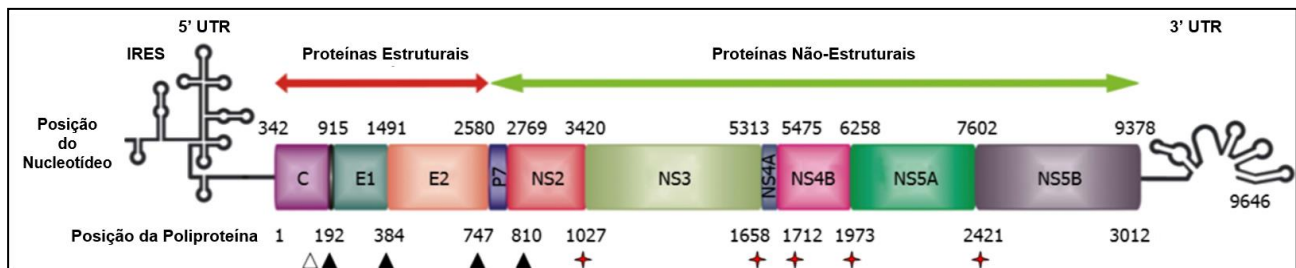


Figura 1.2: Organização do genoma e processamento da poliproteína do HCV (Echeverría *et al.*, 2015). Figura adaptada para o português.

A proteína C consiste de aproximadamente 191 aminoácidos, sendo altamente conservada e com propriedades químicas básicas responsáveis pela estrutura do nucleocapsídeo (Bukh *et al.*, 1994). Diversos estudos relatam que a proteína C interage com várias proteínas celulares podendo afetar algumas de suas funções como a transcrição gênica, vias de sinalização celular, metabolismo lipídico e apoptose (Tellinghuisen & Rice, 2002; Lee *et al.*, 2011). Além disso, estudos mostram uma possível influência na evolução da doença hepática e do câncer (Vassilaki & Mavromara, 2009).

As glicoproteínas do envelope são proteínas transmembrana que formam heterodímeros que representam os blocos formadores do envelope viral (Helle *et al.*, 2010). Além disso, têm papel crucial na ligação do vírus ao receptor celular e entrada do vírus na célula hospedeira (Albecka *et al.*, 2011), e a sua localização na superfície viral facilita a ligação do vírus aos receptores da célula hospedeira (Op De Beeck *et al.*, 2004; Vieyres *et al.*, 2010).

A proteína p7 é um polipeptídeo com cerca de 63 aminoácidos que se localiza entre a região estrutural e não estrutural do HCV. Essa proteína é composta por uma membrana que apresenta duas α -hélices transmembranas conectadas por uma dobra, orientadas em direção ao citoplasma (Khaliq *et al.*, 2010). Apesar de não está claramente identificada como uma proteína estrutural ou não estrutural, estudos mostraram que a proteína p7 é

dispensável na entrada do vírus na célula e na replicação do RNA, porém, é essencial para a montagem e liberação do vírus infeccioso através dos poros formados na membrana do retículo endoplasmático (Steinmann *et al.*, 2007; Sakai *et al.*, 2003).

A proteína não estrutural, NS2, consiste em uma cisteína-protease com cerca de 21 a 23 kDa. É formada por um domínio hidrofóbico na porção N-terminal e um subdomínio protease C-terminal voltado para o citossol que estimula a produção de zinco o qual atua na clivagem autocatalítica da junção NS2/3, auxiliado pelo domínio protease da porção N-terminal da proteína NS3 (Suzuki, 2012). Estudos demonstraram que esta proteína pode estar envolvida em interações com proteínas estruturais e não estruturais e que tais interações podem resultar na montagem da partícula viral (Jirasko *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011; Stapleford & Lindenbach, 2011).

A proteína NS3, com aproximadamente 69 kDa, é considerada multifuncional, pois possui diversas atividades, tais como: de serino-protease que cliva todas as outras proteínas NS nas junções NS3/NS4, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A e NS5A/NS5B; de RNA-helicase e de nucleotídeo-trifosfatase (NTPase), desempenhando uma função importante durante a replicação viral (Kolykhalov *et al.*, 2000; Lam & Frick, 2006). Essa proteína tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de antivirais que se associam à protease viral de modo reversível, impedindo a atuação da mesma no processamento da poliproteína e, conseqüentemente, na replicação viral (Lin *et al.*, 2004).

A proteína NS4A é uma proteína de 8 kDa com cerca de 54 aminoácidos e atua como um co-fator para as atividades proteolíticas da NS3. O heterodímero NS3/NS4A é capaz de clivar o sítio que une as proteínas NS. A porção hidrofóbica N-terminal contém um segmento transmembrana que ancora esse heterodímero à região intracelular da membrana do retículo endoplasmático, onde ocorre o processo proteolítico. A porção hidrofóbica (central) é necessária para a ativação da NS3, enquanto que a porção C-terminal tem função na replicação do HCV devido à regulação da fosforilação da NS5A (Wolk *et al.*, 2000; Bartenschlager *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1995). A proteína NS4B é uma proteína integral de membrana de 27 kDa que contém segmentos transmembrana anfipáticas. Esta proteína tem sido relacionada com a indução de alterações na membrana do retículo endoplasmático onde é formado o complexo de replicação (Lundin *et al.*, 2003; Elazar *et al.*, 2004; Brass *et al.*, 2006).

A proteína NS5A é hidrofílica cuja mobilidade eletroforética a distingue em duas formas: fosforilada (56 kDa) e hiperfosforilada (58 kDa) (Kaneko *et al.*, 1994). Esta proteína se localiza, predominantemente, no compartimento citoplasmático/perinuclear da

célula hospedeira, incluindo o retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Sua porção citoplasmática é composta por três domínios separados por sequências de baixa complexidade. O domínio I, o mais conservado, se liga ao RNA, enquanto que os domínios II e III, são importantes para a replicação do RNA e/ou montagem do vírion (Appel *et al.*, 2008; Tellinghuisen *et al.*, 2008). Além disso, apresenta outras funções tais como, a inibição da atividade antiviral do interferon, a ativação transcricional e envolvimento na regulação do crescimento e das vias de sinalização celulares (Quezada & Kane, 2009; Shirota *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005; 2007; Tellinghuisen *et al.*, 2005).

A proteína NS5B apresenta 65 kDa e consiste em uma fosfoproteína ligada à membrana do retículo endoplasmático. Promove a síntese de novos genomas de RNA e possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA (RpRd), tendo um papel fundamental no ciclo replicativo do HCV (Luo *et al.*, 2000). Sua ligação à membrana ocorre a partir da região C-terminal de modo a garantir a iniciação correta da síntese de RNA (Hong *et al.*, 2001). Contudo, não apresenta a capacidade de correção de erros durante a incorporação de nucleotídeos na replicação viral, sendo responsável pela formação de variantes virais (*quasispecies*). Essas variantes têm como característica principal a proximidade genética entre si, porém, com pequenas alterações em suas sequências nucleotídicas. A NS5B também tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de antivirais, dentre os quais estão os inibidores análogos de nucleosídeos e os alostéricos não-nucleosídeos (Carroll *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Tomei *et al.*, 2004).

1.4. Vírus da Hepatite C: Replicação

Apesar de nos últimos anos os estudos em relação à replicação do HCV terem se intensificado, diversos mecanismos que ocorrem durante o processo ainda não foram totalmente elucidados, sendo presumidos com base na replicação viral de outros representantes da família *Flaviviridae*.

O ciclo de vida do HCV consiste basicamente na entrada do vírus na célula do hospedeiro; na liberação do genoma viral no citoplasma; na tradução das proteínas virais; na replicação do genoma viral; na montagem dos componentes virais e, finalmente, na liberação das novas partículas de vírions do HCV.

A entrada na célula do hospedeiro se dá por meio de diferentes receptores celulares tais como: o de lipoproteína de baixa densidade (LDLR); a tetraspanina (CD81); a

proteína de junção celular Claudin-1 (CLDN1), o Scavenger B1 humano (SRB1) e as glicosaminoglicanas (GAGs) (Cocquerel *et al.*, 2006; Brass *et al.*, 2006; Ashfaq *et al.*, 2011). A utilização de diferentes receptores pode resultar na entrada do vírus em diferentes células do hospedeiro e, conseqüentemente, na patologia associada à infecção. Além disso, a fibronectina, presente na superfície celular de megacariócitos e plaquetas, tem sido investigada como um possível receptor para o HCV (Pugliese *et al.*, 2004). Já no citoplasma da célula, o vírus libera seu genoma que fica exposto à maquinaria da célula do hospedeiro. Posteriormente, o HCV-RNA é traduzido em uma poliproteína que é clivada originando, assim, todas as proteínas virais. Primeiramente são formadas as proteínas estruturais, seguidas pelas não estruturais.

A replicação do HCV é semiconservativa, isto é, a fita positiva de seu RNA serve como molde para a síntese da fita negativa intermediária de replicação. Logo após, essa fita negativa é utilizada como molde para a produção de inúmeras fitas de polaridade positivas, que por sua vez, são utilizadas para a tradução da poliproteína, para síntese de novos RNAs intermediários e para a formação de novas partículas. A replicação do HCV chega ao término com a montagem de novas partículas virais e posterior liberação dos vírions (Figura 1.3).

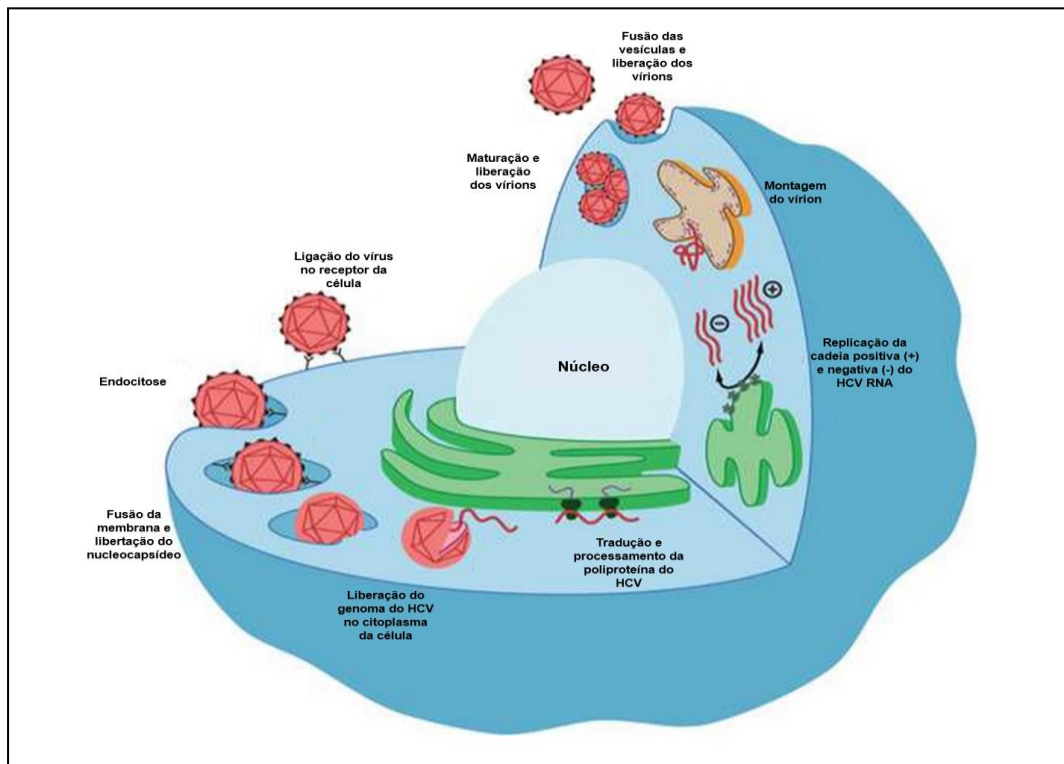


Figura 1.3: Ciclo replicativo do HCV. (Figura adaptada de Bruijne *et al.*, 2009).

1.5. Vírus da Hepatite C: Variabilidade Genética

A heterogeneidade genética é um traço característico do HCV. A produção de trilhões de partículas virais associadas com a alta taxa de mutação, devido a incapacidade de correção da inserção dos nucleotídeos da NS5B RpRd, gera um grande número de variantes conhecidos como *quasispecies* que coexistem dentro de um mesmo indivíduo. Desta forma, o sistema imune do hospedeiro é burlado e, conseqüentemente, ocorre a seleção de variantes do vírus. Junto a essa adaptação ao hospedeiro, com o passar do tempo, se originou os diferentes genótipos existentes, os diferentes cursos clínicos e, assim, as diferentes respostas ao tratamento.

Logo, a análise comparativa de sequências nucleotídicas oriundas de várias partes do mundo, classificou o HCV em sete genótipos, denominados de 1 a 7 e cerca de 67 subtipos denominados pelas letras do alfabeto em ordem de descobrimento (a, b, c, ...) (Simmonds *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2014; Echeverría *et al.*, 2015). A figura 1.4 apresenta uma árvore evolutiva dos 7 genótipos e seus subtipos onde se pode observar que o genótipo 6 é o que apresenta maior número de subtipos, refletindo uma maior diversificação evolutiva. Os genótipos 1, 2 e 3 apresentam distribuição mundial

e, no Brasil, foi demonstrado uma maior prevalência do genótipo 1 (64-72%), seguido pelo genótipo 3 (25-30%) e o genótipo 2 (2-5%) (Campiotto *et al.*, 2005).

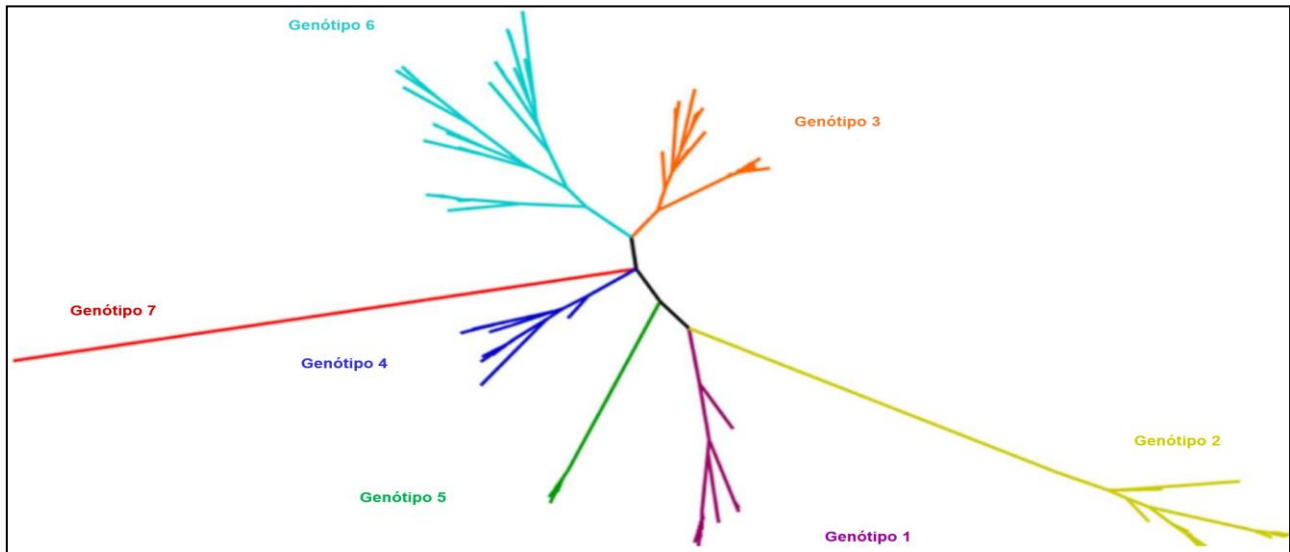


Figura 1.4: Árvore evolutiva dos sete genótipos e subtipos do HCV (Echeverría *et al.*, 2015). Figura adaptada para o português.

1.6. Vírus da Hepatite C: Transmissão

A transmissão ocorre principalmente por via parenteral por exposição percutânea direta ao sangue e hemoderivados contaminados pelo HCV e, dependendo do nível de desenvolvimento dos países, as formas de contágio também se diferem (Prati, 2006). Países em desenvolvimento mantêm a prática de doadores comerciais com o intuito de sustentar o estoque de sangue e, nestes casos, a implantação de testes que garantam uma transfusão mais segura não tem sido priorizada (Hladik *et al.*, 2006). Nestes países, a disseminação primária se faz por meio do uso de material cirúrgico e equipamento contaminados e/ou não descartáveis na transfusão de sangue ou hemoderivados (Wasley *et al.*, 2000). Nos países desenvolvidos, uma vez que, a triagem para anti-HCV é realizada em doadores de sangue desde o início da década de 90, a incidência de casos de hepatite C pós-transfusional praticamente desapareceu. Logo, o uso de drogas ilícitas via intravenosa ou intranasal tornou-se a principal forma de transmissão do HCV (Alter, 2002; Dore *et al.*, 2003; Lopes *et al.*, 2009). Os usuários de drogas injetáveis têm a mais alta prevalência de infecção pelo HCV comparado a qualquer outro grupo com comportamento de risco (Alter, 2011). O uso de cocaína intranasal, assim como o uso do

crack, tem sido associado à transmissão do HCV devido ao compartilhamento de utensílios contaminados pelo vírus utilizados no momento de consumo das drogas. Nestes casos, objetos que entram em contato com lesões nasais e ulcerações orais são prováveis vias de transmissão pessoa a pessoa (Woodfield *et al.*, 1993; Fischer *et al.*, 2008).

Estudos epidemiológicos revelaram que a prevalência mundial da infecção entre usuários de drogas é muito elevada, podendo chegar a taxas de até 90%, conforme a duração da exposição ao uso das drogas e da localização geográfica destes usuários (Gerberding, 1994; Hagan *et al.*, 2008). No Brasil, em um estudo realizado em 660 usuários de drogas injetáveis (UDI) recrutados na cidade do Rio de Janeiro, a prevalência de anti-HCV foi de 16,7%, sendo que os usuários com mais de seis anos de uso apresentaram uma taxa de infecção pelo HCV cerca de 2,5 vezes maior (23,4%) do que os usuários com menor tempo de consumo de drogas (10,1%) (Oliveira *et al.*, 2009). Outrossim, a transmissão parenteral ainda pode ocorrer entre pacientes submetidos a hemodiálise, e em transplante de órgão.

A transmissão ocupacional, perinatal e sexual, ocorrem com menos frequência se comparadas à exposição percutânea (Puro *et al.*, 1995; Kiyosawa *et al.*, 1991; Ferrero *et al.*, 2003; Terrault, 2002; Vandelli *et al.*, 2004). Todavia, estudos mostraram que em relação à transmissão ocupacional (vítimas de acidentes perfuro-cortantes), profissionais da área de saúde são os mais atingidos. O risco de infecção pode variar de acordo com o tipo de exposição e fatores que englobam, por exemplo, a carga viral no hospedeiro e o tempo de exposição dos profissionais (Riddell & Sherrard, 2000; Marconi *et al.*, 2010). Sendo assim, medidas de precaução na aplicação de procedimentos padrões e educação continuada poderiam minimizar o risco de transmissão reduzindo o número de infecções pelo HCV (Deuffic-Burban *et al.*, 2011). Ademais, os profissionais de saúde infectados também podem transmitir o HCV para os pacientes. Alguns casos têm sido relatados e parecem estar relacionados com procedimentos cirúrgicos (Perry *et al.*, 2006).

Em relação à transmissão perinatal do HCV, estudos indicam que formas distintas de transmissão de mãe para filho podem ocorrer, sendo as mais comuns a intrauterina e a que ocorre durante o parto. Dados da literatura evidenciaram que a detecção do HCV-RNA no soro de crianças nascidas dentro de 24 horas, representa um forte indício de infecção intrauterina (Resti *et al.*, 1998; Mok *et al.*, 2005). Infecções perinatais geralmente ocorrem em casos de mães que apresentam anti-HCV positivo e/ou HCV-RNA positivo. Os principais fatores de risco associados à essa transmissão são complicações no parto

que implicam na ruptura da bolsa amniótica e demora da retirada da criança em mais de 6 horas após sua ruptura (Mast *et al.*, 2005); procedimentos obstétricos que expõem a criança ao sangue materno HCV positivo (Minola *et al.*, 2001; Mast *et al.*, 2005); mães HCV-RNA positivas coinfectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Blackard *et al.*, 2005; MS, 2008b) e infecção de células mononucleares do sangue periférico de mães HCV positivas (infecção extra-hepática materna) (Azzari *et al.*, 2008).

Existe ainda uma parcela de casos onde não se consegue identificar o modo de transmissão do HCV. Em relação aos fluidos corporais, alguns deles como saliva, leite materno, sêmen e secreções cervico-vaginais também têm sido investigadas como potencialmente capazes de transmitir o HCV, devido ao fato do HCV-RNA já ter sido detectado nestes espécimes (Abou-Setta, 2004). A avaliação dos modos de transmissão de HCV deve ser concluída para que as autoridades consigam priorizar ações preventivas e fazer o uso mais adequado dos recursos disponíveis.

1.7. Hepatite C: Epidemiologia

Após anos da descoberta do HCV, já está bem estabelecido que o mesmo é de importância global, afetando muitos países, e conseqüentemente, levando a um problema de saúde global que requer intervenções ativas para a sua prevenção e controle. Avaliações epidemiológicas apontam que embora o HCV seja endêmico no mundo, apresenta um grau variável em relação à distribuição geográfica. Essa ocorre entre indivíduos de todas as idades, sexos, raças e regiões do mundo. As conseqüências da hepatite C crônica, cirrose e do carcinoma hepatocelular (CHC) têm mostrado cada vez mais impacto sobre os sistemas nacionais de saúde (Alter *et al.*, 2002).

Novas infecções continuam a ocorrer, devido à continuação de transfusões de sangue inadequadamente ou não testadas, a produtos derivados de sangue impróprios, a esterilização inadequada dos equipamentos médicos e ao aumento no uso de drogas intravenosas. A prevalência de HCV ainda permanece subestimada, uma vez que a informação ainda é insuficiente em muitos países. Além disso, a maioria dos estudos de prevalência representam apenas um segmento da população, como por exemplo, as mulheres grávidas, doadores de sangue ou internações hospitalares (Richard-Lenoble *et al.*, 1995; Martinson *et al.*, 1996; Jeannel *et al.*, 1998; Lavanchy, 2011).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), embora ao longo dos anos já tenha sido observada uma redução no número de indivíduos infectados em todo

mundo, estima-se que cerca de 130 a 170 milhões de pessoas estejam infectadas (Perz *et al.*, 2004). Contudo, a precisão dos dados é bastante dificultada devido à ocorrência de formas assintomáticas das infecções agudas e crônicas. Considerando os dados utilizados para estimar a prevalência global em 2010, calcula-se que existam cerca de 400 mil indivíduos crônicos infectados na Austrália e Oceania, 14 milhões nas Américas, 16 milhões no Oriente Médio, 17.5 milhões na Europa, 28 milhões na África e 83 milhões na Ásia (Figura 1.5) (Lavanchy, 2011).

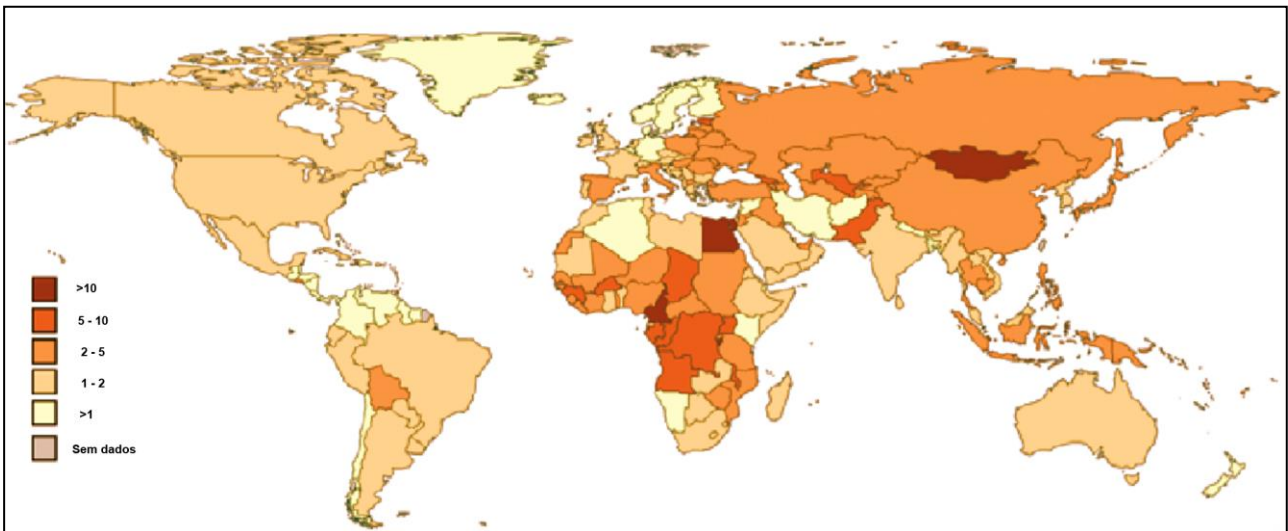


Figura 1.5: Prevalência global de infecção pelo HCV durante o ano de 2010. Valores em percentual (Lavanchy, 2011). Figura adaptada para o português.

A maioria dos estudos epidemiológicos nacionais, assim como em outros países, foi realizado com uma população específica, não sendo representativos do geral da população brasileira. Segundo o estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C no Brasil, coordenado pelo Ministério da Saúde, a prevalência do marcador sorológico anti-HCV teve uma média de 1,56%, na faixa etária de 20 a 69 anos, o que representa cerca de 3 milhões de pessoas portadoras do HCV (Ministério da Saúde, 2010). Ademais, enquanto a região Norte apresentou a maior prevalência de anti-HCV positivos, os dados da região Sul apontaram a menor prevalência desses indivíduos.

1.8. Hepatite C: Patogênese e Patogenia

O HCV tem tropismo pelo fígado (hepatotrófico), tendo o hepatócito como principal sítio de sua replicação. Apesar disso, o vírus pode se replicar em diferentes tipos de células, ocasionando assim, manifestações extra-hepáticas, como doenças autoimunes, doenças linfoproliferativas benignas ou malignas.

O fígado possui importante função no sistema imune do indivíduo, uma vez que os componentes da resposta inata ou adaptativa estão presentes ou são sintetizados por ele.

O HCV pode ocasionar lesão hepatocelular aguda, geralmente leve e assintomática. Contudo, na maioria dos casos, a infecção pelo HCV é caracterizada pela cronicidade em 70% a 80%, após um período igual ou superior a 6 meses de infecção. A persistência viral está relacionada com a alta taxa de mutação observada durante a replicação viral dando origem as *quasispecies*, principais responsáveis pelo escape do vírus frente à resposta imunológica (Bowen, 2005; Chen, 2005). Na maioria dos casos, este e outros mecanismos contribuem para que tanto a resposta humoral, como a celular seja ineficaz no combate a infecção pelo HCV (Thimme *et al.*, 2001; 2002). A compartimentalização de *quasispecies* em sítios extra-hepáticos também tem sido proposta como um mecanismo de persistência viral (Galossi *et al.*, 2007) e, segundo alguns estudos, pode ser um importante determinante, tanto na história natural da infecção, como nos resultados terapêuticos (Ducoulombier *et al.*, 2004; de Almeida *et al.*, 2009).

1.9. Hepatite C: Infecção pelo HCV

1.9.1. Infecção Aguda

Após o contato com o HCV, o período de incubação da infecção pode variar entre 2 e 25 semanas (média de 6 a 7 semanas). Os sintomas, quando aparecem, geralmente ocorrem após o pico sérico de aminotransferases entre a 6^a e a 12^a semana após a exposição ao HCV, tendo duração de cerca de 2 a 12 semanas.

Nesta fase, o indivíduo pode desenvolver um quadro de hepatite aguda, podendo apresentar formas clínicas assintomáticas ou oligossintomáticas. No primeiro caso, as manifestações clínicas estão ausentes, enquanto que no segundo, as manifestações são leves com os sinais e sintomas característicos da hepatite como febre, icterícia e colúria.

Durante o período da janela imunológica, compreendido entre o período do contágio com o vírus e o que antecede a detecção de anticorpos anti-HCV no sangue (soroconversão), pode ocorrer a transmissão do HCV, já que é uma fase em que somente uma pequena parcela apresenta algum tipo de sintoma, possibilitando o diagnóstico clínico.

A partir do contágio, geralmente a detecção de anticorpos anti-HCV se dá entre a 7^a e 9^a semanas. Contudo, a não produção de anticorpos ou produção tardia pode ocorrer em imunodeprimidos, casos de pacientes receptores de órgãos transplantados, pacientes em hemodiálise e pacientes com infecção pelo HIV (Boyer & Marcelin, 2000; Cheney *et al.*, 2000; Kamal, 2008). A presença do HCV-RNA pode ser detectada no soro na 2^a semana após a exposição ao vírus. Na fase aguda, o nível de HCV-RNA aumenta rapidamente e os sintomas podem persistir durante semanas. Entretanto, diminuem após o declínio da ALT/AST e dos níveis de HCV-RNA, não sendo mais detectados 6 meses após o início da infecção. Embora a infecção aguda pelo HCV possa ser grave, a falência hepática fulminante é rara (Farci *et al.*, 1996, Heller & Rehermann, 2005).

1.9.2. Infecção Crônica

A fase crônica caracteriza-se nos casos em que o agente etiológico permanece no hospedeiro após 6 meses do início da infecção. Os indivíduos nessa fase da infecção funcionam como reservatórios do vírus, tendo importância epidemiológica por serem os principais responsáveis pela perpetuação da transmissão.

Essa fase apresenta progressão lenta e gradativa. Devido aos sintomas inespecíficos ou da ausência de sintomas na fase aguda, geralmente, a doença é diagnosticada quando já está na fase crônica, muitas vezes após décadas do seu início. Deste modo, torna-se bastante comum que o diagnóstico específico seja realizado após testes sorológicos de rotina ou doação de sangue (Roth *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2000).

Os indivíduos com infecção crônica apresentam sinais histológicos compatíveis com hepatite. Outros indivíduos podem apresentar níveis séricos persistentes ou níveis de aminotransferases intermitentes, embora não apresentem sintomas de hepatite. Outros ainda, podem evoluir ao longo de 10 a 20 anos para a cirrose e o CHC. Nestes casos, os indicativos de progressão da doença são evidenciados através de dados clínicos, laboratoriais e/ou histológicos (Hoofnagle, 1997; Di Bisceglie, 1998). A aceleração da progressão da doença hepática crônica descompensada tem sido atribuída a diversos

fatores que envolvem o consumo excessivo de álcool, imunossupressão, idade avançada no período do contágio e coinfeção com HIV ou HBV (Alter *et al.*, 1998; Cheney *et al.*, 2000; Bonkovisky & Mehta, 2001; Lauer & Walker, 2001; Poynard *et al.*, 2003; Lo Re & Kostman, 2005; Thompson e Finch, 2005; Chen & Morgan, 2006; Ascione *et al.*, 2007; Modi e Liang, 2008). A cirrose hepática descompensada associada ao HCV é uma das principais indicações de transplante de fígado em todo o mundo (Adam *et al.*, 2003; Wiesner *et al.*, 2003), e a recorrência da infecção nos indivíduos transplantados é quase universal (Berenguer *et al.*, 2001; Gane, 2003) (Figura 1.6).

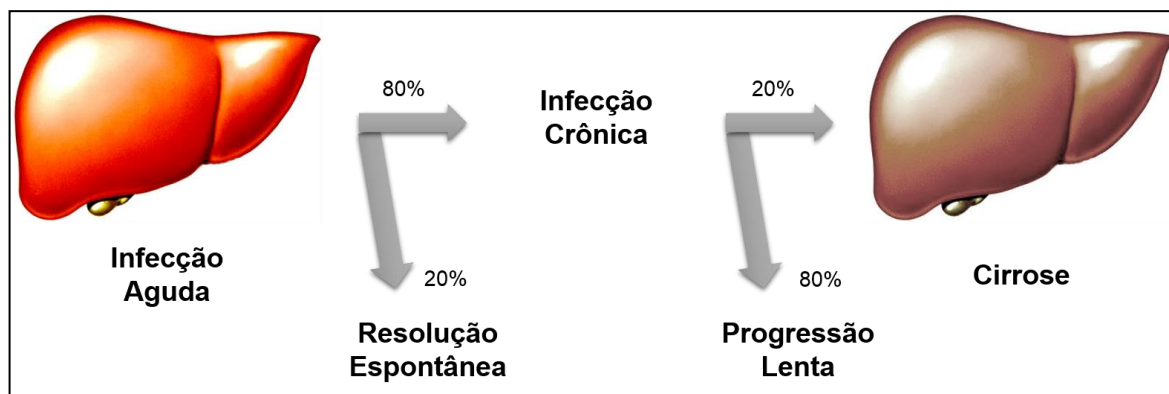


Figura 1.6: Representação esquemática do quadro evolutivo da infecção pelo HCV. Somente 20 a 30% dos indivíduos infectados têm cura espontânea, enquanto 80% evoluem para cronicidade (Lavanchy, 2011). Figura adaptada para o português.

1.10. Hepatite C: Diagnóstico

Desde a descoberta do HCV em 1989, houve muitos avanços nas abordagens laboratoriais utilizadas para o diagnóstico da infecção pelo HCV, nos quais alguns detectam os anticorpos ou os antígenos (sorológicos) e outros detectam o genoma da partícula viral circulante (moleculares).

Os testes sorológicos se baseiam na detecção de anticorpos anti-HCV no soro de pacientes infectados, através de técnicas imunoenzimáticas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) (Pawlotsky, 2002). Este teste pode ser aplicado entre 10 e 16 semanas a partir do início dos sintomas, que compreende o período em que a presença dos anticorpos anti-HCV geralmente se torna detectável.

Os testes de biologia molecular são utilizados para detectar a presença do ácido nucléico do vírus, no caso do HCV, o RNA. Os testes podem ser qualitativos (indicam a

presença ou ausência do vírus), quantitativos (indicam a carga viral) ou de genotipagem (indicam o genótipo do vírus) (MS, 2008a, b).

A detecção qualitativa do RNA viral é utilizada como um teste de diagnóstico visando confirmar a presença de infecção por HCV, sendo possível a partir do final da 1ª semana pós-infecção. Apesar de ainda ter um alto custo, a metodologia utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida pela transcrição reversa do RNA viral em DNA complementar (RT-PCR), devido a sua especificidade, rapidez e praticidade. Muitas vezes, a não detecção de RNA viral no soro pode significar baixa viremia e/ou persistência em tecidos extra-hepáticos (de Almeida *et al.*, 2007, Espírito-Santo *et al.*, 2013). Mais recentemente, tem sido estudada a infecção oculta pelo HCV, que é caracterizada pela não detecção de HCV-RNA no soro. Além disso, em muitos indivíduos infectados os níveis de transaminases são normais (MS, 2008a, b).

O teste molecular quantitativo do RNA viral é destinado à quantificação do HCV-RNA no plasma humano, isto é, consiste em determinar a carga viral do paciente. É utilizado em conjunto com a apresentação clínica e com outros marcadores laboratoriais, como um meio de auxílio para a determinação na duração e tipo de terapia. Além disso, auxilia na avaliação da resposta viral à terapêutica antiviral (MS, 2008a, b).

Outro teste molecular importante no diagnóstico da infecção pelo HCV é o teste de determinação do genótipo infectante. Assim como a detecção quantitativa, a genotipagem é muito importante não só na escolha do regime terapêutico, mas também para prever o resultado do tratamento antiviral, uma vez que genótipos diferentes respondem de maneira diversa a terapia com IFN (McHutchison *et al.*, 1998, Poynard *et al.*, 1998). Existem vários métodos disponíveis para a genotipagem do HCV baseados na amplificação com PCR. A técnica padrão-ouro é o sequenciamento direto de nucleotídeos, seguido pelo alinhamento de sequências junto com sequências padrão e análise filogenética (Sandres Sauné *et al.*, 2003).

1.11. Hepatite C: Tratamento

Não há ainda uma vacina contra o HCV e, desde 2003, o tratamento padrão dos pacientes portadores de hepatite é a combinação do interferon convencional (IFN) ou peguilado (PEG-IFN) com a ribavirina (RBV) (Holmes *et al.*, 2012).

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, revisto e estabelecido pelo Ministério da Saúde, Portaria SVS/MS nº 221 de

julho de 2011, os critérios de resposta virológica para avaliação do tratamento, resumidamente, são: a Resposta Virológica Rápida (RVR) é definida como carga viral indetectável (abaixo do limite inferior de detecção do teste diagnóstico) na 4ª semana de tratamento; a Resposta Virológica Precoce (RVP) é definida como a queda de pelo menos duas escalas logarítmicas (2 Log) ou sua indetectação na 12ª semana de tratamento; a Resposta Virológica Sustentada (RVS) é definida como a não detecção do HCV-RNA em 6 meses após o fim do tratamento; a Recidiva Virológica (recidivantes) é definida como HCV-RNA indetectável ao final do tratamento mas detectável 24 semanas após o término do tratamento; e o Não Responder (NR), que é definido como o indivíduo que não apresenta queda de pelo menos 2 Log do valor do HCV-RNA pré tratamento na 12ª semana de tratamento.

Ademais, na terapia com PEG-IFN/RBV, os pacientes infectados pelo genótipo 1 requerem 48 semanas de tratamento e a RVS ocorre em apenas 40 a 50% dos casos, já na infecção com os genótipos 2 e 3 taxas de 70 a 80% de RVS são observadas após 24 semanas de tratamento (Feld *et al.*, 2007).

Atualmente novas terapias tem sido desenvolvidas para o tratamento da infecção pelo HCV. São cerca de 40 novos inibidores em fase de ensaios clínicos, dentre os quais têm se destacado os agentes antivirais de ação direta (Direct-Acting Antiviral Agents - DAA) (Lee *et al.*, 2011). Os DAAs agem diretamente em etapas essenciais do ciclo replicativo do HCV como a entrada do vírus nos hepatócitos, a tradução do RNA e a replicação propriamente dita (Poordad *et al.*, 2011). As enzimas virais NS3 serina protease e NS5B RpRd são os principais alvos para o desenvolvimento das novas estratégias terapêuticas anti-HCV apresentando um amplo número de inibidores em desenvolvimento clínico (Vermehren & Sarrazin 2011). O Telaprevir (TVR) e o Boceprevir (BOC) são DAAs que já foram aprovados pela ANVISA, e são inibidores de protease (IPs) que bloqueiam a NS3/4a resultando na inibição da replicação viral. Outros inibidores virais com aprovação da ANVISA também estão disponíveis no mercado brasileiro, como o sofosbuvir (análogo nucleotídeo que inibe a polimerase do HCV), simeprevir (inibidor de protease de segunda geração), daclatasvir (inibidor da NS5A) e a combinação de alvos virais ombitasvir, veruprevir, ritonavir e dasabuvir (AASLD, 2014; Kohli *et al.*, 2014; Summers *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015).

Diversos estudos comprovaram que resposta antiviral está relacionada a mecanismos multifatoriais (Pawlotsky, 2000) e, dentre estes, estariam os fatores virais (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002), os relacionados com a doença (Fried *et al.*, 2002; Manns *et al.*,

2001) e os do próprio hospedeiro (Buti *et al.*, 2002; De Maria *et al.*, 2002; Dev *et al.*, 2002). Os principais fatores associados com boa resposta ao tratamento antiviral são o genótipo viral, baixa carga viral, fibrose hepática ausente ou discreta, gênero feminino e idade inferior a 40 anos, índice de massa corporal normal, parâmetros laboratoriais (plaquetas, Hb, histologia, etc), etnia e fatores genéticos.

1.12. Fatores Preditivos do Vírus e Hospedeiro

Além da eficácia limitada do tratamento, o mesmo tem um alto custo e numerosos efeitos colaterais que, em alguns casos, exige uma redução na dose e/ou o término prematuro do tratamento (Ahlenstiel *et al.*, 2010). Além disso, como a terapia antiviral padrão é genótipo específica, nem todos os pacientes infectados conseguem alcançar a RVS. Desta forma, a identificação de fatores preditivos da RVS é de suma importância para os programas de tratamento antiviral.

Recentemente diversos estudos demonstraram que tanto fatores virais quanto fatores do hospedeiro apresentam um papel fundamental na resposta ou não ao tratamento. Entre os fatores virais definidos como preditivos da RVS está o genótipo viral. Na terapia com PEG-IFN/RBV os genótipos 1 e 4 encontram-se associados a taxas mais baixas de RVS (41 a 52%), quando comparados com os tipos 2 e 3 (76 a 84%) (Manns, 2004). Na terapia com os inibidores de protease, o subtipo 1b responde melhor do que o subtipo 1a. A alta carga viral pré-tratamento também é um importante fator preditivo viral de uma resposta virológica ineficiente (Akuta *et al.*, 2005, 2007, 2010 e 2012). Além disso, diversos estudos mostram que mutações na sequência do HCV também estão relacionadas com a RVS. Substituições de aminoácidos (aa) nas posições 70 e/ou 91 na região do core de HCV em pacientes infectados com genótipo 1b e com altas cargas virais são fatores preditivos de resposta virológica ineficiente a terapia antiviral (Akuta *et al.*, 2005, 2007, 2010 e 2012), assim como, variações na sequência da região NS5A, denominada de ISDR (Região Determinante de Sensibilidade ao IFN), também estão relacionadas com a não resposta ao tratamento (Enomoto *et al.*, 1995 e 1996). Mutações específicas em diferentes posições do genoma viral têm sido associadas com diminuição da atividade antiviral aos novos agentes DAAs.

Entre os fatores do hospedeiro considerados importantes no prognóstico do resultado do tratamento da hepatite C, diversas variações genéticas encontradas nos genes da interleucina 28B (IL28B) e da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) estão fortemente

associadas com a RVS e com a cura espontânea do HCV, e a proteção contra a anemia hemolítica, respectivamente.

No sistema imune inato, a família das interleucinas, o fator de necrose tumoral e os membros da família do IFN (IFN-I), IL28A/B e IL29 foram apontados em exercer influência sobre a resposta à terapia antiviral e/ou sobre a resolução espontânea da infecção. Exceto para a IL28B, nenhum destes revelou-se significativamente associado com a resposta à terapia antiviral e com a resolução da infecção aguda. As variações genéticas no gene IL28B em associação com a cura espontânea da doença, pode ser explicado pela resposta imune inata do hospedeiro. O gene da IL28B codifica o IFN- λ 3, o qual está envolvido no controle de infecções virais, incluindo a infecção pelo HCV (Marcello *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009). Os IFNs se ligam a receptores da superfície celular e ativam a cascata de sinalização celular JAK-STAT, levando assim, à indução de genes estimulantes de IFN (*Interferon-Stimulated Genes* - ISG), um mecanismo pelo qual o IFN suprime as infecções virais (Sheppard *et al.*, 2003; Feld *et al.*, 2005; Siren *et al.*, 2005; Marcello *et al.*, 2006; Ahlenstiel *et al.*, 2010). No contexto da infecção crônica pelo HCV, dados demonstram que o gene IL28B está associado com a resposta ao tratamento, sugerindo que o IFN- λ 3 não é simplesmente um meio alternativo de induzir a via JAK-STAT. Estudos realizados *in vitro*, demonstraram que o IFN- α induz a expressão dos genes de IFN- λ , que por sua vez, inibe a replicação do HCV por meio do sinal de transdução/ISG que distingue da via de IFN- α . Em adição, estes dados sugerem que o IFN- λ está envolvido na resposta imune inata precoce do hospedeiro ao HCV, podendo explicar o efeito observado na eliminação espontânea da doença (Feld *et al.*, 2005; Siren *et al.*, 2005; Marcello *et al.*, 2006).

Ao longo dos últimos anos, muitos estudos de associação ampla de genomas (*Genoma Wide Associations Studies* - GWAS) foram realizados com sucesso em uma variedade de áreas, dos quais cerca de 2% se relacionaram com a hepatologia. Essa ferramenta é útil para avaliar a possível associação entre a variação genética ao longo do genoma humano e o fenótipo de interesse (Karlsen *et al.*, 2010). Diversos estudos utilizando essa metodologia identificaram polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) localizados próximo ao gene IL28B associados com resposta à terapia antiviral com PEG-INF/RBV (Ge *et al.*, 2009; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2010; Rauch *et al.*, 2010). No total, foram identificados 14 SNPs (rs12980275, rs8105790, rs11881222, rs8103142, rs28416813, rs4803219, rs12979860, rs10853727, rs8109886, rs8099917, rs7248668, rs12972991, rs4803223 e rs12980602)

sendo que os dois SNPs que apresentaram uma maior associação com resultado terapêutico da infecção pelo HCV foram: rs8099917 e rs12979860, localizados 8 e 3 kb antes do gene IL28B, respectivamente. A figura 1.7 apresenta esquematicamente a posição destes SNPs no cromossoma humano 19.

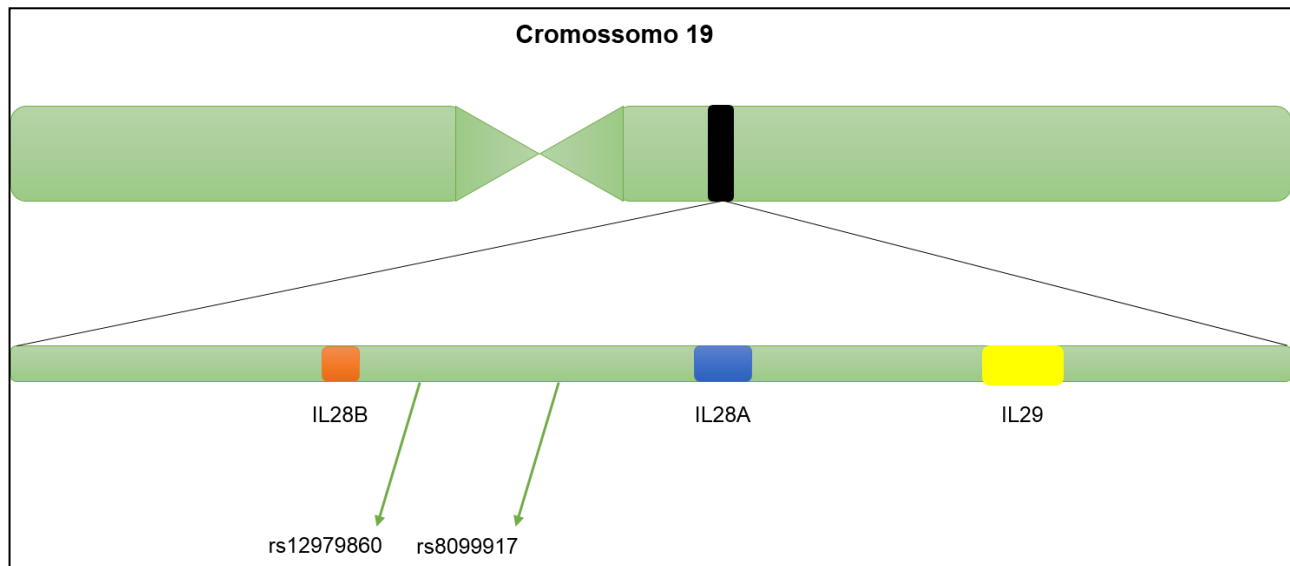


Figura 1.7: Localização dos SNP associados com resposta ao tratamento antiviral no gene IL28B no cromossoma humano 19 (Ahlenstiel *et al.*, 2010).

Suppiah e colaboradores (2009), Tanaka e colaboradores (2010) e Rauch e colaboradores (2010) identificaram o rs8099917 como o SNP com forte associação com a RVS em pacientes europeus, japoneses e suíços, respectivamente. Ge e colaboradores (2009) e McCarthy e colaboradores (2010) identificaram o SNP rs12979860 com forte associação com a RVS. Os genótipos possíveis para o rs8099917 são: TT, TG e GG, enquanto que para o rs12979860 são: CC, TC e TT. O rs8099917 com o alelo G vem sendo denominado de "alelo de risco", visto que, a presença de pelo menos uma base G em um dos alelos já é o suficiente para aumentar significativamente a taxa de falha no tratamento. Estudos sobre o rs12979860 relataram que pacientes com o genótipo CC apresentaram uma taxa de RVS maior do que os com o genótipo de TT, indicando que a frequência deste alelo está associado com melhores taxas de RVS (Mangia, 2011).

Como estes SNPs estão bastante distantes do gene IL28B, o papel funcional direto destes polimorfismos na expressão gênica ou função é incerto. Dois trabalhos relataram que o alelo de risco G do rs8099917 foi associado com baixa expressão de IL28A/B, enquanto outros também identificaram dois SNPs na região do promotor do gene da

IL28B em 97% dos indivíduos portadores do alelo de risco no SNP rs8099917. Portanto, indivíduos que carregam alelos de risco do rs8099917 são altamente susceptíveis de transportar polimorfismos no promotor ou na região codificante do IL28B e alterar a expressão e/ou a função do IL28B resultando em baixos níveis de expressão do IFN- λ (Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009).

Além da associação com o resultado no tratamento, outros grupos investigaram o impacto do polimorfismo da IL28B sobre o curso clínico da infecção pelo HCV. Thomas e colaboradores (2009) e Montes-Cano e colaboradores (2010) examinaram o papel do IL28B na resolução espontânea da infecção pelo HCV e observaram uma forte correlação do SNP rs12979860 respondedor (genótipo CC) com resolução da infecção. McCarthy e colaboradores (2010) descreveram uma associação do genótipo CC do rs12979860 com respondedores ao tratamento antiviral e com baixos níveis de HCV-RNA na fase pré-tratamento. Montes-Cano e colaboradores (2010) encontraram uma associação do genótipo respondedor do rs12979860 com altos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e com baixos valores de gama glutamiltransferase (γ GT), enquanto que, Abe e colaboradores (2010) sugeriram que o alelo respondedor do rs8099917 foi associado com baixos níveis de γ GT e menor atividade inflamatória no fígado. Li e colaboradores (2010) observaram que os níveis de colesterol total, do colesterol LDL e de apolipoproteína B foram significativamente maiores em indivíduos com o genótipo CC do rs12979860, comparado com os indivíduos que possuíam o genótipo CT ou TT. A razão para esta investigação foi a forte associação entre hepatite C crônica e baixos níveis de LDL e a ligação entre a terapia com IFN e um declínio do LDL no soro. Eurich e colaboradores (2010) relataram que o rs8099917 influencia os níveis inflamatórios bioquímicos e histológicos, mas não a progressão para fibrose, em pacientes transplantados com infecção recorrente pelo HCV. Os mecanismos causadores destes achados supracitados não são muito claros, mas enfatizam o papel fundamental do IL28B na modulação da patogênese do HCV e da resposta do hospedeiro.

Em 2011, ocorreu a introdução de dois IPs de primeira geração, o BOC e o TVR, sendo um passo importante para o tratamento dos pacientes infectados com HCV. Associado a terapia anteriormente já estabelecida com PEG-INF/RBV, estas duas drogas aumentam a chance de cura para os pacientes virgens de tratamento em 30% (Jacobson *et al.*, 2011; Poordad *et al.*, 2011; Sherman *et al.*, 2012; Wendt *et al.*, 2014). Em pacientes que falharam anteriormente com a terapia com PEG-INF/RBV, o genótipo do IL28B é menos informativo para o resultado da terapia baseada no TVR e/ou BOC. A introdução

dos IPs BOC e TVR representou um avanço significativo para o tratamento de HCV-1. No entanto, ambas as drogas são muito caras e, estudos indicam que pode ser possível o tratamento em que a primeira linha terapêutica apresenta um melhor custo e menos efeitos colaterais (Gellad *et al.*, 2012; Homes *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Cammà *et al.*, 2013). Pesquisadores debateram também, a possibilidade da cura da hepatite C com terapias livres de IFN (Holmes *et al.*, 2012).

Com a introdução dos antivirais de ação direta (DAA), a associação entre a genotipagem da IL28B e resposta ao tratamento é claramente atenuada devido à adição de medicamentos mais potentes (Gordon *et al.*, 2011; Holmes *et al.*, 2012). Entretanto, diversos estudos clínicos têm validado esses achados e, a genotipagem da IL28B tornou-se uma ferramenta importante para auxiliar na tomada de decisões clínicas relativas ao regime terapêutico mais adequado. Além disso, a genotipagem IL28B tem mostrado que podem ser úteis como uma abordagem DAA de primeira geração para a identificação de pacientes que podem ser tratados com sucesso com um regime de tratamento mais curto e mais simples (Jacobson *et al.*, 2011; Poordad *et al.*, 2011). Além disso, o impacto do genótipo IL28B CC (rs12979860) foi observado em pacientes infectados com HCV-1 submetidos a terapia livre de IFN (58-84% entre os pacientes com IL28B CC vs 33-64% entre os pacientes com genótipos não-CC) (Chu *et al.*, 2011; Zeuzem *et al.*, 2012, 2013). Desta forma, a genotipagem do IL28B pode permanecer útil se usado para individualizar as estratégias de tratamento, identificar os pacientes que podem ser tratados com sucesso com regimes mais curtos, mais simples ou mais baratos.

Outro gene que também vem sendo avaliado mais recentemente é o da ITPA, que tem sido relacionado com proteção contra a anemia hemolítica induzida pela RBV. O gene ITPA codifica a inosina trifosfatase (ITPase) que catalisa a conversão de trifosfato de inosina (ITP) para monofosfato de inosina (IMP) e pirofosfato (Pi), e desta forma, o ITP não se acumula nas células normais. O ITP é usado para manter o trifosfato de adenosina (ATP) dos glóbulos vermelhos, evitando assim o estresse oxidativo. A deficiência de ITPase interrompe este ciclo, conduzindo assim a uma acumulação de ITP nas células (Cao & Hegele, 2002; Maeda *et al.*, 2005). A ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um análogo de nucleosídeo sintético e tem ações *in vitro* contra muitos vírus (Patterson *et al.*, 1990) e tem sido utilizado em combinação com IFN durante o tratamento anti-viral. A RBV é incorporada nos eritrócitos onde sofre fosforilação para as suas formas farmacologicamente ativas através de adenosina-quinase. A ribavirina trifosfato é incapaz de atravessar a membrana celular dos eritrócitos e acumula

intracelularmente, causando assim, dano oxidativo e conduzindo à hemólise (Kowdley *et al.*, 2005). A deficiência de ITPase provoca uma acumulação de ITP nas células vermelhas do sangue que pode competir com a RBV trifosfato, protegendo assim da hemólise induzida pela RBV (Shipkova *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). Não se sabe ao certo como o ITP protege os eritrócitos da hemólise causada pela RBV, entretanto especula-se que o mesmo pode evitar o acúmulo de RBV nos eritrócitos ou ainda pode agir diretamente impedindo que ocorra a hemólise (Ochi *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2011).

A anemia (definida como tendo valores de Hb <10 g/dL e/ou como um declínio superior a 2 g/dL em relação aos valores basais) é um efeito colateral e extremamente prejudicial na terapia antiviral dupla com PEG-IFN/RBV, sendo necessária reduções na dose de RBV em até 38% dos pacientes (Hadziyannis *et al.*, 2004). Da mesma maneira, a anemia é o efeito colateral hematológico mais importante na terapia tripla, com a incorporação de um inibidores de protease (TVR ou BOC), onde a redução de RBV é maior, considerando que a queda de Hb são ainda maiores em pacientes tratados com TVR do que tratados com BOC (Hézode *et al.*, 2009; Kwo *et al.*, 2011). Geralmente o quadro de anemia é reversível e dose-dependente. A idade, o sexo feminino, os níveis basais de plaquetas e de hemoglobina (Hb) também foram relatados como fatores capazes de influenciar a anemia induzida pela RBV (Ochi *et al.*, 2010).

Segundo Fellay e colaboradores (2010), polimorfismos no gene da ITPA, localizado no cromossomo 20, podem influenciar o desenvolvimento da anemia induzida pela RBV, através da redução da atividade da ITP-ase. A redução da atividade de ITP-ase tem sido documentada por dois polimorfismos: um localizado no segundo exon (rs1127354, resultando em uma substituição de prolina para treonina - P32T) e um localizado no segundo intron (rs7270101) (Figura 1.8) (Fellay *et al.*, 2010). Ambos os SNPs afetam a expressão do ITPA. Pacientes infectados pelo genótipo 1 que carregam o genótipo CC no rs1127354 são mais propensos em desenvolver a anemia do que os que carregam os genótipos CA/AA; enquanto que, no rs7270101 a redução de Hb é maior em pacientes com o genótipo AA do que com os genótipos AC/CC (Suzuki *et al.*, 2011). Portanto, ambos os SNPs desempenham papel importante na proteção dos pacientes contra a anemia induzida pela RBV. Por outro lado, os polimorfismos do ITPA não foram associados a RVS, embora o tamanho das amostras de alguns estudos pode ter sido muito pequeno.

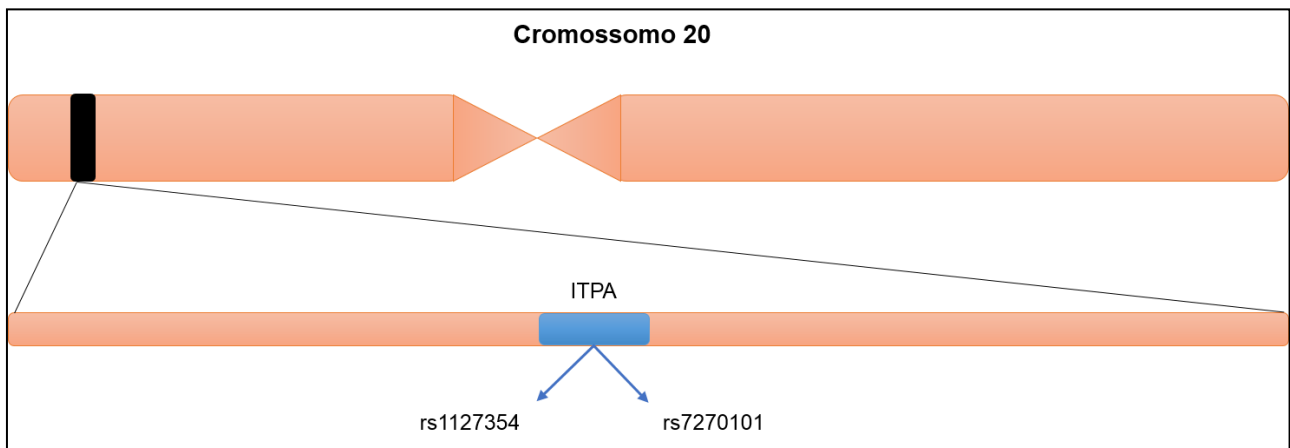


Figura 1.8: Localização dos SNP associados com a anemia induzida pela ribavirina no gene ITPA no cromossoma humano 20 (Ahlenstiel *et al.*, 2010).

Outro aspecto importante a ser estudado é a variação genética dos polimorfismos nas diferentes etnias. Diversos estudos englobando indivíduos com ancestralidade europeia, africana e asiática demonstraram que a frequência do genótipo respondedor CC (rs12979860) da IL28B é maior em indivíduos com ancestralidade europeia do que em indivíduos de descendência africana, o que poderia explicar, pelo menos em parte, porque as taxas de resposta ao PEG-INF/RBV são melhores entre as populações de origem europeia em relação às de descendência africana. No ITPA, os genótipos CC/CA no rs1127354 são encontrados em menor frequência na população caucasiana (6%) do que na oriental (16%). Por outro lado, os genótipos CA/CC do rs7270101 são encontrados em 13% dos brancos, porém não foram detectados em orientais (Suzuki *et al.*, 2011).

Sendo assim, diferentes polimorfismos em ambos os genes precisam ser examinados em pacientes na população brasileira para obtenção de resultados nacionais.

II. JUSTIFICATIVA

Segundo dados do Ministério da Saúde, o total de casos confirmados no Brasil para hepatite C é de, aproximadamente, 61 mil casos entre 1999 a 2009 e o gasto médio do governo com medicamento pode variar de 2 a 20 mil reais por tratamento/paciente, dependendo do genótipo infectante. A eficácia da terapia contra a hepatite C crônica evoluiu bastante com a utilização do PEG-INF/RBV, e apesar das novas estratégias de tratamento, a genotipagem do IL28B ainda permanece útil para individualização dos regimes terapêuticos, pois não está relacionada somente com a terapia convencional, mas também se mostrou útil na abordagem dos DAAs de primeira geração, uma vez que identifica os pacientes que podem ser tratados com um tratamento mais simples, curto e ainda assim, obter sucesso na resposta à terapia. Pacientes submetidos à terapia tripla com BOC ou TVR e que apresentam o genótipo favorável, foram elegíveis para tratamento com duração mais curta, em comparação com aqueles que não apresentavam. Assim, na terapia livre de IFN, o efeito do genótipo favorável do IL28B também foi demonstrada em pacientes infectados com o genótipo 1 do HCV (58-84% dos pacientes com genótipo CC vs. 33-64% dos pacientes com genótipos não-CC) (Zeuzem *et al.*, 2012; 2013).

Na experiência do Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Gaffré-Guinle (HUGG) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), grande parte dos pacientes que se encontram em tratamento antiviral apresentam redução do nível de Hb durante o tratamento, alguns dos quais necessitaram de redução da dose dos antivirais, tendo de fazer uso de eritropoetina. O problema da anemia relacionada ao tratamento é tão importante que, a abordagem hematológica está contemplada na Portaria vigente (nº 34, de 28 de setembro de 2007) que dispõe sobre o protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para a Hepatite C (DOU 09 de outubro de 2007). Logo, a genotipagem do ITPA pode ajudar na decisão dos médicos em relação à terapia antiviral, especialmente naqueles com alto risco de desenvolver anemia hemolítica ou morbidade decorrente da mesma (Thompson *et al.*, 2010). Devido a maioria das pesquisas serem realizadas nos EUA, na Europa e na Ásia, há uma escassez de estudos relatando a distribuição de diferentes genótipos de ITPA para a população latino-americana, bem como a importância do ITPA variantes em relação à anemia induzida por RBV.

A caracterização dos genótipos de ambos os genes beneficia não só os pacientes, mas também o Sistema Único de Saúde (SUS) pela utilização racional dos

medicamentos. Ainda não há uma metodologia padronizada para a determinação dos perfis alélicos dos SNPs de ambos os genes mencionados, que estejam disponíveis para os Laboratórios de Saúde Pública (LACEN). Assim sendo, é de grande importância o desenvolvimento de diferentes metodologias que possam oferecer subsídios na identificação desses fatores preditivos, avaliando custo-benefício, duração de execução e inovação tecnológica. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos próprios para a determinação do perfil alélico humano dos SNPs nos genes da IL28B poderá proporcionar uma diminuição dos gastos com a importação de kits tendo em conta os elevados custos dos atuais programas de tratamento custeados pelo Ministério de Saúde.

Diante do exposto, este projeto de tese foi desenhado para melhor avaliar os dois maiores desafios do atual tratamento antiviral da hepatite C crônica: o primeiro relacionado com a identificação dos fatores preditivos da resposta terapêutica e o segundo relacionado com o principal efeito adverso hematológico que pode resultar na redução da dose dos medicamentos antivirais ou mesmo na sua interrupção.

III. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Determinar o perfil alélico dos genes IL28B e ITPA de pacientes com hepatite C, e avaliar a associação dos polimorfismos do gene IL28B com a resolução espontânea e terapêutica da infecção e do gene da ITPA com a redução dos níveis de hemoglobina durante o tratamento antiviral.

3.2. Específicos

- Determinar o perfil alélico humano dos genes da IL28B (rs8099917 e rs12979860) por RFLP, ARMS-PCR e qPCR.
- Comparar os resultados obtidos pelos protocolos desenvolvidos com a técnica de sequenciamento direto do produto da PCR.
- Avaliar a associação dos polimorfismos do gene IL28B (rs8099917 e rs12979860) com a resolução espontânea da infecção pelo HCV.
- Avaliar a associação dos polimorfismos do gene IL28B (rs8099917 e rs12979860) com o resultado do tratamento com PEG-INF/RBV.
- Avaliar a associação dos polimorfismos do gene ITPA (rs1127354 e rs7270101) com a redução dos níveis de hemoglobina durante o tratamento antiviral.
- Avaliar a influência dos fatores clínico-laboratoriais, incluindo o polimorfismo da ITPA, com o desenvolvimento de anemia grave (Hb < 10g/dL) durante o tratamento.

IV. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese serão apresentados na forma de manuscritos, sendo dois aceitos e um submetido para publicação em revistas científicas indexadas. Os artigos estão listados a seguir na ordem em que foram publicados e que serão discutidos:

4.1. Artigo 1. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Lampe E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods*. 2015; 220:1-4 (doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.001).

4.2. Artigo 2. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Villar LM, Coelho HS, Esberard EC, Flores PP, Brandão-Mello CE, Villela-Nogueira CA, de Almeida AJ, Lampe E. ITPA allele's frequency and association with ribavirin-induced anemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic Hepatitis C. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Jul 7:0. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26154744

4.3. Artigo 3. Delvaux N, de Almeida AJ, da Costa VD, da Costa MM, Sousa PSF, Lewis-Ximenez LL, Brandão-Mello CE, Coelho HS, Villela-Nogueira CA, Lampe E. Evaluate of IL28B polymorphisms with sustained virologic response in chronic hepatitis C patients. Submetido para ser considerado para publicação como artigo completo na revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases* em 16/07/2015 conforme e-mail confirmatório de recebimento do artigo do anexo I.

Durante o período de doutorado, foram ainda realizados dois outros trabalhos em colaboração que são exibidos em anexo:

Anexo II. Delvaux N, Paula VS, Espírito-Santo MP, Silva EF, Miguel JC, Oliveira JC, Silva AS, Vieira YR, Lampe E, Villar LM. Knowledge about viral hepatitis among participants of Gay Pride Event in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2013; 17(3):377-8 (doi: 10.1016/j.bjid.2012.09.015).

Anexo III. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini

DA, Fujishima MA and Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013; 18(3PtB):435-44 (doi: 10.3851/IMP2606).

4.1. Artigo 1. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Lampe E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods*. 2015; 220:1-4 (doi: 10.1016/j.jviromet.2015.04.001).

Parte do presente artigo foi apresentado como tema livre no evento científico internacional “15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Diseases (ISVHLD)”, realizado em Berlim, no período de 26 a 28 de junho de 2015. O trabalho intitulado “*A simple, fast and cost-effective method to genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients* (Nathália Delvaux, Vanessa Duarte da Costa, Maristella Matos da Costa, Elisabeth Lampe)” foi apresentado em forma de pôster.



1 Short communication

2 Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in
3 chronic hepatitis C patients

4 Nathália Delvaux^a, Vanessa Duarte da Costa, Maristella Matos da Costa, Elisabeth Lampe

5 ^a Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Avenida Brasil, 465 – Mangueiras, Cidade, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18

ABSTRACT

Background: Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the interleukin 28B (IL28B) gene are associated with viral clearance and treatment response in hepatitis C virus (HCV) infection; however, most of the available SNP genotyping methods are expensive.

Aims: This study sought to evaluate the cost effectiveness of four methods used to genotype the rs12979860 and rs8099917 SNPs of the IL28B gene.

Methods: Tetra primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), quantitative (q) PCR and direct sequencing methods were evaluated in terms of specificity, cost and run time in 281 blood samples obtained from chronic HCV patients.

Results: In ARMS-PCR method, the primers designed to target both SNPs produced PCR fragments of specific sizes that distinguished the alleles of rs12979860 and rs8099917. In RFLP, the band profile allowed the distinction between genotypes. The qPCR was the faster and easier to perform. Validation by nucleotide sequencing showed 100% agreement among the three methods. The cost for a single reaction was lowest for ARMS-PCR, followed in turn by RFLP, qPCR and sequencing.

Conclusions: The methodology described for the ARMS-PCR showed the most favorable cost–benefit ratio. Moreover, this approach is fast and simple, requiring only equipment that is commonly used in molecular diagnosis, which is an essential parameter for use in developing countries where laboratories have scarce financial resources.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

19 The treatment of chronic hepatitis C virus (HCV) infection,
20 despite recent progress following the introduction of direct-acting
21 antiviral (DAA) regimens, remains a great challenge in terms of
22 cost effectiveness. Thus, the rapid identification of sustained viro-
23 logic response (SVR) predictors remains a major target in HCV
24 research. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) rs12979860
25 and rs8099917, in close proximity to the interleukin 28B (IL28B)
26 gene, have reported associations with viral clearance and treatment
27 response to HCV infection (Ge et al., 2009; Tanaka et al., 2009). The
28 IL28B gene encodes interleukin 28B, a cytokine belonging to the IFN-
29 λ family that is involved in the regulation of the immune response
30 against viral infections (Dellgren et al., 2009; Li et al., 2009). The SVR
31 rate with PEG-IFN α 2B therapy in HCV-1 infected patients is two-
32 fold higher in individuals with the rs12979860 CC genotype than

the CT or TT (70–80% vs. 30–40%) (Chen et al., 2011; Thompson et al.,
2010). Similarly, the SVR is higher in individuals with the rs8099917
TT genotype compared to the TT or GT + GG genotype (81% vs. 59%)
(Sakamoto et al., 2011). Several clinical studies have validated these
findings and, IL28B genotyping has become an important tool to
assist in clinical decisions regarding the most appropriate thera-
peutic regimen. Furthermore, IL28B genotyping has shown that it
may be useful as a first-generation DAA approach for identifying
patients who can be treated successfully with a shorter and simpler
treatment scheme (Jacobson et al., 2011; Poordad et al., 2011).
Additionally, the impact of the IL28B CC genotype (rs12979860)
was observed in HCV-1a infected patients undergoing IFN-free
combination therapy (58 to 84% among patients with IL28B CC vs.
33 to 64% in patients with non-CC genotypes) (Chu et al., 2011;
Zeuzem et al., 2012, 2013).

IL28B genotyping can be determined using diverse methods,
such as DNA sequencing, Taqman assays, PCR-RFLP, and DNA
high performance liquid chromatography (DHPLC) (Piorina et al.,
2012; Medrano and de Oliveira, 2014). These methods have

* Corresponding author. Tel.: +55 21 2562 1884.
E-mail addresses: nathal@ioc.fiocruz.br, nathaliad@iabioc.com.br
(N. Delvaux).

Table 1
Primers used in the tetra-primer ARMS-PCR and RFLP techniques.

SNP	Primer	Primer sequence (5'–3')	T _m (°C)	Amplicon (bp)
Tetra-primer ARMS-PCR rs12979860	ARMS308F1 (Forward outer)	CGA GGG CCC CTA ACC TCT GCA CAG TCT G	75.0	277
	ARMS308B1 (Reverse outer)	CTA TGT CAG CGC CCA TTC CTA CCA C	75.0	
	ARMS308F2 (Forward inner)	ACT GAA CCA GGG ACG TCC CCG AAG GAG T	75.0	198
	ARMS308B2 (Reverse inner)	CGG ACT GCA ATT CAA CCC TCC TCC G	75.0	132
rs809917	ARMS917F1 (Forward outer)	CAT CAC CTA TAA CTT CAC CTT CTT CTT C	65.0	437
	ARMS917B1 (Reverse outer)	GGT ATT AAC CTT ACT TCA AAT TAT CTT A	65.0	
	ARMS917F2 (Forward inner)	CTT TGG TTT TCT TTT CAG TGA GCA GTC	65.0	197
	ARMS917B2 (Reverse inner)	TAT ACA GCA TGC TTC CAA TTT GGG TAA A	65.0	295
RFLP and sequencing rs12979860	R80F (Forward)	GCT TAT GGC ATA GCG CTA GG	60.0	242
	R80R (Reverse)	AGG CTC AAG GTC AAT CAC AG	60.0	
rs809917	S17F (Forward)	TCA CCA TCC TCC TCT CAT CC	60.0	530
	S17R (Reverse)	ACC CTC TCC CTT TCC TTT AG	58.0	

different characteristics, including equipment needs, cost and technical knowledge. However, some of the methods are excessively expensive, and their high cost of implementation limits their use, especially in developing countries (Ferreira et al., 2013; Calzavara et al., 2011; Medrano and de Oliveira, 2014). Aiming to obtain a cheap and simple test to determine IL28B genotype, in-house protocols for tetra-primer amplification, refractory mutation system-polymerase chain reaction (ARMS-PCR) and for restriction fragment length polymorphism (RFLP) were optimized in this study. Commercial qPCR method was also used and direct sequencing was used to validate these techniques. Additionally, the four methods used to determine the IL28B polymorphisms (rs12979860 and rs809917) in patients with HCV infection were evaluated in terms of specificity, cost and run time.

ARMS-PCR, RFLP, quantitative (q) PCR and direct sequencing methods were carried out in 281 blood samples (108 males, aged 56.0 ± 10.9 years) obtained from chronic HCV patients (positive anti-HCV antibody and detectable HCV RNA in serum samples of patients with infection for more than 6 months). The local ethical Committee (CEP/UP 207/450) approved this study. Genomic DNA was extracted from 200 µl of whole blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's directions, and stored at -20 °C.

In ARMS-PCR assay, to design the primers to target the two SNPs, we used the program developed by Yu et al. (2001), available at <http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>. The limiting of fragment sizes was chosen within the range of 100–300 bp with a ratio of allelic bands of 1.5. Default settings were used for the other parameters. For rs12979860, the forward primer (F1 800) was designed to hybridize to the genomic sequence with the T allele, and the reverse primer (R1 800) was designed to hybridize with sequences containing the C allele. The same procedure was conducted for rs809917 (F1 917 inner – C allele, R1 917 inner – T allele). The primers designed for ARMS-PCR assay are shown in Table 1. PCRs for both SNPs were performed in a volume of 20 µl. Different amplification conditions (annealing temperatures, PCR cycle protocols and primer concentrations) were assessed to ensure proper formation of all the fragments. For rs12979860 the most appropriated PCR conditions were: 95 °C for 15 min followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 64 °C for 30 s, 72 °C for 1 min and 72 °C for 10 min. For rs809917, the best results were obtained with annealing temperature of 55 °C using the same cycling conditions. The PCR products were separated by standard electrophoresis on 2.5% agarose gels containing gel red dye (BioLum Inc., Hayward, CA), with a 100 bp molecular weight marker (Promega, Madison, Wisconsin, USA).

The amplification results showed that the ARMS-PCR method distinguishes successfully between the two different SNPs. In the rs12979860 genotyping method, the outer primer pairs produced

a band of 277 bp. The homozygote TT could be distinguished by an additional band of 198 bp, the homozygote CC could be distinguished by a band of 132 bp and heterozygote C and T alleles produced fragments of 132 bp and 198 bp, respectively. The genotypes of rs809917 could be differentiated according to the following band profiles: TT – 437 bp and 197 bp; CC – 437 bp and 197 bp; and TC – 437 bp, 295 bp and 197 bp. Fig. 1A shows an agarose gel representing ARMS-PCR profiles for SNP rs12979860, and Fig. 1B shows the results for SNP rs809917.

For RFLP, two pairs of primers were designed for each IL28B gene SNP (Table 1). The primer pairs R80F/R80R were designed to amplify a fragment of 242 bp for the rs12979860, and the primer pairs S17F/S17R were designed to amplify a fragment of 530 bp for rs809917. The PCRs were performed in separate tubes containing 0.2 pmol of the respective primer pairs. For rs12979860, the PCR conditions were as follows: 95 °C for 15 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 1 min, 58 °C for 45 s, 72 °C for 45 s and 72 °C for 3 min. Amplified PCR products were digested with the restriction enzyme *HstII* (10 U/box; New England Biolabs) at 37 °C for 3.5 h. For rs809917, PCR was conducted as follows: 95 °C for 15 min; 30 cycles of 95 °C for 1 min, 50 °C for 45 s, and 72 °C for 45 s; and 25 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and 72 °C for 3 min. The amplified PCR products were digested with the restriction enzyme *Tsp45I* (2 U/box; New England Biolabs) at 65 °C for 3.5 h. The digested products of both SNPs were separated by standard electrophoresis on 3% agarose gels containing gel red dye (BioLum Inc., Hayward, CA), alongside 100 bp Molecular Weight (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The 242 bp PCR fragment obtained with the primers designed for typing rs12979860 digested with *HstII* produced the following band profiles: 3 fragments of 25 bp, 82 bp and 135 bp in individuals with the CC genotype; 2 fragments of 82 bp and 160 bp in individuals with the TT genotype; and 4 fragments of 25 bp, 82 bp, 135 bp and 160 bp in individuals with the heterozygote CT genotype (Fig. 1C). The enzymatic digestion of the 530 bp rs809917 fragment with *Tsp45I*, produced a band profile that allowed the distinction between the GG (39 bp, 214 bp and 286 bp), TC (39 bp, 214 bp, 286 bp and 325 bp) and TT (214 bp and 325 bp) genotypes (Fig. 1D). qPCR was performed using a commercial kit from Roche Life Technologies (TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany), according to the manufacturer's instructions. The genotyping results for rs12979860 and rs809917 with the qPCR method could distinguish between the respective SNP genotypes according to the fluorescence profile.

Direct sequencing after PCR amplification was done with the same primers as those used for the RFLP for each polymorphism. The PCR products were purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) and submitted to nucleotide sequencing reactions in both directions using the Big

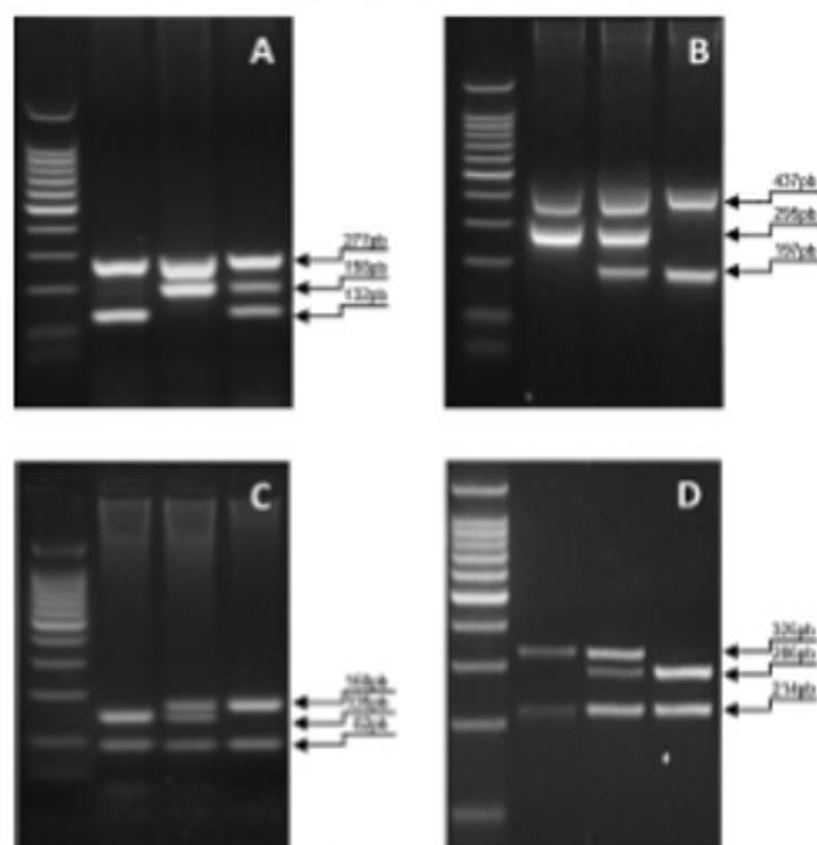


Fig. 1. (A) A 2.5% agarose gel showing ARMS-PCR profiles for SNP rs28798011 (TT and CT genotypes). (B) A 2.5% agarose gel showing ARMS-PCR profiles for SNP rs289917 (TT, TG and GG genotypes). (C) A 2% agarose gel showing RFLP profiles for SNP rs28798011 (CT and TT genotypes). (D) A 2% agarose gel showing RFLP profiles for SNP rs289917 (TT, TG and GG genotypes). Molecular Weight 100bp (Pharosga).

28 Dye Terminator kit 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),
 29 according to the manufacturer's instructions, followed by analysis
 30 on the ABI 3730 DNA automated sequencer (Applied Biosystems,
 31 Foster City, CA, USA). In sequencing chromatogram, sequences that
 32 showed single peaks were considered as homozygous, whereas
 33 those that showed double overlapping peaks were interpreted
 34 as heterozygous. All results obtained agreed 100% with the other
 35 three methods used in this study. The distribution of genotypes
 36 according to the methods used in this study is shown in Table 2.
 37 To estimate the cost of each technique, the price of reagents
 38 (enzymes, buffers, agarose, dyes, and other specific reagents for
 39 each procedure) and disposable materials (tips, polystyrene tubes,
 40 gloves) used in each of the methods was calculated based on cur-

41 rently available commercial prices. Other indirect costs were not
 42 included, such as equipment maintenance and human resources.
 43 Thus, the price of a single reaction for ARMS-PCR, RFLP, qPCR
 44 and direct sequencing was, respectively: US\$15.40; US\$27.80;
 45 US\$22.50 and US\$20.40. The assay that requires more execution
 46 time was direct sequencing (2520 min or more), followed by RFLP
 47 (570 min), ARMS-PCR (300 min) and commercial qPCR (130 min).

48 ARMS-PCR methodology showed the lowest cost and easiest
 49 execution, as well as the second fastest run time. In addition, this
 50 method presents a wide convenience of execution; it requires only
 51 equipment that is routinely used in most laboratories that per-
 52 form molecular biology assessments, such as a thermal cycler and
 53 electrophoresis apparatus. In this technique, the high specificity of
 54 the reaction relies on the 3' terminus mismatch and the position-
 55 2 (second to the terminal) mismatch from the 3' terminus of the
 56 same allele-specific primer. This last mismatch destabilizes the
 57 base pairing between the primers and their corresponding non-
 58 target templates and increases the specificity of the reaction by
 59 eliminating false-positive results (Ye et al., 2001). This method
 60 uses four primers in a single PCR reaction; two non-allele-specific
 61 primers (outer primers) amplify the region that comprises the SNP,
 62 and as the outer primer fragment is produced, it serves as a template
 63 for the two allele-specific primers (inner primers) that generate
 64 allele-specific fragments, by placing the outer primers at different

Table 2
Distribution of genotypes in 281 HCV chronic patients according to the methods used in this study.

Method	SNP rs28798011			SNP rs289917		
	CC	CT	TT	TT	TG	GG
Tetra primer ARMS-PCR	80	135	66	173	95	13
RFLP	80	135	66	173	95	13
Real time PCR	80	135	66	173	95	13
Sequencing	80	135	66	173	95	13

Please cite this article in press as: Delvaux, M., et al., Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. J. Virol. Methods (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvmet.2015.04.001>

distances from the SNP, the two allele-specific fragments can be distinguished by their different sizes in an agarose gel (Medrano and de Oliveira, 2014; Ye et al., 2001).

The RFLP technique was the second most expensive method and required a longer run-time. This method also requires two stages: PCR reaction and incubation with restriction enzymes. Furthermore, it requires two electrophoresis runs: one for analysis of the PCR amplicons and the other for analyzing the band profiles after enzymatic digestion that takes more than 3 h. In addition, restriction enzymes are high in cost and are extremely unstable. On the other hand, despite its higher cost, the equipment required for RFLP are routinely used in most molecular biology laboratories (thermal cycler, electrophoresis apparatus and water bath) and the training for this technique and interpretation of the results is not complex. Thus, even with disadvantages in several issues, the RFLP technique is, along with ARMS-PCR, very accessible to laboratories with few financial resources.

Among the four methods evaluated in this study, qPCR was the fastest and easiest to perform. Moreover, this method is sensitive and specific due to Taqman probe technology. qPCR was the second least expensive technique, even though it uses a commercial kit. However, this method requires a specific and expensive thermal cycler that is not available in many laboratories and requires additional training for the interpretation and analysis of data.

Direct sequencing is considered the gold standard and was used in this study to validate the results obtained with the other techniques. This method is the most time-consuming and laborious of the procedures evaluated. The number of steps required is large, including two PCR rounds, agarose gel electrophoresis, purification of PCR products, and diverse handling steps, until the sequence is obtained as a chromatogram. Also, it is necessary to have good knowledge of sequencing programs to analyze the data, especially in the heterozygous case. Moreover, the equipment is extremely expensive, and the maintenance cost is high because it demands several specific reagents. In the present work, the results of all three methods were 100% concordant with the results of direct sequencing.

In conclusion, all methods tested were specific for genotyping SNPs rs12973860 and rs8099917 of the IL28B gene. However, ARMS-PCR showed the best results according to the cost-benefit analysis. This approach represents a simple, fast and cost-effective method that involves a single PCR reaction followed by gel electrophoresis. Therefore, this technique is easy to use in a routine molecular diagnostic setting, with minimum equipment requirements. These results are particularly important for developing countries where laboratories generally have scarce financial resources.

Acknowledgments

We appreciate the contributions of Dr Maria L. Abate, Dr Carlos E. de Melo and Dr Antonio A. Barone for the opportunity to complement our knowledge of the methodologies used. In addition, we wish to thank Geane I. Flores, Islene Azevedo, Letícia P. Scalfoni,

Moyca M. Portillo and Selma XSL Pinheiro for technical assistance in collecting blood samples. Also, authors thank to Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), FAPERJ and CNPq for financial support.

References

- Chen, J.Y., Liu, C.Y., Wang, C.H., Liu, Y.T., Kuo, S.H., Shiu, C.F., et al., 2001. E280 genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection. *Genes Immun.* 12(4), 200–209. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2011.1>.
- Chen, T., Kulkarni, R., Ganev, E.J., Bhatia, S.K., Sridharan, C., Angus, P.W., et al., 2011. The effect of host IL28B genotype on early viral kinetics during interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 54 (5), 5071. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2011.12.057>.
- Delvaux, C., Cal, H.H., Hanoung, O.J., Melchiorres, J., Harizawa, R., 2008. Human interferon lambda1 is a potent member of the type III interferon family. *Genes Immun.* 10(2), 125–131. <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2008.37>.
- Ferreira, C.H.S., Abreu, R.M., de Silva, M.C., Ferreira, A.S., Kaiser, F.H., Castilho, F.J., et al., 2012. A fast and cost-effective method for identifying a polymorphism of interleukin 28B related to hepatitis C. *PLoS ONE* 7 (3), e31142. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0031142>.
- Ferreira, L., Pinheiro, S., Papadimitrakou, S., Efstathiou, E., 2012. Comparison of three different methods for the evaluation of IL28 and IFN polymorphisms in patients infected with HCV. *J. Virol. Methods* 184 (1–2), 101–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvmet.2012.05.005>.
- Galanzi, E., DelMónico, R., Rametta, R., Dongiacomi, P., Francuzani, A.L., Brunetti, I., et al., 2011. A tria primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction for the evaluation of rs12973860 IL28B genotype. *J. Virol. Hepat.* 18(9), 628–630. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2093.2010.01395.x>.
- Ge, D., Fellay, J., Thompson, A.J., Simon, J.S., Shianna, K.V., Urban, T.J., et al., 2009. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 461 (7267), 399–401. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08309>.
- Jacobson, I.M., McHutchison, J.G., Dusheiko, G., Di Biase, A.M., Reddy, K.R., Rothen, N.H., et al., 2011. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 364 (25), 2405–2416. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1011212>.
- Li, M., Liu, X., Zhou, Y., Su, S.F., 2009. Interferon lambda2b: the modulators of antibodies, cytokines, and immune responses. *J. Leukoc. Biol.* 85 (1), 23–32. <http://dx.doi.org/10.1189/jlb.1208752>.
- Medrano, R.F., de Oliveira, C.A., 2004. Guidelines for the tria primer ARMS-PCR technique development. *Med. Biotechnol.* 56 (3), 506–508. <http://dx.doi.org/10.1007/s12012-014-0734-4>.
- Poudyal, F., McCone Jr., J., Rivas, R.E., Bruno, S., Marso, M.P., Selkowitz, M.S., et al., 2011. Race/ethnicity for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *H. Hepatol.* 54(11), 1195–1200. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1010444>.
- Sakamoto, N., Nakagawa, M., Tanaka, Y., Sekine-Ogajima, Y., Ueyama, M., Kuroki, M., et al., 2011. Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals interethnic differences between genotypes 2a and 2b. *J. Med. Virol.* 83 (5), 871–878. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.22038>.
- Tanaka, Y., Hishida, M., Sugiyama, M., Kuroki, M., Mizuno, K., Sakamoto, N., et al., 2009. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 41 (10), 1105–1109. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.449>.
- Thompson, A.J., Muir, A.J., Selkowitz, M.S., Ge, D., Fellay, J., Shianna, K.V., et al., 2009. Interleukin 28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 126 (1), 120–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gastro.2010.04.011>.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X., Collins, A.R., Ily, I.N., 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 29 (17), 3385. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/29.17.3385>.
- Zekron, S., Soriano, V., Azeiteiro, T., Bronowicki, J.P., Leise, A.W., Milkhege, R., et al., 2012. Telaprevir and daclatasvir for HCV genotype 1 infection. *H. Hepatol.* 55(7), 670–678. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1211357>.
- Zekron, S., Soriano, V., Azeiteiro, T., Bronowicki, J.P., Leise, A.W., Milkhege, R., et al., 2012. SV04 and SV07 with an interferon-free regimen of BI 202225 and BI 201207, α -ribavirin, in treatment-naïve patients with chronic genotype 1 HCV infection: interim results of S00ND-C2. *J. Hepatol.* 56 (Suppl. 2), S45.

4.2. Artigo 2. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Villar LM, Coelho HS, Esberard EC, Flores PP, Brandão-Mello CE, Villela-Nogueira CA, de Almeida AJ, Lampe E. ITPA allele's frequency and association with ribavirin-induced anemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic Hepatitis C. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Jul 7:0. [Epub ahead of print] doi.org/10.1590/0074-02760150104

O trabalho intitulado "*Impacto dos Polimorfismos do Gene da ITPA sobre o Desenvolvimento de Anemia Induzida pela Ribavirina na Terapia Antiviral da Hepatite C*" (Nathália Delvaux, Vanessa Duarte da Costa, Maristella Matos da Costa, Livia Mello Villar, Henrique Sérgio Coelho, Eliane Esberard, Priscila Pollo Flores, Carlos Eduardo Brandão-Mello, Cristiane Alves Villela-Nogueira, Adilson José de Almeida, Elisabeth Lampe) foi selecionado para apresentação oral no evento científico nacional "XXII Congresso Brasileiro de Hepatologia e XXII Semana de Fígado do Rio de Janeiro (SBH)", realizado no período de 02 a 05 de Outubro de 2013, no Rio de Janeiro, RJ.

Parte do presente artigo também foi apresentado como tema livre, em formato de pôster, no evento científico internacional "Special Conference on Hepatitis C (AASLD/EASL)", realizado em Nova York, NY, no período de 12 a 13 de setembro de 2014. O trabalho apresentado intitulou-se: "*Association of Inosine Triphosphatase (ITPA) polymorphisms with treatment-induced reduction in hemoglobin in Brazilian patients during HCV therapy and allelic distribution in healthy individuals*" (Nathália Delvaux, Vanessa Duarte da Costa, Maristella Matos da Costa, Adilson José de Almeida, Carlos Eduardo Brandão-Mello, Cristiane Alves Villela-Nogueira, Henrique Sérgio Moraes Coelho, Eliane Esberard, Priscila Pollo Flores, Thais Guaraná, Elisabeth Lampe).

Inosine triphosphatase allele frequency and association with ribavirin-induced anaemia in Brazilian hepatitis C antiviral therapy for chronic hepatitis C

Nathália Delvaux¹, Vanessa Duarte da Costa¹, Mariatella Matos da Costa¹, Livia Melo Villar¹, Henrique Sérgio Moraes Coelho², Eliane Bordalo Cathalá Esberard³, Priscila Pollo Flores⁴, Carlos Eduardo Brandão-Mello⁴, Cristiane Alves Villela-Nogueira⁵, Adilson José de Almeida^{1*}, Elisabeth Lampe^{1*}

¹Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Hepatites Virais, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Departamento de Hepatologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³Universidade Federal Fluminense, Hospital Universitário Antônio Pedro, Departamento de Gastroenterologia, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ⁴Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Hospital Universitário CATHOC e GINIC, Departamento de Medicina Geral, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Inosine triphosphatase (ITPA) single nucleotide polymorphisms (SNPs) are strongly associated with protection against ribavirin (RBV)-induced anaemia in European, American and Asian patients; however, there is a paucity of data for Brazilian patients. The aim of this study was to evaluate the ITPA SNP (rs7270101/rs1127354) frequency in healthy and hepatitis C virus (HCV)-infected patients from Brazil and the association with the development of severe anaemia during antiviral therapy. ITPA SNPs were determined in 200 HCV-infected patients and 100 healthy individuals by sequencing. Biochemical parameters and haemoglobin (Hb) levels were analyzed in 97 patients who underwent antiviral therapy. A combination of AA/rs7270101+CC/rs1127354 (100% ITPase activity) was observed in 236/500 individuals. Anaemia was observed in 87.5% and 86.2% of treated patients with AA (rs7270101) and CC genotypes (rs1127354), respectively. Men with AA (rs7270101) showed a considerable reduction in Hb at week 12 compared to those with AC/CC ($p = 0.1475$). In women, there was no influence of genotype ($p = 0.5295$). For rs1127354, men with the CC genotype also showed a sudden reduction in Hb compared to those with AC. Allelic distribution of rs7270101 and rs1127354 shows high rates of the genotypes AA and CC, respectively, suggesting that the study population had a great propensity for developing RBV-induced anaemia. A progressive Hb reduction during treatment was observed; however, this reduction was greater in men at week 12 than in women.

Key words: ITPA - hepatitis C - ribavirin - anaemia - Brazil

Anaemia is a serious adverse effect of antiviral therapy with pegylated interferon (PEG-IFN) in combination with ribavirin (RBV) and it represents the main reason for RBV dose reduction, blood transfusion and even discontinuations of therapy (Fellay et al. 2010, Sung et al. 2011, Ahmed et al. 2013, Clark et al. 2013, Gane & Ghany 2013). Haemolytic anaemia is also the most important haematologic adverse effect associated with triple therapy, with the incorporation of a new protease inhibitor into dual therapy with PEG-IFN/RBV (Hynicka & Neil 2013, Romero-Gómez et al. 2013). Anaemia is presumably related to RBV use, as most patients show improved haemoglobin (Hb) levels with the reduction of RBV dose, which is reversible after the end of treatment. Age, female gender, baseline levels of Hb, creatinine

clearance and platelets were also reported to be factors that influenced RBV-induced anaemia (Ochi et al. 2010, Tsubota et al. 2012, Romero-Gómez et al. 2013).

Recent studies have shown that two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the inosine triphosphatase (ITPA) gene, located on chromosome 20, have been associated with protection against RBV-induced haemolytic anaemia: rs1127354 and rs7270101 (Fellay et al. 2010, Sakamoto et al. 2010, Rau et al. 2012). Both SNPs affect ITPA expression. Patients infected with hepatitis C virus (HCV) who carry the CC genotype at rs1127354 are more likely to develop anaemia than those who carry genotypes AC/AA, whereas at rs7270101 the reduction of Hb is greater in patients with the AA genotype than with the AC/CC genotype (Suzuki et al. 2011).

ITPA genotyping can help physicians make a treatment decision, especially when considering patients at high risk of developing haemolytic anaemia, such as those with advanced fibrosis and cirrhosis (Thompson et al. 2010, Romero-Gómez et al. 2013). Determination of ITPA polymorphisms might provide important contribution for the management of patients, especially those from different ethnicities, because the majority of research about this topic has been carried out in the United States of America (USA), Europe and Asia. Moreover,

doi: 10.1590/S0074-0275120010
Financial support: CNPq, FAPESP, FIOCRUZ/IDC
* Corresponding authors: lampe@ioc.fiocruz.br
Received 10 March 2012
Accepted 2 June 2012

there is a scarcity of studies reporting the distribution of different genotypes of ITPA for Latin American populations, as well as the significance of ITPA variants in relation to RBV-induced anaemia. In Brazil, HCV infection is a serious public health concern, being a principal cause of death from complications of HCV-related chronic liver disease, such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma (Alter et al. 1998, Gonçalves et al. 2013, Paranaguá-Vieozzo et al. 2014).

This study aims to evaluate ITPA polymorphism frequencies in healthy and HCV-infected patients and the association of these with the development of anaemia in a cohort of patients with chronic HCV infection on antiviral therapy living in the state of Rio de Janeiro (RJ), Brazil.

SUBJECTS, MATERIALS AND METHODS

Patients and ethics - This study enrolled 200 patients with chronic HCV infection (72 males, aged 54.3 ± 11.1 years) and 100 healthy individuals (34 males, aged 51.1 ± 9.7 years) living in RJ between 2013-2014. Healthy individuals and patients with chronic HCV infection on antiviral therapy were prospectively evaluated on an outpatient basis at Guffria & Guinle University Hospital, Clementino Fraga Filho University Hospital and Américo Pódeiro University Hospital. A total of 97/200 patients who concluded antiviral therapy were investigated in relation to an association of ITPA polymorphisms with the development of anaemia. Patients were treated with PEG-IFN- α 2b, administered subcutaneously at a dose of 1.0-1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ weekly plus full-dose RBV (1,000-1,250 mg/day) for 24 (genotype 2 and 3) or 48 weeks (genotype 1). Haematological, biochemical and virological parameters at pretreatment (baseline) and at weeks 4, 8 and 12 were collected for comparative analysis. Drug dose reductions as a consequence of adverse effects were managed according to the severity of anaemia. Anaemia was considered as Hb levels < 10 g/dL and/or a reduction > 2 g/dL in comparison to baseline. A sustained virologic response (SVR) was defined as undetectable HCV-RNA in serum samples 24 weeks after the end of therapy. This study was approved by the local ethics committee and conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Each patient provided written informed consent before participating in this study.

Data collection and laboratory parameters - Information on demographics (gender and age) and HCV genotype were obtained at study entry. Biochemical markers of liver injury [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transaminase (γ -GT)], Hb, platelet count (PLT), leucocytes count (LEUC) and viral load were obtained at baseline and at weeks 4, 8 and 12. Serum aminotransferases (ALT and AST) and γ -GT were measured with an automatic analyser (Labman Menno, Labtest, Brazil). Haematological parameters (Hb, PLT and LEUC) were assessed with an automated cell counter (ABX PENTRA 120, ABEX Diagnostica, France).

Quantification of the HCV-RNA load and determinations of HCV genotypes were performed using the Abbott Real-Time HCV assay (Abbott Laboratories, USA),

which has a dynamic range of detection between 12 IU/mL ($1.08 \log$ IU/mL) and 100 million IU/mL ($8.0 \log$ IU/mL), according to the manufacturer's instructions.

ITPA genotyping - Blood samples were collected into ethylenediamine tetraacetic acid tubes and human genomic DNA was extracted from 200 μL whole blood using a QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's directions. ITPA variants (rs7270101 and rs1127354) were determined using direct sequencing after polymerase chain reaction (PCR) amplification. Specific primers used to target the two SNPs were: forward, 5'CGTGCTCACATGGAGAATCA3' and reverse, 5'OCTGGAAGCTACCTGGACAAG3' (Cao & Hegde 2002). The PCR products were purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and submitted to nucleotide sequencing reactions in both directions using a BigDye Terminator kit 3.1 (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions and then analyzed on an ABI 3730 DNA automated sequencer (Applied Biosystems).

Classification of predicted ITPase activity - ITPA deficiency phenotypes were classified according to the degree of predicted ITPA deficiency based on the compound genotype of rs1127354 and rs7270101, as previously determined by biochemical analysis: 100% (AA_{rs7270101} CC_{rs1127354}), 60% (AC_{rs7270101} CC_{rs1127354}), 30% (CC_{rs7270101} CC_{rs1127354}), 25% (AA_{rs7270101} AC_{rs1127354}), 10% (AC_{rs7270101} AC_{rs1127354}) and $< 5\%$ (AA_{rs7270101} AA_{rs1127354}) (Sarm et al. 2002, Macedo et al. 2005, Shipilova et al. 2008, Rembeck et al. 2004).

Statistical analysis - Data are expressed as frequencies and means \pm standard deviation for continuous variables with a normal distribution or median and ranges for those that did not pass the normality test (Kolmogorov-Smirnov test). Bivariate analysis was performed using the Pearson's chi-square test for independence to compare categorical variables. For continuous variables with a normal distribution, homoscedasticity was tested by the Levene's test and we used the unpaired Student's *t* test to compare means (between 2 groups) or ANOVA with the Bonferroni posttest (for more than 2 groups). Continuous variables assumed not to follow a normal distribution were compared using the nonparametric Mann-Whitney *U* test (between 2 groups) or the Friedman with Dunn posttest (for more than 2 groups) statistics to compare medians. Differences between groups were considered to be statistically significant at $p < 0.05$ (2-tailed). All calculations were performed using GraphPad InStat 1998, v.3.01 for Windows 95 (GraphPad Software, USA).

RESULTS

ITPA allele frequencies - Both healthy and HCV-infected patients groups did not differ significantly in relation to gender distribution (males, 34% vs. 38%) or mean age (51.0 ± 9.7 vs. 57.5 ± 9.4). The ITPA allele frequencies of the 300 patients included in this study are shown in Table 1. It was possible to observe that the allelic distribution of ITPA SNPs in both groups were similar (rs7270101, $p = 0.3634$; rs1127354, $p = 0.6589$).

In healthy individuals, AA and CC were the most prevalent genotypes at rs7270101 and rs1127354 SNPs

TABLE I
 Inosine triphosphatase (ITPA) alleles frequency
 in healthy patients (n = 100) and patients infected
 with hepatitis C virus (HCV) (n = 200)

SNP	ITPA n (N)		Total (n = 200)
	Healthy group (n = 100)	Infected with HCV (n = 200)	
rs7270301 (n (N))			
AA	87 (87)	165 (82.5)	252 (84)
AC	11 (11)	22 (11.5)	44 (14.7)
CC	2 (2)	1 (0.5)	4 (1.3)
rs1127254 (n (N))			
CC	95 (95)	190 (95)	285 (94.3)
AC	7 (7)	10 (5)	17 (5.7)
AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)

a: p value was considered not significant ($\alpha = 0.05$); SNP: single nucleotide polymorphism.

(87% and 95%, respectively). Similarly, in patients infected with HCV, these genotypes were also the most prevalent (82.5% and 95%, respectively).

Clinical and laboratory findings in treated patients with chronic HCV infection - The clinical and demographic characteristics of HCV-infected patients treated with IFN/PEG-IFN plus RBV (n = 97) in this study are shown in Table II. Most patients were female (82%), with a mean age of 57.5 ± 9.4 years (range 28-73 years). Genotype determination in serum samples revealed that HCV genotypes 1, 1a, 1b and 3 were found in 16 (16.5%), 30 (31%), 42 (43.3%) and nine (9.2%) patients, respectively. The median serum viral load measured was 825,046.0 IU/mL (range 3,732.0-9,110,000.0 IU/mL). Overall, SVR was achieved in 22% of patients.

Biochemical and hematological data were analyzed at baseline and after four, eight and 12 weeks of treatment. A significant and progressive reduction during antiviral treatment was observed for hematological (Hb, PLT and LEUC) and biochemical (AST, ALT and γ -GT)

TABLE II
 Clinical and demographic characteristics of hepatitis C virus (HCV)-infected patients
 treated with pegylated interferon plus ribavirin (RBV) (n = 97)

Characteristic	Baseline values
Age (years) (mean \pm SD)	57.5 \pm 9.4
Gender (n (%))	
Male	17 (18)
Female	60 (62)
Hb (g/dL) (mean \pm SD)	12.98 \pm 1.57
Platelet count ($\times 10^9/L$) (mean \pm SD)	168.5 \pm 67.5
Leukocytes ($\times 10^9/L$) (median (range))	5.5 (5.6-14.1)
AST* (U/L) (median (range))	61.0 (15.0-276.0)
ALT* (U/L) (median (range))	79.0 (12.0-351.0)
γ -GT* (U/L) (median (range))	80.0 (14.0-290.0)
HCV genotype* (n (%))	
1	16 (16.5)
1a	30 (31)
1b	42 (43.3)
3	9 (9.2)
Serum viral load ^a	
IU/mL (median (range))	825,046.0 (3,732.0-9,110,000.0)
Log-transformed (mean \pm SD)	5.8 \pm 0.7
RBV dose reduction ^b (n (%))	
Yes	17 (17.5)
No	31 (32)
SVR ^c (n (%))	
Yes	21 (22)
No	25 (26)

a: aspartate aminotransferase (AST) normal values up to 37 U/L; b: alanine aminotransferase (ALT) normal values up to 41 U/L; c: gamma glutamyl transpeptidase (γ -GT) normal values between 11-60 U/L; d: Abbott Real-Time HCV assay (Abbott Laboratories, USA) (lower detection limit: 12 IU/mL); e: at least 20% of RBV dose and therapy for 20% of the scheduled treatment period (data available from 45 patients); f: data available from 66 patients; Hb: haemoglobin; SD: standard deviation; SVR: sustained virological response (undetectable serum HCV-RNA 24 weeks after completion of antiviral therapy).

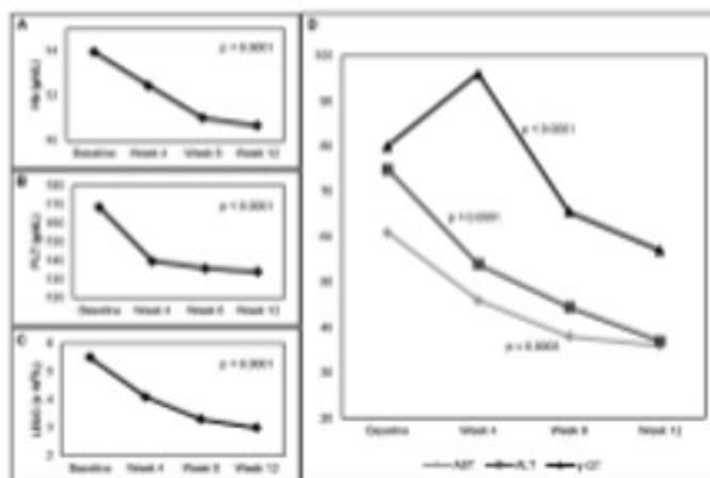


Fig. 1. Biochemical and haematological data at baseline and at four, eight and 12 weeks of treatment. A: progressive decline during antiviral treatment was observed in haematological parameters. A: haemoglobin (Hb); B: platelet (PLT); C: leucocytes count (LEUC); D: values for biochemical parameters. Aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and gamma-glutamyl transpeptidase (γ -GT) showed a progressive decrease at baseline and throughout antiviral treatment.

parameters. The mean value of pretreatment Hb was 13.98 ± 1.57 g/dL, with a significant reduction at week 4 (12.46 ± 1.56 g/dL), week 8 (11.00 ± 1.33 g/dL) and week 12 (10.65 ± 1.54 g/dL) after the start of antiviral treatment ($p < 0.0001$) (Fig. 1A). RBV dose reductions were required in 17.5% of patients. Mean values of PLT counts were $568.5 \pm 67.5 \times 10^9/L$, $439.6 \pm 55.2 \times 10^9/L$, $435.8 \pm 65.1 \times 10^9/L$ and $433.9 \pm 60.7 \times 10^9/L$ at baseline and after four, eight and 12 weeks of treatment, respectively ($p < 0.0001$) (Fig. 1B). Median values of LEUC were $5.3 \times 10^9/L$ (range 5.6 – $14.1 \times 10^9/L$), $4.1 \times 10^9/L$ (range 3.6 – $13.0 \times 10^9/L$), $3.3 \times 10^9/L$ (range 1.1 – $7.5 \times 10^9/L$) and $3.0 \times 10^9/L$ (range 1.0 – $11.0 \times 10^9/L$) at baseline and after four, eight and 12 weeks, respectively ($p < 0.0001$) (Fig. 1C).

In relation to biochemical parameters, median AST values were 61.0 U/L (range 15.0–276.0 U/L), 46.0 U/L (range 23.0–190.0 U/L), 38.0 U/L (range 20.0–153.0 U/L) and 36.0 U/L (range 30.0–121.0 U/L) at baseline and at week 4, 8 and 12, respectively ($p < 0.0001$). Median ALT values were 75.0 U/L (range 12.0–281.0 U/L), 54.0 U/L (range 19.0–209.0 U/L), 44.5 U/L (range 9.0–240.0 U/L) and 37.0 U/L (range 9.0–150.0 U/L) at baseline and at week 4, 8 and 12, respectively ($p < 0.0001$). Median γ -GT values at baseline and at week 4, 8 and 12 were as follows: 80.0 U/L (range 14.0–290.0 U/L), 96.0 U/L (range 29.3–282.0 U/L), 65.5 U/L (range 15.0–334.0 U/L) and 57.0 U/L (range 13.0–583.0 U/L), respectively ($p = 0.0003$) (Fig. 1D).

ITPA alleles and development of anaemia in HCV-treated patients - In treated patients with chronic HCV infection ($n = 97$), the AA genotype of rs7270101 SNP was observed in 80 (82%) of patients whereas the AC/CC genotype was detected in 17 (17%) patients. At rs1127354, the CC genotype was found in 94 (97%) patients and the AC genotype occurred in three (3%) patients.

Table III shows the ITPA allele frequencies in relation to demographics and Hb levels at baseline and at week 4, 8 and 12 after starting antiviral treatment. Of the 80 patients with the AA genotype at rs7270101, anaemia was observed in 70 (87.5%) patients and 12 (70.6%) of the 17 patients with genotype AC/CC developed anaemia. At rs1127354, most patients who developed anaemia showed the CC genotype (86.2%). The allelic distributions of both SNPs were categorized according to gender and we observed that from the 26 males who developed anaemia, genotype AA at rs7270101 was detected in 21 (80.7%) individuals. For rs1127354, all males with anaemia presented the CC genotype.

A progressive reduction in Hb levels was observed at baseline and throughout antiviral treatment (at week 4, 8 and 12), but the Hb reduction at week 12 was relatively higher in individuals with an AA genotype (rs7270101) and/or a CC genotype (rs1127354). The distribution of ITPA genotypes according to gender revealed that men who carried the AA genotype (rs7270101) had a slightly greater reduction in Hb than women. Fig. 2 shows the reduction in Hb values compared with baseline at week 12 of treatment according to the ITPA genotypes. The distribution of the predicted ITPase activity according to compound genotype of rs7270101 and rs1127354, as previously determined by biochemical analysis, is shown in Table IV. The combination AA_{rs7270101}/CC_{rs1127354} that yields 100% predicted ITPase activity was observed in 236/300 individuals (78.7%) of the present study cohort and the genotype combination that presented predicted ITPase activity equal to or below 30% was observed in only 21 individuals.

The relationship between ITPA genotypes and SVR demonstrated that SVR could be observed in 40% (27/55) of patients with the AA genotype and in 36%

TABLE III
Inosine triphosphatase (ITPA) allele frequencies in relation to demographics and haemoglobin (Hb) levels during treatment in hepatitis C virus (HCV) patients (n = 97)

	ITPA SNPs			
	rs7270101		rs1127354	
	AA	AC/CC	CC	AC
Anaemia* (n (%))				
Yes	70 (57.5)	13 (70.6)	81 (86.2)	1 (22.2)
No	10 (12.5)	5 (29.4)	13 (13.8)	2 (66.7)
Gender* (n (%))				
Male with anaemia	31 (50.7)	5 (29.2)	26 (100)	0 (0)
Female with anaemia	49 (57.5)	7 (12.5)	55 (98.2)	1 (1.8)
Hb at baseline (mean ± SD)				
Male	14.6 ± 2.5	14.9 ± 1.0	14.5 ± 2.1	14.9 ± 0.9
Female	13.6 ± 1.0	12.5 ± 0.7	13.6 ± 0.9	12.9 ± 0.0
Hb at week 4 (mean ± SD)				
Male	12.5 ± 1.6	12.6 ± 0.9	12.6 ± 1.5	16.0 ± 0.0
Female	12.0 ± 1.6	12.5 ± 0.9	12.0 ± 1.5	13.0 ± 0.0
Hb at week 8 (mean ± SD)				
Male	11.6 ± 1.4	11.9 ± 1.0	11.5 ± 1.1	15.0 ± 0.7
Female	10.6 ± 1.2	10.5 ± 1.7	10.7 ± 1.2	9.0 ± 0.0
Hb at week 12 (mean ± SD)				
Male	10.9 ± 1.9	12.0 ± 1.6	10.9 ± 1.5	14.2 ± 0.9
Female	10.2 ± 1.1	10.5 ± 1.2	10.3 ± 1.0	7.0 ± 0.0

a: defined as Hb levels < 10 g/dL and/or decline > 2 g/dL; b: male = 27, female = 60; SD: standard deviation; SNP: single nucleotide polymorphisms.

(4/11) of patients with the AC genotype (rs7270101). For rs1127354, differences between the distributions of genotypes in relation to SVR were not possible to analyse because almost all treated patients (54/97) with chronic HCV infection carried the CC genotype.

DISCUSSION

Recently, genome-wide association studies identified polymorphisms in the ITPA gene in patients with chronic hepatitis C who received PEG-IFN/RBV. These studies have demonstrated a strong association with SNPs rs7270101 and rs1127354 and RBV-induced haemolytic anaemia, which have led to a better understanding of the effects of RBV-induced anaemia (Fellay et al. 2010, Sakamoto et al. 2010, Thompson et al. 2010, Kurosaki et al. 2011, Seto et al. 2011, Tanaka et al. 2011).

The ITPA gene encodes the enzyme ITPA (ITPase) which catalyzes the conversion of inosine triphosphate (ITP) to inosine monophosphate and pyrophosphate so that ITP does not accumulate in normal cells. ITP is used to maintain the red blood cell (RBC) adenosine triphosphate pool, thus preventing oxidative stress, which is thought to be a critical mediator of RBV-induced haemolysis (Mizumi et al. 2011). Deficiency of ITPase disrupts this cycle, resulting in an accumulation of ITP (Maeda et al. 2005).

RBV (1-β-D-ribofuranosyl-1H-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is a synthetic nucleoside analogue that

has actions in vitro against a broad range of viruses (Patterson & Fernandez-Larsson 1990) and has been used in combination with IFN during antiviral treatment. RBV can be incorporated into erythrocytes, where it undergoes phosphorylation to its pharmacologically active form through adenosine kinase. The RBV triphosphate conjugates cannot cross the erythrocyte cell membrane and accumulate in the intracellular compartment, causing oxidative damage and leading to haemolysis (Kowdley 2005). ITPase deficiency causes an accumulation of ITP in RBCs and may compete with RBV triphosphate, thereby protecting from RBV-induced haemolysis (Fraser et al. 1975, Shipkova et al. 2006, Sakamoto et al. 2010, Kim et al. 2013).

To the best of our knowledge, this is the first report of the frequency of ITPA gene polymorphisms in a cohort of Brazilian healthy individuals and patients infected with HCV. The overall frequency (n = 300) of allelic distribution at rs7270101 and rs1127354 shows high rates of the genotypes AA (84%) and CC (94.3%), respectively. These frequencies were different from those reported by Fellay et al. (2010) who showed that 48.4% of American individuals carried the AA genotype (rs7270101) and 47.6% had the CC genotype (rs1127354). By contrast, European studies demonstrate that the majority of individuals carry AA and CC genotypes for rs7270101 and rs1127354, respectively (Domingo et al. 2012, D'Avolio

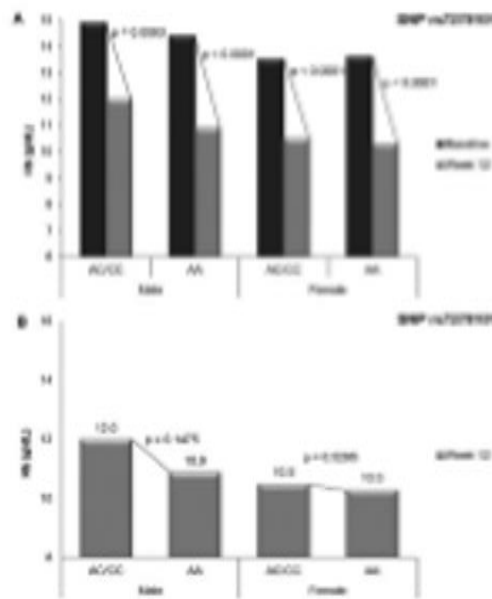


Fig. 2. Haemoglobin (Hb) declines at variant rs7270101 single nucleotide polymorphisms (SNP) according to gender. A, comparison of Hb levels between week 12 of antiviral treatment and baseline for both genders. Significant declines are observed. B, gender differences of Hb levels at week 12. Men who carried the AA genotype are seen to exhibit a slightly greater Hb decline than women.

TABLE IV

Distribution of predicted ITPase activity according to compound genotype of rs7270101 and rs1127354 as previously determined by biochemical analysis and in our study population ($n = 200$)

rs7270101	rs1127354	Predicted ITPase activity (%) ^a	Present study population n (%)
AA	CC	100	124 (78.7)
AC	CC	60	42 (24.2)
CC	CC	20	4 (2.2)
AA	AC	25	16 (8.2)
AC	AC	10	1 (0.5)
AA	AA	5	0 (0)

a: Suni et al. (2002), Madao et al. (2005), Shigkova et al. (2004) and Roebrock et al. (2014).

et al. 2012, Naggie et al. 2012, Rau et al. 2013). Among Japanese and Korean populations, the CC genotype is also more prevalent at rs1127354, but they are monogenic for the rs7270101 AA genotype (Ochi et al. 2010, Tanaka et al. 2011, Kim et al. 2013). Although the Brazilian population is known to have a strong miscegenation as a consequence of different migration flows, the al-

lelic distribution of both SNPs in our population showed greater similarity to Caucasian populations, although the proportion of alleles associated with anaemia was slightly higher in the Brazilian population.

In this present study, anaemia was more often observed in patients presenting ITPA genotypes that were recognised as predictors of RBV-haemolytic anaemia, in accordance with studies conducted in the USA (Fellay et al. 2010, Thompson et al. 2010), Europe (D'Avolio et al. 2012, Naggie et al. 2012, Rau et al. 2013) and Asia (Ochi et al. 2010, Sakamoto et al. 2010, Suzuki et al. 2011, Kim et al. 2013, Kawasaki et al. 2013). Nevertheless, the frequency of the allelic distribution of both SNPs was slightly higher than that reported in the studies mentioned above, suggesting that our population is more prone to develop anaemia.

A progressive reduction in Hb, particularly at week 12 of dual therapy with PEG-IFN/RBV, was observed in this study. Anaemia, defined as Hb levels < 10 g/dL and/or a reduction greater than 2 g/dL compared to baseline, was higher in genotypes AA (rs7270101) and CC (rs1127354) in both genders. We could observe a significant difference in the reduction in Hb up to week 12 associated with gender. For rs7270101, males who had an AA genotype showed an evident, but not statistically significant reduction ($p = 0.1475$) in Hb at week 12 compared to those who had the AC/CC genotype. By contrast, there was no influence of the ITPA genotype on Hb levels among female patients because the reduction was similar to that of patients who had an AA or AC/CC genotype ($p = 0.3295$) (Fig. 2). For rs1127354, males who had a CC genotype also showed a more evident reduction in Hb when compared to those who had the AC genotype. This present study is the first to explore gender differences as possible protective cofactors from RBV-haemolytic anaemia in relation to ITPA allelic distributions and Hb reductions during treatment. Scherzer et al. (2013) detected gender differences in the incidence of RBV-haemolytic anaemia at week 4 in Austrian patients treated with PEG-IFN/RBV. According to those authors, Hb reductions were smaller in females than in males and among premenopausal females compared with postmenopausal patients. However, these differences not considered to be related to ITPA alleles at rs1127354 or rs7270101 (Scherzer et al. 2013).

The distribution of predicted ITPase activity according to the genotype at rs7270101 and rs1127354 indicated that most (78.7%) of our population exhibited 100% of predicted ITPase activity. Only a small number of patients (7%) presented ITPase activity equal to or below 30%. ITPase activity is known to increase the probability of the development of anaemia. Additionally, most patients in our cohort exhibited the worst combination for both SNPs (AA_{rs7270101} CC_{rs1127354} and AC_{rs7270101} CC_{rs1127354}), which could explain why so many Brazilian patients developed RBV-induced anaemia.

Concerning ITPA polymorphisms studied in this present work and in response to antiviral treatment, no association was detected between the SVR and ITPA genotypes. Therefore, our findings are in accord with several other studies (Thompson et al. 2010, Motomura et al. 2012, Naggie et al. 2012, Kim et al. 2013). Meso-

over, almost all treated patients with chronic HCV infection were monoallelic for the rs1127354 CC genotype.

The main limitation of this present study was the relatively small sample size, although we included all patients (n = 97) who presented complete data on biochemical and haematological parameters (at baseline and weeks 4, 8 and 12) and had completed PEG-IFN/RBV antiviral therapy during the study period.

In conclusion, the allelic distribution frequency of SNPs in rs7270101 and rs1127354 showed high rates of the genotypes AA and CC, respectively, suggesting that the study population had a great propensity for developing RBV-induced anaemia. A progressive reduction in Hb during the weeks of HCV treatment based on PEG-IFN/RBV was observed in this study, however, the reduction in Hb levels at week 12 in male patients was greater than that observed among females.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Geane Lopes Flores, Lúcia Assis, Letícia de Paula Scatoni, Maysa Machado Pereira and Sílvia Xavier Silva Lima Pinheiro, for technical assistance in collecting blood samples.

REFERENCES

Ahmed WM, Faruqi N, Zaky S, Elida AS, Alkhalid M, Ojawa D, Marzouk M, Naguib J 2013. Pre-treatment rate of inosine triphosphate pyrophosphatase polymorphism for predicting anaemia in Egyptian hepatitis C virus patients. *World J Gastroenterol* 17: 1287-1292.

Alex MJ, Meek GS, Meyer LA, Margolis ND 1998. Hepatitis C. *Hygiei Dis Clin North Am* 13: 19-32.

Cao H, Nagata EA 2001. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *J Hum Genet* 41: 222-223.

Clark FF, Aghvami A, Dagaopari E, Galimov E, Ushakov TI, Vash DMI, Fialit K, Thompson AJ, Sumi MO, D'Alessandro K, Murr AJ, Deltenre M 2013. Inosine triphosphatase deficiency helps predict anaemia, anaemia management and response in chronic hepatitis C therapy. *J Viral Hepat* 20: 508-510.

D'Alessandro A, DiGirolamo A, Sicaardi M, Scatena A, DiStasio L, Binello M, Marone DA, Carli O, Calogero A, de Roggiro DD, Scatena M, Quarta J, Trachino O, Saverio S, Rizzetto M, Di Perri G 2012. Inosine triphosphatase polymorphisms and ribavirin pharmacokinetics as determinants of ribavirin-associated anaemia in patients receiving standard anti-HCV treatment. *Ther Drug Monit* 26: 102-110.

Domingo F, Quintela JM, Salazar J, Torres F, Matea SD, Facha C, Del Mar Gutierrez M, Lamasa K, Fontana A, Martín J, Muñoz J, Vidal F, Balazs M 2012. Association of ITPA gene polymorphisms and the risk of ribavirin-induced anaemia in HCV/hepatitis C virus (HCV)-infected patients receiving HCV combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 26: 2927-2930.

Foley J, Thompson AJ, Gu D, Gumbs CE, Urban TJ, Shianna KV, Little LB, Qin F, Serikhan AK, Wilson M, Warner A, Murr AJ, Dixon C, Aizawa J, Ishikawa M, Makishima JD, Goldstein DB 2010. ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature* 466: 602-605.

Foster JM, Meyers K, Henderson JF, Deen LV, McCay ED 1979. Individual variation in inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes. *Clin Biochem* 2: 221-204.

Gane N, Ghany MG 2013. What the infectious disease physician needs to know about pegylated interferon and ribavirin. *Clin Infect Dis* 56: 1022-1023.

Gasqueles FL, Sique-Damas M de F, Marques CC, Mendonça AT, Gasqueles CB, Pereira FE 2013. Etiology of liver cirrhosis in Brazil:

chronic alcoholism and hepatitis viruses in liver cirrhosis diagnosed in the state of Espírito Santo. *Clinics (Sao Paulo)* 68: 291-293.

Hidami Y, Cirilli DT, Foley J, Makishima JD, Thompson AJ, Gumbs CE, Shianna KV, Urban TJ, Goldstein DB 2011. Inosine triphosphate protects against ribavirin-induced adenosine triphosphate loss by adenosine-cytidine synthase function. *Gastroenterology* 120: 1314-1321.

Hyvriala LM, Hall EL 2013. Anaemia management in patients with chronic viral hepatitis C. *Ann Pharmacother* 47: 222-230.

Kim JS, Ahn SM, Jung WK, Kwon CS, Kim YS, Choi SO, Kim JK 2012. The impact of inosine triphosphatase variants on hemoglobin level and sustained virologic response of chronic hepatitis C in Korean. *J Korean Med Sci* 27: 1212-1219.

Kowdley KV 2008. Hematologic side effects of interferon and ribavirin therapy. *J Clin Gastroenterol* 42 (Suppl 1): 2-8.

Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida M, Sakamoto M, Enomoto M, Maruyama K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Mashima S, Tsubunaga K, Mizushima M, Iwami N 2013. Metabolic engineering the ITPA gene type identifies patients at high risk of anaemia and treatment failure with pegylated interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol* 23: 408-412.

Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Nishida Y, Tamaki N, Kato T, Yano Y, Hirohama T, Ueda K, Tsubunaga K, Kasuga T, Nakamichi K, Nakano J, Takahashi Y, Asahina Y, Nakano K, Inagaki T, Enomoto N, Nishida M, Tsubunaga K, Mizushima M, Iwami N 2011. Relationship between genetic polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or leukopenia after treatment with pegylated-interferon and ribavirin. *Antivir Ther* 16: 281-294.

Maeda T, Sumi S, Ueda A, Ohshuku Y, Ito T, Maruyama AM, Kurose Y, Nakagawa S, Tageri N 2003. Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphatase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab* 23: 271-273.

Motomura T, Kaga O, Taketani A, Tsubunaga T, Nawa Y, Naito J, Kawachi M, Tsubunaga T, Uchiyama H, Yoshizawa T, Shinzaki K, Mashima Y 2012. Efficacy of splenectomy in preventing anaemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype. *Hepato Res* 42: 222-229.

Nagata E, Kawanishi M, Denke JM, Masuda J, Rodriguez-Gomez S, Clark FF, Thompson AJ, Shianna KV, Vigna S, Makishima JD, Goldstein DB, Zentgraf V 2012. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anaemia in HIV/HCV-infected patients with all HCV genotypes. *J Infect Dis* 205: 272-281.

Ochi N, Mashima Y, Ake H, Hayashida Y, Nakano K, Kake M, Tsuruta T, Nagayama M, Kumada M, Nakamura Y, Ohayama K 2010. ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anaemia and outcome of therapy - a genome-wide study of Japanese HCV patients. *Gastroenterology* 118: 1190-1197.

Perezagui-Vazquez DC, Cho BK, Alvarado-Gil MV, Farías AJ, Cunha-Silva M, Franco JJ, Alves VA, Sherman M, Carrillo FJ 2014. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence and risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* 13: 320-323.

Pfefferman EL, Fernandez-Larssen E 1998. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Eur J Infect Dis* 17: 1129-1142.

Sao M, Ishikawa T, Kusumoto S, Murota CN, Sasaki FF, Watabayashi M, Sakamoto J, Ohi MT, Dufour JF, Muraogawa D, Senzaki O, Mizushima D, Owar A, Swiss Hepatitis C Cohort Study Group (SCCS) 2013. Impact of genetic IL28B transporter and ITPA variants on ribavirin serum level, hemoglobin drop and therapeutic response in patients with HCV infection. *J Hepatol* 23: 227-232.

Sao M, Sato K, Owar A 2011. Next genetic variants in the pathogenesis of hepatitis C. *Viruses* 3: 222-232.

Kembach K, Waldenström J, Kallstrand K, Molnau S, Nyström K, Martinsson A, Lindh M, Norderas O, Wessén J, Faldutsson C, Fällström M, Langstrand N, Dahl MK, Månch K, Christensen FB, Lippert M 2014. Variants of the inosine triphosphatase pyrophosphatase gene are associated with reduced relapse risk following treatment for HCV genotype 2b. *Hepatology* 58: 2131-2138.

Komuro-Dames M, Doranquer M, Molina E, Collaço JL 2013. Management of anemia induced by triple therapy in patients with chronic hepatitis C: challenges, opportunities and recommendations. *J Hepatol* 58: 1321-1330.

Takemoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, Yatahashi H, Nishiyoshi S, Soneoka M, Arima S, Nishimura-Sakurai Y, Kobayashi S, Mochida N, Takahashi K, Honda M, Ito K, Mizushima M, Yamanaka M 2012. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 55: 1001-1011.

Johnson TM, Ståhlensmayer AF, Steiner E, Maloney A, Steiner M, Lofel M, Schmeisser E, Dale C, Rutter K, Reinhardt S, Steindl-Munda F, Hafer K, Ferenci F 2012. Effect of gender and ITPA polymorphisms on ribavirin induced anemia in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 57: 890-891.

Zeng WK, Tanaka Y, Liu K, Lai CL, Yuan MF 2011. The effects of IL-12B and ITPA polymorphisms on treatment of hepatitis C virus genotype 1. *Am J Gastroenterol* 116: 1007-1012.

Thigpen M, Lenora E, Gallarick M, Wieland E, van Aken N 2008. Measurement of erythrocyte inosine triphosphatase pyrophosphatase (ITPA) activity by NPLC and correlation of ITPA genotype phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem* 54: 140-147.

Izumi S, Maruyama AM, Arima S, Fuchino S, Shikawa-Goto M, Imai DD, Thain SL, Asari A, Sanderason J, de Azevedo EA, Simmonds SA, Daley DA 2010. Genetic basis of inosine triphosphatase pyrophosphatase deficiency. *Human Genetics* 121: 200-207.

Zeng W, Chang M, Zeng S 2011. Management of hepatitis C antiviral therapy adverse effects. *Curr Opin Dig Dis* 33-40.

Izumi S, Suzuki Y, Akita N, Suzuki H, Nishikawa M, Komuro Y, Hoshino T, Kobayashi M, Ito S, Arima Y, Honda K, Kobayashi M, Ohayama K, Kametani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kurachi H 2011. Influence of ITPA polymorphisms on decrease of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin and telaprevir. *Hepatology* 53: 412-421.

Tanaka Y, Kurachi H, Mochida N, Sugiyama M, Matsuno K, Sakamoto N, Soneoka N, Yatahashi H, Nishiyoshi S, Hino K, Naga S, Sak Y, Tanaka S, Mochida S, Honda M, Hira Y, Kato A, Sugasaki T, Kurachi S, Izumi S, Takahashi K, Mizushima M 2011. Genomewide association study identified ITPA (C650G) variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *BMC Med Genet* 12: 1007-1012.

Thompson AJ, Falley J, Fiala K, Tillmann HL, Naggie S, Gu D, Urban S, Shianna KV, Mouton RP, Fried MW, Aldrich MN, Goldstein DB, McHalebian JD 2010. Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology* 118: 1121-1129.

Tokuta A, Shimada M, Ake H, Yoshizawa K, Agata E, Yamate Y, Ito M, Nishio Y, Nagasawa K, Matsuda H, Fujita K, Tada M, Arima Y 2012. Several factors including ITPA polymorphism influence ribavirin-induced anemia in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 18: 2270-2272.

4.3 Artigo 3. Delvaux N, de Almeida AJ, da Costa VD, da Costa MM, Sousa PSF, Lewis-Ximenez LL, Brandão-Mello CE, Coelho HS, Villela-Nogueira CA, Lampe E. Evaluate of IL28B polymorphisms with sustained virologic response in chronic hepatitis C patients. Submetido para ser considerado para publicação como artigo completo na revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases* em 16/07/2015 conforme e-mail confirmatório de recebimento do artigo do anexo.

ASSOCIATION OF IL28B POLYMORPHISMS WITH SPONTANEOUS RESOLUTION OF INFECTION AND WITH TREATMENT RESPONSE TO HCV INFECTION

Nathália Delvaux*¹, Adilson J Almeida^{1;2}, Vanessa D Costa¹, Maristella M Costa¹, Paulo SF Sousa¹, Lia Laura Lewis-Ximenez¹, Carlos E Brandão-Mello², Henrique SM Coelho³, Cristiane A Villela-Nogueira³, Elisabeth Lampe¹

¹Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil

²Department of General Medicine, Gaffrée & Guinle University Hospital (HUGG), Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO), RJ, Brazil

³Department of Hepatology, Clementino Fraga Filho University Hospital (HUCFF), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brazil

*Corresponding author: Nathália Delvaux, Laboratório Nacional de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Avenida Brasil, 4365 - Manguinhos - Código Postal: 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Telephone: (+55) 21 2562 - 1894. E-mails: nmdr@ioc.fiocruz.br and nathaliamdr@yahoo.com.br

SUMMARY

Background: IL28B genotypes are important as they are a marker of endogenous IFN-responsiveness and are also relevant in clinical practice to guide treatment decisions in patients with acute and chronic HCV infection.

Aims: To evaluate the role of IL28B in spontaneous and in treatment-induced clearance of HCV infection.

Methods: IL28B single nucleotide polymorphisms at rs12979860 and at rs8099917 were determined from 24 patients with acute HCV infections and from 111 patients with chronic HCV infection treated with PEG-IFN/RBV using the technique ARMS-PCR.

Results: Genotype CC at rs12979860 was related to a substantial increase in spontaneous clearance of the virus (73.3% vs 26.7% for CT/TT), and at rs8099917 genotype TT was detected in all patients who cleared the infection. Among treated subjects with genotypes CC at rs12979860, sustained virologic response (SVR) was achieved in 65.5% of them compared with 32.9% in those with genotypes CT/TT ($p = 0.0045$; OR 3.87, 95%CI 1.583 - 9.461). The association between IL28B rs8099917 genotypes and SVR was not statistically significant, although the presence of allele G was greater in non-responders than in SVR patients (66.7% vs 33.3%).

Conclusions: Our results confirm that the genetic variation in IL28B predicts spontaneous and hepatitis C treatment-induced viral clearance. The IL28B polymorphisms CC at rs12979860 and TT at rs8099917 were associated with spontaneous virus elimination in HCV acutely infected patients and the CC at rs12979860 was associated with SVR. Therefore, subjects with favorable IL28B genotype should delay treatment as HCV elimination is most likely to occur spontaneously. As subjects chronically infected with IL28B rs8099917 GG genotype have a high probability of not responding to treatment, they should therefore be considered for treatment with new interferon-free drugs.

Key words: IL28B, SNP, HCV, spontaneous clearance, SVR

1. INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV) is a global public health problem that infects approximately 185 million people worldwide.¹ In Brazil, it is estimated that about two million individuals are infected. Only a small proportion of cases of clinical acute hepatitis spontaneously clear the infection. Most of the infected develop chronic hepatitis. Treatment of chronic HCV infection remains a great challenge in terms of cost effectiveness. The success of antiviral treatment, known as sustained virological response (SVR), depends upon a combination of host and viral factors. SVR is defined as undetectable HCV RNA 6 months after completion of treatment. In 1991, interferon (IFN) was first approved for HCV therapy and, in 1998, was used in combination with ribavirin (RBV). Then, in 2001-2002, IFN was linked with the polyethylene glycol molecule (PEG-IFN). An additional advance came in 2011 with the approval of the HCV protease inhibitors telaprevir (TVR) and boceprevir (BOC). The addition of these inhibitors substantially increases the rate of SVR, from 40-45% to 68-79%, although the number of adverse events also increases significantly.^{2, 3, 4, 5} Shortly after, other direct-acting antiviral (DAA) inhibitors of NS3-4A protease, RNA-dependent RNA polymerase and NS5A protein were approved or are in clinical development stage in therapeutic regimens in combination with either PEG-IFN/RBV, RBV alone or other DAAs.^{6, 7}

Despite the great improvement in the response rate, these new therapeutic regimens have some constraints, which preclude its broad access for every patient infected with HCV, especially patients with decompensated cirrhosis and also due the risk of resistance development. Moreover, these new DAAs regimens are prohibitively expensive, preventing its use in many countries. Thus, the development of alternative or additional therapeutic

strategies, as well as the identification of SVR predictors, essentially before beginning treatment, remains a major target in HCV research.

The genome wide association study (GWAS) allowed the identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs), located on chromosome 19 upstream of the interleukin 28B (IL28B) gene, associated with treatment response and viral clearance to HCV infection. Several SNPs were identified, nonetheless, rs12979860 and rs8099917 demonstrated the highest association with the therapeutic outcome of HCV infection^{8, 9, 10, 11, 12, 13} and with spontaneous clearance of HCV.¹⁴ The IL28B gene encodes interleukin 28, a cytokine belonging to the IFN- λ family that is referred to as type III interferon (IFNL3) and is expressed in many human tissues. IL28B can be activated by viral infections, stimulating the immune system pathways against viral infections.^{15, 16, 17, 18}

The SVR rate with PEG-IFN/RBV therapy in HCV-1 infected patients is higher in individuals with the rs12979860 CC genotype than the CT/TT genotypes (70-80% vs. 30-40%).^{19, 20} Likewise, the SVR is higher in individuals with the rs8099917 TT genotype compared to the GT/GG genotypes (81% vs. 59%).²¹ These findings were also observed in patients co-infected with human immunodeficiency virus (HIV) and have been associated with spontaneous clearance.¹⁴ In children with perinatal acquisition of HCV it was also demonstrated that those with the rs12979860 C/C SNP of the IL28B gene have a higher probability of spontaneous clearance of hepatitis C virus.²²

The IL28B genotyping has shown usefulness also with the first-generation DAA approach to identify patients that can be treated successfully with a shorter and simpler treatment schedule. Over 80% of CC patients undergoing triple therapy with BOC or TVR were eligible for a shortened duration of treatment compared with approximately 50% of non-CC patients. Furthermore, patients with the CC genotype showed similar SVR rates with IFN/RBV with or without the addition of BOC.^{2, 4} Therefore, these patients may be eligible for dual therapy, which could spare them from the adverse events triggered by the

addition of another drug. In IFN-free therapy the effect of the favorable IL28B genotype on early viral kinetics was also demonstrated in HCV-1 infected patients (58 to 84% among patients with IL28B CC [rs12979860] vs. 33 to 64% in patients with non-CC genotypes).²³,

²⁴ The objective of this study was to evaluate the role of IL28B polymorphisms (rs12979860 and rs8099917) in spontaneous and in treatment-induced clearance of HCV infection.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Study population

Two cohorts of patients were studied: 24 patients with acute HCV infections (9 males, aged 45.17±13.0 years) and 111 patients with chronic HCV infection on antiviral therapy (42 males, aged 56.9±9.8 years). Blood samples were collected in EDTA tubes between 2011 and 2014. Patients with acute infection were prospectively followed from the initial phase until 12 months of disease on an outpatient basis at the Oswaldo Cruz Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Acute infected patients were either symptomatic (i.e., jaundice and/or dark urine) with elevated alanine aminotransferase (ALT) or were asymptomatic with recent anti-HCV seroconversion. Patients were followed for up to 12 months after initial phase of the infection. Seroconversion was defined as a positive anti-HCV antibody or HCV RNA PCR assay in a participant with a documented negative result of an anti-HCV test within the past year. Spontaneous clearance (SC) of HCV infection was defined as undetectable HCV RNA within the first 6 months of follow-up after the estimated date of infection, through quantitative Abbott Real Time HCV assay (lower detection limit: 12 IU/ml) in serum, in the absence of treatment. Patients with chronic HCV infection on antiviral therapy were prospectively evaluated on an outpatient basis at Gaffrée & Guinle University Hospital; Clementino Fraga Filho University Hospital, and Antônio Pedro University Hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Patients were treated with PEG-

IFN alpha 2b, administered subcutaneously at a dose of 1.0-1.5 µg/kg weekly plus full-dose RBV (1000- 1250 mg/day), during 24 (genotype 2 and 3) or 48 weeks (genotype 1). Biochemical and virological parameters at pre-treatment (baseline) were collected. SVR was defined as undetectable HCV-RNA in serum samples 24 weeks after the end of therapy.

The local Ethical Committee (CEP N° 297.459) approved this study. All patients eligible for the study were at least 18 years or older, male or female and had a diagnosis of chronic HCV infection (positive anti-HCV antibody and detectable HCV RNA in serum samples of patients with infection for more than 6 months).

2.2. Data collection and laboratory parameters

Information on demographics such as age, gender and HCV genotype were obtained at study entry. Serum aminotransferase (alanine aminotransferase - ALT) was measured with an automatic analyzer (Labmax Plenno, Lab test, MG, Brazil).

Determination of HCV genotypes was performed by using Abbott Real Time HCV assay (Abbott Laboratories, Illinois, USA), according to manufacturer's instructions.

2.3. IL28B Genotyping

Human genomic DNA was extracted from 200 µL of whole blood using the QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's directions, and stored at -20°C. Tetra-primer Amplification - Refractory Mutation System - Polymerase Chain Reaction (ARMS-PCR) was used to determine the IL28B genotype of both SNPs. The primers used to target the two SNPs and the ARMS-PCR reaction's protocol are the same as described earlier.²⁵ Briefly, this technique uses four primers in a single PCR reaction: two outer primers that amplify the region that comprises the SNP, and two inner allele-specific primers which produce allele-specific fragments. For the SNP rs12979860,

the inner forward primer was designed to hybridize the genomic sequence with the T allele and the reverse primer to the C allele. By placing the outer primers at different distances from the SNP, the two-specific fragments can be discriminated by their distinct sizes in an agarose gel. Thus, the outer primer pairs produced a fragment of 277 bp and the homozygote TT could be distinguished by an additional fragment of 198bp, the homozygote CC by a band of 132bp and the heterozygote TC produce both fragments. Similar procedure was done in the tetra-primer ARMS-PCR to determine the IL28B genotype of SNPrs8099917. The genotypes of rs8099917 could be differentiated according to the following fragment profile: TT - 437 bp and 295 bp; GG - 437 bp and 197 bp; and TG - 437 bp, 295 bp and 197 bp.

2.4. Statistical Analysis

Data are expressed as frequencies and mean \pm standard deviation for continuous variables with a normal distribution or median and ranges for those that did not pass normality test (Kolmogorov-Smirnov test). To compare categorical variables we used the Pearson's chi-square (χ^2) test for independence with Yate's continuity correction and Fisher's exact test as appropriate. Differences between groups were considered statistically significant at $p < 0.05$ (two-tailed). All calculations were performed by using Graph Pad In Stat 1998, version 3.01 for Windows 95 (Graph Pad Software, San Diego, CA., USA).

3. RESULTS

3.1. IL28B in patients with acute HCV infections and association with SC

IL28B genotype of SNPs rs12979860 and rs8099917 were determined in 24 well-characterized patients acutely infected with HCV and prospectively followed from the initial phase of the infection. Fifteen women (62.5%) and 9 men (37.5%) comprised these study

cohort with a mean age of 45.1 years (range, 24-66 years). All patients of this group were infected by HCV genotype 1. Spontaneous clearance (SC) of viral infection within the first 6 months of follow-up was observed in 15 patients (62.5%) and the other 9 patients (37.5%) develop chronic hepatitis. The rs12979860 CC, CT, and TT variants were detected, respectively, in 62.5% (15/24), 29.1% (7/24), and in 8.3% (2/24) patients with acute HCV infection (Table1).

The rs12979860 CC genotype was detected in 73.3% (11/15) patients who experienced SC of HCV infection. The rs12979860 CT/TT genotype was detected in 26.7% (4/15) patients with SC. The association between IL28B genotypes and SC demonstrated that the CC genotype was related to a substantial increase in spontaneous clearance of the virus (CC *versus* CT/TT; 73.3% *versus* 26.7%) but did not reach significant statistical value ($p=0.2119$; OR: 3.438; 95CI: 0.6013-19.653). Figure 1A shows the frequencies of SVC among different rs12979860 genotypes.

As for rs8099917, genotypes TT and TG were detected, respectively, in 87.5% (21/24) and 12.5% (3/24) in the acute HCV infection cohort. The rs8099917 TT genotype was found in 71.4% (15/21) of patients with SC. TG genotypes were found only in patients who developed chronic infection, i.e., none of the rs8099917 with G allele ($n=3$) demonstrated spontaneous clearance (Figure 1A). The association between IL28B genotypes and SC demonstrated that were statistically significant ($p=0.0415$; OR: 16.692; 95CI: 0,7503 - 371.38).

3.2. IL28B in patients with chronic HCV infection and association with SVR

A total of 111 chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN/RBV were included in this study. The demographic and clinical characteristics at baseline of the patients included in this study are shown in table1. Most patients were female (62.6%), with a mean age of 56.9±9.8 years (range, 28-78 years). Median ALT baseline values were 97.7±61.1 U/L.

HCV genotype 1 was the most prevalent (86.5%). SVR was achieved in 41.4% (46/111) of patients.

The rs12979860 CC, CT and TT variants were found, respectively, in 26.1% (29/111), 50.5% (56/111), and in 23.4% (26/111) in this cohort of patients. Among the 29 genotype CC patients, 19 (65.5%) achieved SVR. In patients with genotypes CT/TT (n=82) a SVR was observed in 27 (32.9%) of them (Figure 1B). The association between IL28B genotypes (CC vs CT/TT) and SVR rates demonstrated that differences were statistically significant ($p=0.0045$; OR 3.87, 95%CI 1.583 - 9.461).

Frequencies of IL28B genotypes TT, TG, and GG at rs8099917 were, respectively, 59.5% (66/111), 35.1% (39/111), and 5.4% (6/111). In patients with the homozygote TT (n=66) a SVR was observed in 31 (46.9%) individuals. In the 45 patients with TG/GG genotypes, 15 (33.3%) achieved SVR and 30 (66.7%) were nonresponder (Figure 1B). Although the presence of allele G was greater in nonresponders than in SVR patients (66.7% vs 33.3%), the association between IL28B rs8099917 genotypes and SVR demonstrated that differences were not statistically significant ($p=0.2166$; OR:1.771; 95CI: 0.8070 - 3.888).

4. DISCUSSION

This study on the association of genetic variation in IL28B gene in spontaneous and in treatment-induced clearance of HCV infection confirm the impact of the IL28B genotypes in HCV viral control and expands the potential clinical utility of testing IL28B genotype. In many parts of the world, the PEG-IFN/RBV therapy remains the only treatment for HCV due to the high cost of DAAs drugs. IL28B genotypes are important as they are a marker of endogenous IFN-responsiveness and also are relevant in clinical practice to guide treatment decisions in patients with acute and chronic HCV infection. Our study presents

the IL28B genotype association of two IL28B SNPs with the outcome of the disease towards SC and with treatment outcome.

Distinct genetic variation in the IL28B was observed in the two cohorts of patients studied. The CC genotype (rs12979860) was the most prevalent in acute hepatitis C patients compared to the chronic patients (62.5% vs 26.1%). As regard the rs8099917 SNP, the prevalence of TT genotype was 87.5% in acute and 59.0% in chronic hepatitis C patients. This data confirms that the CC genotype at rs12979860 and the TT at rs8099917 had an important role in the control of the infection, since patients with this genotype are more likely to clear the virus spontaneously, whereas patients with the unfavorable genotypes are more prone to progress to chronicity, thus explaining the lowest rate these genotypes in the cohort with chronic hepatitis. Interestingly, the genotype CC frequency in patients who did not clear the virus spontaneously is similar to that observed in the cohort of chronic hepatitis (26.7% and 26.1%, respectively).

The IL28B rs12979860 and rs8099917 genotypes frequencies in the both cohorts studies are similar to those reported previously.^{26, 27, 28, 29, 30, 31, 32} Moreover, in accordance with data from literature, in this study patients with acute infection who spontaneously cleared HCV infection the frequency of CC genotype was significantly higher compared to patients who progress to chronicity (73 vs 26%). Data from the literature also showed that the allelic frequencies of rs12979860 were significantly different in patients with spontaneous HCV clearance in comparison to patients with chronic hepatitis C, where CC genotype is observed in about 70% of cases with SC, whereas in patients with chronic hepatitis C, the proportion of this genotype varies from 39.6% to 17.1%. Moreover, a significant negative linear trend in the order of the CC genotype frequencies of patients with an increasing severity of liver diseases (from 40% in CHC, 30% in cirrhosis to 17% in HCC) was report in a recent study about the impact of IL28B polymorphism on natural

outcome of infection, suggesting an important role of CC allele in liver disease progression.³³

Our data demonstrated clearly that individuals who were homozygous for the C allele at rs12979860 and homozygous for the T allele at rs8099917 had more probabilities of achieved the SC. More than 70% of patients who spontaneously cleared the virus were carriers of these genotypes. In particular, for rs8099917 the association between IL28B genotypes and SC demonstrated that were statistically significant ($p=0.0415$). The clinical impact of these results is that acute infected HCV subjects could postpone the therapy to allow the spontaneous clearance, as more than 70% of them clear the infection without treatment. In the Australian trial in acute hepatitis C, the IL28B rs8099917 TT homozygote (*versus* GT/GG, $p=0.044$) was the only independent factor associated with spontaneous clearance.²⁶

The mechanism and explanation behind the association of genetic variations in the IL28B gene and SC may be related to the host innate immune response. IL28B encodes IFN-III, which is involved in viral control of HCV.³⁴ IFNs bind to cell-surface receptors and activate the Janus kinase–signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT) cell-signaling cascade leading to the induction of interferon stimulating genes (ISGs), a mechanism by which IFNs suppress viral infections.³⁵

In our case series of patients with chronic HCV infection on antiviral therapy, the major C allele for rs12979860 were observed with a great association ($p = 0.0045$) with SVR. However, no significant statistical association with SVR was observed for the genotypes of rs8099917. Other studies also found that genetic variations in rs8099917 did not have significant impact on SVR.^{26, 30} On the other hand, the presence of allele G was twice greater in non-responders than in SVR patients (66.7% vs 33.4%) in the chronic HCV cohort studied. This is agreement with previous studies which found that G allele was associated with failure to antiviral treatment, with is considered risk allele. Overall, the

results observed in this study are consistent with previous studies carried on in Brazil^{31, 32,}
³⁶ and with studies conducted worldwide.^{8, 10, 12, 13}

In conclusion, our results indicate that the IL28B polymorphisms are strong predictors for SC in patients with acute HCV infection and for SVR in chronically infected patients on antiviral therapy with PEG-IFN/RBV. In acute infected patients, it was demonstrated that the favorable IL28B single nucleotide polymorphisms (CC at rs12979860 and TT at rs8099917) were associated with high rates of SC. Therefore these patients with favorable ILB28B genotypes should delay treatment as spontaneous clearance is mostly to occur. As chronically HCV infected patients, with IL28B rs8099917 GG genotype, have a high probability of not responding to treatment, they should therefore be considered for treatment with new interferon-free drugs.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Geane Lopes Flores, Islene Azevedo, Letícia de Paula Scalioni, Moyra Machado Portilho and Selma Xavier Silva Lima Pinheiro for technical assistance in collecting blood samples. This study was partially supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. All the authors declared no competing interests.

Table 1: Demographic and clinical characteristics of patients with acute hepatitis C (n=24) and patients chronically infected (n = 111).

Characteristics	Baseline Values	
	Acute hepatitis C	Chronic hepatitis C
Age (years), mean ± SD	45.17±13.0 years	56.9±9.8 years
Sex, n (%):		
Male	9 (37.5)	42 (37.8)
Female	15 (62.5)	69 (62.2)
ALT* (U/L), median (range)	78.7 ± (60.7-93.8)	97.7±61.1
HCV genotype [†] , n (%):		
1	24 (100.0)	102 (91.9)
2	-	2 (1.8)
3	-	7 (6.3)
SC, n (%):		
Yes	15 (62.5)	-
No	9 (37.5)	-
SVR, n (%):		
Yes	-	46 (41.4)
No	-	65 (58.6)
IL28B rs12979860, n (%):		
CC	15 (62.5)	29 (26.1)
CT	7 (29.1)	56 (50.5)
TT	2 (8.3)	26 (23.4)
IL28B rs8099917, n (%):		
TT	21 (87.5)	66 (59.5)
TG	3 (12.5)	39 (35.1)
GG	0 (0.0)	6 (5.4)

* ALT normal values up to 41 U/L.

† Abbott Real Time HCV assay (Abbott Laboratories, Illinois, USA). Lower detection limit: 12 IU/ml.

‡ Without genotype information.

ALT, alanine aminotransferase; NA, not applicable; SVR, sustained virological response.

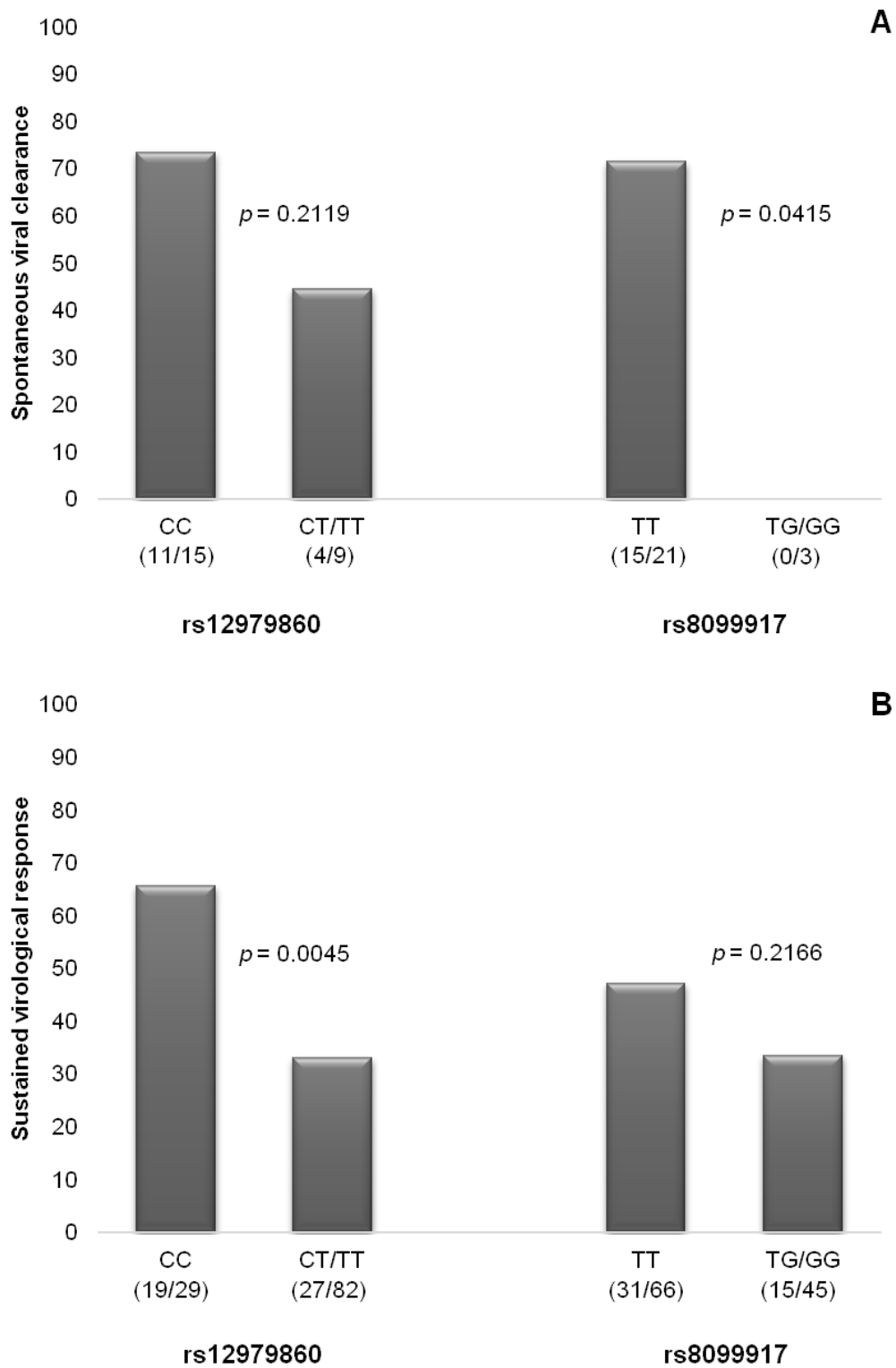


Figure 1: Genotype frequencies of IL28B rs12979860 and rs8099917. (A) Spontaneous clearance of HCV infection in relation to IL28B genotypes (n=24). (B) Sustained virological response according to IL28B genotypes in patients treated with PEG-IFN/RBV (n=111).

REFERENCES

1. Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med.* 2013;19(7):850-8. [doi: 10.1038/nm.3184](https://doi.org/10.1038/nm.3184).
2. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;364 (25), 2405–2416. [doi:10.1056/NEJMoa1012912](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1012912).
3. Muir AJ. IL28B in the era of direct-acting antivirals for hepatitis C. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47 (3), 222-227. [doi:10.1097/MCG.0b013e3182680221](https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182680221).
4. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2011;364 (13), 1195–1206. [doi:10.1056/NEJMoa1010494](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010494).
5. Stättermayer AF, Scherzer T, Beinhardt S, Rutter K, Hofer H, Ferenci P. Review article: genetic factors that modify the outcome of viral hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1059-70. [doi: 10.1111/apt.12717](https://doi.org/10.1111/apt.12717).
6. Trinks J, Hulaniuk ML, Redal MA, Flichman D. Clinical utility of pharmacogenomics in the management of hepatitis C. *Pharmgenomics Pers Med.* 2014;20;7:339-47. [doi: 10.2147/PGPM.S52624](https://doi.org/10.2147/PGPM.S52624).

7. Pawlotsky JM, Feld JJ, Zeuzem S, Hoofnagle JH. From non-A, non-B hepatitis to hepatitis C virus cure. *J Hepatol.* 2015 Apr;62(1 Suppl):S87-99. doi:[10.1016/j.jhep.2015.02.006](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.006).
8. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, *et al.* Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009;461 (7262), 399-401. doi:[10.1038/nature08309](https://doi.org/10.1038/nature08309).
9. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al.* Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010;138 (4), 1338-1345, 1345. doi:[10.1053/j.gastro.2009.12.056](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.056).
10. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, *et al.* Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology.* 2010;138 (7), 2307-2314. doi:[10.1053/j.gastro.2010.02.009](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.02.009).
11. Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology.* 2010;52 (1), 33-37. doi:[10.1002/hep.23624](https://doi.org/10.1002/hep.23624).
12. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, *et al.* IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet.* 2009;41 (10), 1100-1104. doi:[10.1038/ng.447](https://doi.org/10.1038/ng.447).

13. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al.* Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 2009;41 (10), 1105-1109. doi:[10.1038/ng.449](https://doi.org/10.1038/ng.449).
14. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, *et al.* Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature.* 2009;461 (7265), 798–801. doi:[10.1038/nature08463](https://doi.org/10.1038/nature08463).
15. Dellgren C, Gad HH, Hamming OJ, Melchjorsen J, Hartmann R. Human interferon-lambda 3 is a potent member of the type III interferon family. *Genes Immun.* 2009;10 (2), 125– 131. doi:[10.1038/gene.2008.87](https://doi.org/10.1038/gene.2008.87).
16. Li M, Liu X, Zhou Y, Su SB. Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009;86 (1), 23–32. doi:[10.1189/jlb.1208761](https://doi.org/10.1189/jlb.1208761).
17. Morrow MP, Yan J, Pankhong P, *et al.* IL-28B/IFN-lambda 3 drives granzyme B loading and significantly increases CTL killing activity in macaques. *Mol Ther.* 2010;18(9):1714–1723. doi: [10.1038/mt.2010.118](https://doi.org/10.1038/mt.2010.118).
18. Yoshimoto K, Kishida T, Nakano H, *et al.* Interleukin-28B acts synergistically with cisplatin to suppress the growth of head and neck squamous cell carcinoma. *J Immunother.* 2011;34(2):139–148. doi: [10.1097/CJI.0b013e318204ed70](https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318204ed70).
19. Chen JY, Lin CY, Wang CM, *et al.* IL28B genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon- α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection. *Genes Immun.* 2011;12 (4), 300-309. doi:[10.1038/gene.2011.1](https://doi.org/10.1038/gene.2011.1).

20. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, *et al.* Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*.2010;139 (1), 120–129. doi:[10.1053/j.gastro.2010.04.013](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.04.013).
21. Sakamoto N, Nakagawa M, Tanaka Y, *et al.* Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *J Med Virol*.2011;83 (5), 871-878. doi:[10.1002/jmv.22038](https://doi.org/10.1002/jmv.22038).
22. Indolfi G, Mangone G, Calvo PL, *et al.* Interleukin 28B rs12979860 single-nucleotide polymorphism predicts spontaneous clearance of hepatitis C virus in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(5):666-8. doi: [10.1097/MPG.0000000000000275](https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000275).
23. Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, *et al.* SVR4 and SVR12 with an interferon-free regimen of BI 201335 and BI 207127, +/- ribavirin, in treatment-naive patients with chronic genotype-1 HCV infection: interim results of SOUND-C2. *J Hepatol*.2012;56 (Suppl. 2), S45.
24. Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, *et al.* Faldaprevir and deleobuvir for HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*.2013;369 (7), 630–639. doi:[10.1056/NEJMoa1213557](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213557).
25. Delvaux N, da Costa VD, da Costa MM, Lampe E. Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients. *J Virol Methods*.2015;220:1-4. doi: [10.1016/j.jviromet.2015.04.001](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.001).

26. Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, *et al.* Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2010;52(4):1216-24. doi: [10.1002/hep.23850](https://doi.org/10.1002/hep.23850).
27. van den Berg CH, Grady BP, Schinkel J, *et al.* Female sex and IL28B, a synergism for spontaneous viral clearance in hepatitis C virus (HCV) seroconverters from a community-based cohort. *PLoS One*. 2011;6(11):e27555. doi: [10.1371/journal.pone.0027555](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027555).
28. Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, *et al.* A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology*. 2010;139(5):1586-92, 1592.e1. doi: [10.1053/j.gastro.2010.07.005](https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.07.005).
29. Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver Int*. 2011;31(4):443-60. doi: [10.1111/j.1478-3231.2011.02449.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02449.x)
30. da Silva Conde SR, Soares Monteiro JC, Silva Dos Santos BT, *et al.* SNP rs8099917 in gene IL28B might be associated with risk of chronic infection by HCV but not with response to treatment. *Biomed Res Int*. 2014;2014:748606. doi: [10.1155/2014/748606](https://doi.org/10.1155/2014/748606).
31. Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, *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. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(7):888-92.

32. Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, *et al.* Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. BMC Res Notes. 2012;5:508. [doi: 10.1186/1756-0500-5-508](https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-508).
33. De Re V, Gragnani L, Fognani E, *et al.* Impact of immunogenetic IL28B polymorphism on natural outcome of HCV infection. Biomed Res Int. 2014;2014:710642. [doi: 10.1155/2014/710642](https://doi.org/10.1155/2014/710642).
34. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. Gastroenterology. 2006;131(6):1887-98.
35. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, *et al.* Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. Hepatology. 2007;46:1548–63.
36. Cavalcante LN, Abe-Sandes K, Angelo AL, *et al.* IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. Liver Int. 2012;32(3):476-86. [doi: 10.1111/j.1478-3231.2011.02653.x](https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2011.02653.x)

V. DISCUSSÃO

Após a identificação do HCV em 1989, sabe-se que o mesmo apresenta importância e distribuição global, afetando diversos países. Desta forma, torna-se um grave problema de saúde, que por sua vez, requer intervenções ativas para a sua prevenção e controle. O HCV infecta cerca de 180 milhões de indivíduos pelo mundo e, no Brasil, mais de três milhões de pessoas estão infectadas (Choo, *et al.*, 1989; Lavanchy, 2009, 2011; Thomas, 2013). Além disso, o vírus apresenta uma alta variabilidade genética que o distingue em genótipos, subtipos e *quasiespecies* (Simmonds *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2014; Echeverría *et al.*, 2015). Devido à adaptação do vírus ao hospedeiro, as variantes geradas apresentam não só diferenças nos cursos clínicos, mas também diferenças no tratamento e em suas respostas. Ainda não existe uma vacina contra o HCV e o tratamento antiviral considerado padrão ainda é a combinação do IFN ou PEG-IFN com a RBV (Holmes *et al.*, 2012). Entretanto, novas terapias antivirais têm sido atualmente desenvolvidas, dentre os quais têm se destacado os DAA, muitos dos quais estão em uso em diversos países e outros já estão em fase avançada de ensaios clínicos (Lee *et al.*, 2011). Estes agem nas etapas essenciais do ciclo replicativo do HCV como a entrada do vírus nos hepatócitos, a tradução do RNA e a replicação propriamente dita (Poordad *et al.*, 2011).

Estudos demonstraram que a resposta antiviral está relacionada a diversos mecanismos, incluindo os fatores virais e os do hospedeiro (Fried *et al.*, 2002; Buti *et al.*, 2002). Entre os fatores virais definidos como preditivos da RVS está o genótipo viral, a alta carga viral pré-tratamento e mutações na sequência do HCV (Enomoto *et al.*, 1995 e 1996; Manns, 2004; Akuta *et al.*, 2005). Entre os fatores do hospedeiro, diversas variações genéticas encontradas no gene da IL28B e no gene da ITPA estão fortemente associadas com a RVS e a cura espontânea do HCV, e a proteção contra a anemia hemolítica, respectivamente.

Estudos observaram que os polimorfismos no gene da IL28B mostraram associação com a RVS ao tratamento pela infecção do HCV. Esses SNPs foram identificados como rs12979860 com os possíveis genótipos CC, TC e TT e rs8099917 com os genótipos TT, TG e GG. No SNP rs12979860, o genótipo CC foi o que apresentou a mais forte associação com a RVS, assim como o genótipo TT do SNP rs8099917 (Ge *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009). No entanto, a maioria dos métodos

de identificação dessas variantes atualmente disponíveis é custosa. Desta forma, é de extrema importância avaliar a relação de custo-benefício das técnicas utilizadas para a identificação desses polimorfismos. Assim sendo, o primeiro manuscrito que elaboramos relacionou-se com o desenvolvimento de protocolos próprios que pudessem fornecer resultados específicos com metodologias de baixo custo. O artigo publicado intitulou-se “Comparison of four methods of genotyping IL28B polymorphisms in chronic hepatitis C patients” e foi publicado no *Journal of Virological Methods* neste ano de 2015.

Neste trabalho, quatro metodologias foram empregadas para a caracterização dos SNPs do gene IL28B. Um total de 281 amostras de sangue obtidas de pacientes com infecção crônica pelo HCV foram estudadas. As metodologias *tetra-primer amplification-refractory mutation system-polymerase chain reaction* (ARMS-PCR), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), e sequenciamento nucleotídeo direto foram avaliadas em termos de especificidade, custo e tempo de execução.

Nossos resultados mostram que todos os métodos testados foram específicos para genotipagem de SNPs rs12979860 e rs8099917 do gene IL28B. No entanto, a metodologia ARMS-PCR apresentou os melhores resultados de acordo com a análise de custo-benefício. De acordo com a literatura, essa metodologia foi aplicada com sucesso em estudos que tinham como objetivo avaliar polimorfismos associados a diversas patologias, como diabetes, tuberculose, esquizofrenia, tipos de câncer, hepatite B, entre outros (Zhang, *et al.*, 2007; Lajin *et al.*, 2013; Almasi *et al.*, 2015; Mir *et al.*, 2015; Naderi *et al.*, 2015). Galmozzi e colaboradores utilizaram essa tecnologia em amostras de sangue previamente analisadas por sequenciamento direto, e observaram que foi possível diferenciar facilmente entre os genótipos dos SNPs do gene IL28B. Além disso, verificaram uma reprodutibilidade dos resultados em mais de 99% dos indivíduos analisados (Galmozzi *et al.*, 2011). Outros estudos com hepatite C que utilizaram o ARMS-PCR para a caracterização desses SNPs, também obtiveram sucesso concordando assim com os nossos resultados (Hashemi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Kiratlı *et al.*, 2014). Desta forma, conclui-se que esta abordagem representa um método simples, rápido e de menor custo que envolve uma única reação de PCR, seguida por eletroforese em gel. Essa técnica é de fácil execução para ser utilizada em laboratórios de diagnóstico molecular de rotina, com requisitos mínimos de equipamento. Por conseguinte, estes resultados são particularmente importantes nos

países em desenvolvimento, uma vez que, os laboratórios geralmente têm recursos financeiros escassos.

A publicação desse artigo comparando os quatro métodos de genotipagem do IL28B representa a consolidação dos dois primeiros objetivos específicos desta tese. As metodologias desenvolvidas foram mencionadas em todos os detalhes no manuscrito, de modo a permitir que outros autores possam não só reproduzir os protocolos, mas também, nos referenciar futuramente.

Na segunda publicação, avaliamos os SNPs rs1127354 e rs7270101 do gene da ITPA, que está relacionado com a proteção contra a anemia hemolítica induzida pela RBV utilizada no tratamento antiviral. Este artigo intitulou-se “ITPA allele’s frequency and association with ribavirin-induced anemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic Hepatitis C”, publicado *on line* na revista das Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, em julho de 2015.

Nos últimos anos, estudos realizados em pacientes infectados com hepatite C crônica tratados com PEG-IFN/RBV, identificaram polimorfismos no gene ITPA. Desta forma, foi possível observar que dois SNPs (rs7270101 e rs1127354) apresentavam uma forte associação com a anemia hemolítica induzida pela RBV, levando assim, a uma melhor compreensão dos efeitos da anemia induzida por esse medicamento (Fellay *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2010; Kurosaki *et al.*, 2013; Seto *et al.*, 2013; Tanaka *et al.*, 2010).

O gene ITPA codifica a inosina trifosfatase (ITPase) que catalisa a conversão de trifosfato de inosina (ITP) para monofosfato de inosina (IMP) e pirofosfato (Pi), e desta forma, o ITP não se acumula nas células normais. O ITP é usado para manter o trifosfato de adenosina (ATP) dos glóbulos vermelhos, evitando assim o estresse oxidativo. A deficiência de ITPase interrompe este ciclo, conduzindo assim a uma acumulação de ITP nas células (Cao & Hegele, 2002; Maeda *et al.*, 2005). A ribavirina (1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida) é um análogo de nucleosídeo sintético e tem ações *in vitro* contra muitos vírus (Patterson *et al.*, 1990) e tem sido utilizado em combinação com IFN durante o tratamento anti-viral. A RBV é incorporada nos eritrócitos onde sofre fosforilação para as suas formas farmacologicamente ativas através de adenosina-quinase. A ribavirina trifosfato é incapaz de atravessar a membrana celular dos eritrócitos e acumula intracelularmente, causando assim, dano oxidativo e conduzindo à hemólise (Kowdley *et al.*, 2005). A deficiência de ITPase provoca uma acumulação de ITP nas células vermelhas do sangue que pode competir

com a RBV trifosfato, protegendo assim da hemólise induzida pela RBV (Shipkova *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).

Para o nosso conhecimento, este trabalho é o primeiro a analisar a frequência dos polimorfismos no gene ITPA em uma coorte composta tanto por indivíduos saudáveis quanto por indivíduos brasileiros infectados pelo HCV. A distribuição alélica total (n = 300) nos SNPs rs7270101 e rs1127354 apresentou altas taxas dos genótipos AA (84%) e CC (94,3%), respectivamente. Estas frequências foram diferentes da relatada por Fellay e colaboradores (2010) onde observou que 48,4% dos americanos carregavam o genótipo AA (rs7270101) e, 47,6% o genótipo CC (rs1127354). Por outro lado, estudos europeus demonstraram que a maioria dos indivíduos possuíam os genótipos AA e CC, nos rs7270101 e rs1127354, respectivamente (D'Avolio *et al.*, 2012; Domingo *et al.*, 2012; Naggie *et al.*, 2012; Rau *et al.*, 2013). Nas populações japonesas e coreanas, o genótipo CC é o mais prevalente no rs1127354, mas são monoalélicos (AA) para o SNP rs7270101 (Ochi *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013).

Neste trabalho, a anemia foi mais observada em pacientes com os genótipos do gene ITPA ditos como preditores da anemia hemolítica induzida pela RBV, sendo concordantes com estudos realizados nos EUA (Fellay *et al.*, 2010; Thompson *et al.*, 2010), Europa (Naggie *et al.*, 2012; D'Avolio *et al.*, 2012; Rau *et al.*, 2013), e na Ásia (Ochi *et al.*, 2010; Sakamoto *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Kurosaki *et al.*, 2013). Apesar da população brasileira apresentar uma forte miscigenação devido aos fluxos migratórios, a distribuição alélica em ambos os SNPs desse gene apresentou maior similaridade com a verificada nas populações caucasianas embora, nossos resultados mostraram que os genótipos preditores de anemia hemolítica induzida pela RBV foram ligeiramente mais frequentes no nosso grupo de estudo, sugerindo assim, que nossa população de estudo pode ser geneticamente mais propensa a desenvolver anemia.

Nos 97 pacientes com o tratamento concluído observou-se uma diminuição progressiva de Hb na 12ª semana de tratamento com PEG-IFN/RBV. Em comparação com o valor de Hb pré-tratamento, a anemia (definida como Hb <10 g/dL e/ou um declínio superior a 2 g/dL) foi maior nos pacientes com o genótipo AA (rs7270101) e CC (rs1127354) em ambos os gêneros. Estes resultados são concordantes com estudos realizados na Espanha, onde pacientes co-infectados com HIV/HCV em terapia com PEG-IFN/RBV, apresentaram redução de Hb significativamente maiores

em pacientes com genótipo CC do que naqueles com genótipo CA/AA, durante as semanas 4 ($p=0,0003$), 12 ($p<0,0001$) e 36 ($p=0,0102$) (Domingo *et al.*, 2012). Outros trabalhos observaram que o declínio de Hb se dava na 4ª semana (D'Avolio *et al.* 2012; Naggie *et al.*, 2012; Rau *et al.* 2013) e na 12ª semana de terapia antiviral (Kim *et al.*, 2013).

Considerando as diferenças entre os gêneros dos pacientes, foi possível observar um declínio significativo de Hb até a 12ª semana. No SNP rs7270101, homens que possuíam o genótipo AA apresentaram uma queda maior, embora não estatisticamente significativa ($p=0,1475$), de Hb na 12ª semana em comparação com aqueles que tinham o genótipo CC/AC. Por outro lado, não houve influência do genótipo de ITPA sobre os níveis de Hb nos pacientes do sexo feminino, uma vez que a diminuição foi semelhante aos pacientes que tinham os genótipos AA e os CA/CC ($p=0,5295$). Para rs1127354, os homens e mulheres com genótipo CC também demonstraram uma queda mais evidente de Hb quando comparados com aqueles que tinham o genótipo AC. Scherzer e colaboradores (2013) observaram diferenças de incidência de anemia hemolítica induzida pela RBV na 4ª semana entre os gêneros, onde as mulheres na pré-menopausa tem menores chances de desenvolver a anemia do que as mulheres na pós-menopausa e em homens de qualquer idade. Essas diferenças não foram relacionadas com os genótipos de ambos os SNPs do gene ITPA. O autor especula que, no caso das mulheres, essa diferença na queda de Hb entre os grupos pré e pós menopausa poderia ocorrer devido a deficiência de ferro. Ademais, uma vez que a anemia nas mulheres na pós-menopausa e nos homens de qualquer idade não mostrou diferença, talvez a causa da anemia induzida pela RBV seja hormonal. Ainda assim, nos homens foi verificado uma queda ligeiramente maior nos níveis de Hb do que nas mulheres com mais de 46 anos. A razão de o porquê isso ocorre ainda é desconhecida, mas presume-se que o metabolismo das células vermelhas se faz de forma mais eficiente nas mulheres do que nos homens (Stattermayer *et al.*, 2014).

Nossos resultados mostraram que a maioria (78,7%) da nossa população apresenta 100% de atividade ITPase e apenas um pequeno número de pacientes (7,0%) apresentaram a atividade da ITPase inferior ou igual a 30%. Esses dados são concordantes com os obtidos por Rembeck e colaboradores (2014), onde a maioria dos pacientes também apresentou 100% de atividade ITPase. Além disso, a maioria dos pacientes de nossa coorte mostrou a pior combinação em ambos os SNPs

(AArs7270101 CCrs1127354 e ACrs7270101 CCrs1127354), o que poderia explicar o porquê de um número significativo de pacientes brasileiros desenvolver anemia induzida pela RBV, uma vez que a atividade da ITPase é conhecida por aumentar a probabilidade de desenvolvimento de anemia. Isso ocorre devido ao acúmulo anormal de ITP nas hemácias. Tanto razões congênitas como genéticas são responsáveis pela redução da atividade da ITPase. A proteção contra a anemia induzida pela RBV somado a redução da atividade da ITPase, pode reduzir o estresse oxidativo das células e, conseqüentemente, a hemólise (Hitomi *et al.*, 2011; Rembeck *et al.*, 2014).

Apesar de todos os pacientes possuírem seus dados completos sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos (pré-tratamento, 4^a, 8^a e 12^a semanas), e que haviam completado a terapia antiviral durante o período do estudo, a principal limitação desta publicação foi o tamanho da coorte relativamente pequena. Conseqüentemente, não foi possível observar associação entre a RVS e os genótipos da ITPA, concordando assim, com resultados obtidos de outros estudos (Thompson *et al* 2010; Motomura *et al* 2012; Naggie *et al* 2012; Kim *et al* 2013). Além disso, quase todos os pacientes tratados foram monoalélicos para o genótipo CC (rs1127354).

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo brasileiro a explorar as diferenças de gênero como possíveis co-fatores de proteção de anemia hemolítica induzida pela RBV em relação à distribuição do alelo ITPA e a diminuição da Hb durante o tratamento antiviral. Desta forma, nossos resultados nos permitem concluir, que a frequência alélica dos SNPs rs7270101 e rs1127354 do gene ITPA apresenta, respectivamente, altas taxas dos genótipos AA e CC, sugerindo que a coorte estudada possui uma grande propensão para o desenvolvimento de anemia induzida pela RBV. Ademais, vimos uma diminuição progressiva de Hb durante as semanas da terapia antiviral, sendo que essa diminuição foi mais significativa na 12^a semana de tratamento e em pacientes do sexo masculino.

Com a publicação deste artigo intitulado “*ITPA allele’s frequency and association with ribavirin-induced anemia in Brazilian patients receiving antiviral therapy for chronic hepatitis C*” foi possível alcançar os dois últimos objetivos específicos desta tese. Desse modo, a relação dos SNPs do gene ITPA com a redução de Hb e a influência dos fatores clínicos com o desenvolvimento de anemia grave durante o tratamento antiviral, possibilita não só auxiliar a utilização racional dos medicamentos pelo SUS, mas também, poupar os pacientes dos sérios efeitos colaterais.

Em nosso terceiro trabalho, submetido recentemente à revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, analisamos a associação entre os genótipos de ambos os SNPs do gene da IL28B com a resolução espontânea (RE) da infecção pelo HCV bem como, com a resposta virológica sustentada (RVS) alcançada por meio do tratamento antiviral.

Nosso estudo confirma a importância dos genótipos preditores no controle viral do HCV e potencializa a utilidade clínica da genotipagem do gene IL28B. O tratamento padrão e disponível em diversos países ainda é a combinação PEG-IFN/RBV (Holmes *et al.*, 2012). Devido ao elevado custo dos medicamentos dos DAAS, o desenvolvimento de alternativas terapêuticas ou análises adicionais, bem como a identificação de fatores predivos de RE e de RVS, continua a ser um dos principais alvos na pesquisa do HCV.

No nosso trabalho, os genótipos de ambos os SNPs do gene da IL28B foram determinados em dois grupos distintos: 24 pacientes agudos infectados e 111 pacientes crônicos tratados com PEG-IFN/RBV. No SNP rs12979860, o genótipo CC foi o mais prevalente em pacientes com hepatite C aguda em comparação com os pacientes crônicos (62,5% vs 26,1%). Em relação ao SNP rs8099917, a prevalência de genótipo TT foi de 87,5% nos indivíduos agudos e 59,0% nos indivíduos portadores da doença crônica. Estes dados confirmam que tanto o genótipo CC (rs12979860) quanto o TT (rs8099917) apresentam importância no controle da infecção, uma vez que os pacientes com estes genótipos favoráveis são mais propensos a eliminar o vírus espontaneamente. Já os pacientes portadores dos genótipos desfavoráveis são mais propensos a progredir para a cronicidade, o que poderia explicar a menor taxa desses genótipos na coorte de pacientes com hepatite crônica. Interessante observar que a frequência do genótipo CC em pacientes que não eliminaram o vírus espontaneamente se assemelha ao observado no grupo de hepatite crônica (26,7% e 26,1%, respectivamente).

As frequências dos genótipos de IL28B (rs12979860 e rs8099917) encontrada no nosso trabalho são semelhantes aos relatados prévios (Grebely *et al.*, 2010; van de Berg *et al.*, 2011; Tillmann *et al.*, 2010; Romero-Gomez *et al.*, 2013; da Silva Conde *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2012a; 2012b). Grebely e colaboradores mostraram que 60,0% dos indivíduos que eram homozigotos para o alelo T no rs8099917, apresentavam uma maior resolução espontânea da infecção ($p = 0,021$) e que, nenhum dos homozigotos para o alelo G apresentou eliminação espontânea do vírus. Assim como

o trabalho de van de Berg e colaboradores, apontaram que as pessoas portadoras do genótipo TT no rs8099917 e do genótipo CC no rs12979860, eram mais propensas ao clareamento viral do que aquelas que possuíam os genótipos TG/GG e CT/TT, respectivamente. Além disso, os pacientes do sexo feminino alcançavam mais a resolução espontânea do que os do sexo masculino (52,0% vs 26,0%). Os genótipos CC e TT, no rs12979860 e rs8099917, respectivamente, foram mais frequentes em pacientes com clareamento viral espontâneo, quando comparados aos pacientes cronicamente infectados com o HCV (88,9% vs 30,3%; $p < 0,001$ e 88,9% vs 49,6%, $p = 0,002$) (Ramos *et al.*, 2012a). No trabalho de Tillmann e colaboradores, a eliminação espontânea viral foi mais comum em pacientes com o genótipo CC (64%) em comparação com CT (24%) ou TT (6%) ($p < 001$).

Além disso, estes estudos abordam que nos pacientes com infecção aguda e, que eliminam espontaneamente a infecção pelo HCV, a frequência do genótipo CC foi expressivamente maior em comparação aos pacientes que evoluem para a cronicidade (73,0% vs 26,0%). Por outro lado, De Re e colaboradores, observou que existe uma tendência negativa nas frequências dos genótipos CC em pacientes com gravidade crescente de doenças hepáticas (40% em CHC, 30% em cirrose, 17% em HCC), sugerindo um papel importante do alelo C na progressão da doença do fígado (De Re *et al.*, 2014).

Os nossos dados demonstram que os indivíduos homozigotos para o alelo C no rs12979860 e homozigotos para o alelo T no rs8099917 tinham maior probabilidade de alcançar a cura espontânea, mais de 70% dos pacientes que eliminaram o vírus eram portadores desses genótipos. Apesar de não apresentar significância estatística ($p=0.2119$), no rs12979860 o genótipo CC foi detectado em 73,3% dos pacientes que apresentaram RE enquanto que os genótipos CT/TT foram detectados em 26,7% dos pacientes com RE, demonstrando assim, que o genótipo favorável ocorre em uma frequência substancialmente maior no grupo que alcançou a RE. Para o rs8099917, a associação entre genótipos de IL28B e o clareamento espontâneo, demonstrou ser estatisticamente significativa ($p = 0,0415$). O impacto clínico desses resultados é que os indivíduos infectados pelo HCV poderiam adiar a terapia para permitir a eliminação espontânea, pois mais de 70% deles acabam se curando da infecção sem tratamento. Grebely e colaboradores, observaram que no SNP rs8099917, o homozigoto T (vs TG/GG) foi o único fator independente associado com a cura espontânea.

Em nossos casos de infecção crônica pelo HCV, o alelo C (rs12979860) apresentou uma grande associação ($p = 0,0045$) com a RVS. No entanto, para os genótipos do SNP rs8099917 não houve associação estatisticamente significativa com a RVS. Outros estudos também não acharam significância estatística entre rs8099917 e RVS (Grebely *et al.*, 2010; da Silva Conde *et al.*, 2014). Por outro lado, na nossa coorte de pacientes com hepatite C crônica, a presença do alelo G foi duas vezes maior em não-respondedores do que em pacientes com RVS (66,7% vs 33,4%). Esse dado é concordante com estudos anteriores que encontraram que o G alelo foi associado com a falha ao tratamento antiviral, considerado assim, como alelo de risco. No geral, os resultados observados neste estudo são consistentes com estudos anteriores realizados no Brasil (Ramos *et al.*, 2012a; 2012b). O estudo de Cavalcante e colaboradores (2012) no Brasil, também observou que o genótipo CC do rs12979860 foi associado à RVS, enquanto que os genótipos CT/TT foram associados com a falha na resposta à terapia antiviral ($p = 0,0112$). Já no rs8099917, o genótipo TT foi associado com a RVS, e os outros genótipos foram associados com pacientes não respondedores ao tratamento antiviral ($p = 0,080$). Além dos estudos realizados no Brasil, dados obtidos por trabalhos feitos pelo mundo corroboram com os nossos achados (Ge *et al.*, 2009; McCarthy *et al.*, 2010; Suppiah *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009).

Diante desses resultados podemos concluir que os polimorfismos IL28B são fortes preditores de cura espontânea do vírus em pacientes com infecção aguda pelo HCV bem como, para a RVS em pacientes cronicamente infectados submetidos à terapia antiviral com PEG-IFN/RBV. Em pacientes agudos, demonstrou-se que os SNPs favoráveis do IL28B (CC em rs12979860 e TT no rs8099917) foram associados com altas taxas de cura espontânea. Por conseguinte, pode se sugerir que esses pacientes com genótipos favoráveis poderiam ser acompanhados, pois a eliminação espontânea pode ocorrer com grande probabilidade, podendo assim postergar o tratamento se for necessário. Para os pacientes crônicos, com os genótipos desfavoráveis, a elevada probabilidade de não responder ao tratamento deve ser considerada, devendo ser considerado para estes pacientes o tratamento com novos medicamentos livre de IFN.

Com a submissão deste artigo intitulado “*Association of IL28B polymorphisms with spontaneous resolution of infection and with treatment response to HCV infection*” foi possível alcançar o terceiro e quarto objetivo específico desta tese, cujos resultados nos permitiram concluir que a genotipagem do IL28B pode ser extremamente útil para

individualizar estratégias de tratamento, identificar os pacientes que podem ser tratados com sucesso com regimes mais curtos, mais simples ou mais baratos. Além disso, pode auxiliar na utilização racional dos medicamentos pelo SUS e poupar os pacientes dos sérios efeitos colaterais da terapia antiviral.

VI. CONCLUSÕES

- A determinação do perfil alélico humano dos genes da IL28B (rs8099917 e rs12979860) por RFLP, ARMS-PCR e qPCR foram específicos com resultados 100% concordantes com os do sequenciamento nucleotídico.
- A técnica ARMS-PCR apresentou os melhores resultados de acordo com a análise de rapidez e custo-benefício.
- O desenvolvimento de anemia grave (Hb < 10g/dL) durante o tratamento foi mais acentuado nos pacientes com genótipo AA (rs7270101) e com genótipo CC (rs1127354), sendo que essa diminuição foi mais significativa na 12^a semana de tratamento e em pacientes do sexo masculino.
- A população estudada é geneticamente mais propensa a desenvolver anemia hemolítica induzida pela RBV, devido a alta frequência dos genótipos AA e CC, respectivamente, nos SNPs rs7270101 e rs1127354 do gene ITPA.
- Em pacientes com infecção aguda demonstrou-se que os SNPs do IL28B (CC, rs12979860 e TT, rs8099917) foram associados com melhores taxas de resolução espontânea da infecção pelo HCV.
- Nos pacientes crônicos pode-se observar que os indivíduos portadores do genótipo CC no rs12979860 e do genótipo TT no rs8099917 tinham maior probabilidade de apresentarem RVS após tratamento com PEG-INF/RBV.
- Os resultados obtidos demonstraram que os polimorfismos estudados do gene da IL28B tem papel importante no controle da infecção pelo HCV e que os SNPs do gene da ITPA são preditores de anemia hemolítica induzida pela RBV.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

American Association for the Study of Liver Diseases. AASLD Practice Guidelines: Recommendations for Testing, Managing and Treating Hepatitis C [Internet]. AASLD; 2014. Available from: www.aasld.org.

Abe H, Ochi H, Maekawa T, *et al.* Common variation of IL28 affects gamma-GTP levels and inflammation of the liver in chronically infected hepatitis C virus patients. *J Hepatol.* 2010;53(3):439-43.

Abou-Setta AM. Transmission risk of hepatitis C virus via semen during assisted reproduction: how real is it? *Hum Reprod* 2004;19(12):2711-7.

Adam R, McMaster P, O'Grady JG *et al.* Evolution of liver transplantation in Europe: Report of the European Liver Transplant Registry. *Liver Transplantation* 2003; 9:1231-43.

Ahlenstiel G, Booth DR, George J. IL28B in hepatitis C virus infection: translating pharmacogenomics into clinical practice. *J Gastroenterol.* 2010;45:903-910.

Akuta N, Suzuki F, Sezaki H, *et al.* Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2005;48:372-380.

Akuta N, Suzuki F, Kawamura Y, *et al.* Amino acid substitutions in the hepatitis C virus core region are the important predictor of hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2007;46:1357-1364.

Akuta N, Suzuki F, Hiraoka M, *et al.* Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin. *Hepatology.* 2010;52(2):421-9.

Akuta N, Suzuki F, Hiraoka M, *et al.* Amino acid substitution in HCV core/NS5A region and genetic variation near IL28B gene affect treatment efficacy to interferon plus ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2012;55(3):231-41.

Albecka A, Montserret R, Krey T, *et al.* Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol* 2011;85(4):1777-92.

Almasi S, Aliparasti MR, Aliasgarzadeh A, *et al.* Investigation of CTLA-4-318C/T gene polymorphism in cases with type 1 diabetes of Azerbaijan, Northwest Iran. *Immunol Lett.* 2015;166(2):134-9.

Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, *et al.* Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Eng J Med* 1989;321(22):1494-1500.

Alter MJ, Mast EE, Moyer LA, *et al.* Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12(1):13-26.

Alter HJ and Houghton M. Hepatitis C virus and eliminating post-transfusion hepatitis. *Nat Med.* 2000;6(10):1082-6.

Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5): S93-98.

Alter MJ. HCV routes of transmission: what goes around comes around. *Semin Liver Dis* 2011;31(4):340-6.

Appel N, Zayas M, Miller S, *et al.* Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. *PLoS Pathog* 2008;4(3):e1000035.

Ascione A, Tartaglione T, Giuseppe Di Costanzo G. Natural history of chronic hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis* 2007;39 Suppl 1:S4-7.

Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, *et al.* An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J* 2011;8:161.

Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, *et al.* Higher risk of hepatitis C virus perinatal transmission from drug user mothers is mediated by peripheral blood mononuclear cell infection. *J Med Virol* 2008;80(1):65–71.

Bartenschlager R, Ahlborn-Laake L, Mous J, *et al.* Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994;68(8):5045-55.

Berenguer M, Lopez-Labrador FX, Wright TL. Hepatitis C and liver transplantation. *J Hepatol* 2001;35:666-78.

Blackard JT, Smeaton L, Hiasa Y, *et al.* Detection of hepatitis C virus (HCV) in serum and peripheral-blood mononuclear cells from HCV-monoinfected and HIV/HCV-coinfected persons. *J Infect Dis* 2005;192(2):258–65.

Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol* 2001;44(2):159-79.

Bowen DG, Walker CM. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? *J Hepatol* 2005;42(3):408-17.

Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32(1):98-112.

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

Bruijne J, Weegink CJ, Jansen PL, *et al.* New developments in the antiviral treatment of hepatitis C. *Vox Sang.* 2009;97(1):1-12.

Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(17):8239-43.

Busch MP, Glynn SA, Wright DJ, *et al.* Relative sensitivities of licensed nucleic acid amplification tests for detection of viremia in early human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005;45(12):1853-63.

Buti M, Sanchez-Avila F, Lurie Y, *et al.* Viral kinetics in genotype 1 chronic hepatitis C patients during therapy with 2 different doses of peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *Hepatology* 2002;35(4):930-6.

Cammà C, Petta S, Cabibbo G, *et al.* Cost-effectiveness of boceprevir or telaprevir for previously treated patients with genotype 1 chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2013;59(4):658-66.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(1):41-9.

Cao H, Hegele RA. DNA polymorphisms in ITPA including basis of inosine triphosphatase deficiency. *J Hum Genet.* 2002;47(11):620–2.

Carroll SS, Tomassini JE, Bosserman M, *et al.* Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs. *J Biol Chem* 2003;278(14):11979-84.

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

Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006;3(2):47-52.

Chen S, Wang YM. Multigene tracking of quasispecies in viral persistence and clearance of hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2005;11(19):2874-84.

Cheney CP, Chopra S, Graham C. Hepatitis C. *Infect Dis Clin North Am* 2000;14(3):633-67.

Choo QL, Weiner AJ, Overby LR, *et al.* Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. *Br Med Bull.* 1990;46(2):423-41.

Choo QL, Richman KH, Han JH, *et al.* Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88(6):2451-5.

Chu, T, Kulkarni, R, Gane, EJ, *et al.* The effect of host IL28B genotype on early viral kinetics during interferon-free treatment in patients with chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2011;54 (S1), S521.

Cocquerel L, Voisselt C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol.* 2006;87(5):1075-84.

D'Avolio A, Ciancio A, Siccardi M, *et al.* Inosine triphosphatase polymorphisms and ribavirin pharmacokinetics as determinants of ribavirin-associated anemia in patients receiving standard anti-HCV treatment. *Ther Drug Monit.* 2012;34(2):165-70.

Da Silva Conde SR, Soares Monteiro JC, Silva Dos Santos BT, *et al.* SNP rs8099917 in gene IL28B might be associated with risk of chronic infection by HCV but not with response to treatment. *Biomed Res Int.* 2014;2014:748606.

De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, *et al.* Detection of hepatitis C virus in platelets: valuating its relationship to viral and host factors. *Hepatogastroenterology.* 2007;54(75):964-8.

De Almeida AJ, Campos-de-Magalhães M, Brandão-Mello CE, *et al.* Detection of hepatitis C virus in platelets:evaluating its relationship to antiviral therapy outcome. *Hepatogastroenterology.* 2009;56(90):429-3.

De Maria N, Colantoni A, Idilman R, *et al.* Impaired response to high-dose interferon treatment in African-Americans with chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterol* 2002;49(45):788-92.

De Re V, Gragnani L, Fognani E, *et al.* Impact of immunogenetic IL28B polymorphism on natural outcome of HCV infection. *Biomed Res Int.* 2014;710642.

Deuffic-Burban S, Delarocque-Astagneau E, Abiteboul E, *et al.* Blood-borne viruses in health care workers: Prevention and management. *J Clin Virol* 2011;52(1):4–10.

Dev AT, McCaw R, Sundararajan V, *et al.* Southeast Asian patients with chronic hepatitis C: the impact of novel genotypes and race on treatment outcome. *Hepatol* 2002;36(5):1259-65.

Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998;351(9099):351-5.

Domingo P, Guardiola JM, Salazar J, *et al.* Association of ITPA gene polymorphisms and the risk of ribavirin-induced anemia in HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients receiving HCV combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(6):2987-93.

Donahue JG, Muñoz A, Ness PM, *et al.* The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992;327(6):369-73.

Dore GJ, Law M, MacDonald M, Kaldor JM. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Australia. *J Clin Virol* 2003;26(2):171-84.

Ducoulombier D, Roque-Afonso AM, Di Liberto G, *et al.* Frequent compartmentalization of hepatitis C virus variants in circulating B cells and monocytes. *Hepatology* 2004; 39(3):817-25.

Echeverría N, Moratorio G, Cristina J, *et al.* Hepatitis C virus genetic variability and evolution. *World J Hepatol.* 2015;7(6):831-45.

Elazar M, Liu P, Rice CM, *et al.* An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol* 2004;78(20):11393–400.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, *et al.* Comparison of full-length sequences of interferon sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. *J Clin Invest.* 1995;96:224–230.

Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, *et al.* Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med.* 1996;334:77–81.

Espírito-Santo MP, Brandão-Mello CE, Marques VA, *et al.* Analysis of hepatitis C virus (HCV) RNA load in platelets of HCV-monoinfected patients receiving antiviral therapy. *Ann Hepatol.* 2013;12(3):373-9.

Eurich D, Boas-Knoop S, Ruehl M, *et al.* IL-28B gene polymorphism influences histological and biochemical severity of graft hepatitis after liver transplantation for HCV-induced liver disease. *J Hepatol.* 2010;52:S450.

Farci P, Alter HJ, Shimoda A, *et al.* Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N Engl J Med.* 1996;335(9):631-4.

Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, *et al.* Transfusion associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med.* 1975;292(15):767-70.

Feld JJ, Liang TJ. HCV persistence: cure is still a four-letter word. *Hepatology.* 2005;41(1):23-5

Feld JJ, Nanda S, Huang Y, *et al.* Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology.* 2007;46:1548–63.

Fellay J, Thompson AJ, Ge D, *et al.* ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. *Nature.* 2010;464(7287):405-408.

Ferreira, CT and da Silveira TR. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol.* 2004. Vol. 7, Nº 4.

Ferrero S, Lungaro P, Bruzzone BM, *et al.* Prospective study of mother-to-infant transmission of hepatitis C virus: a 10- year survey (1990-2000). *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2003;82(3):229-34.

Fischer B, Powis J, Firestone Cruz M, *et al.* Hepatitis C virus transmission among oral crack users: viral detection on crack paraphernalia. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2008;20(1):29-32.

Friebe P, Bartenschlager R. Genetic analysis of sequences in the 3' nontranslated region of hepatitis C virus that are important for RNA replication. *J Virol.* 2002;76(11):5326–38.

Fried MW. Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatol.* 2002;36(1):237-44.

Galmozzi E, Del Menico B, Rametta R, *et al.* A tetra-primer amplification refractory mutation system polymerase chain reaction for the evaluation of rs12979860 IL28B genotype. *J Viral Hepat.* 2011;18(9):628-30.

Galossi A, Guarisco R, Bellis L, *et al.* Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis.* 2007;16(1):65-73.

Gane E. The natural history and outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-infected recipients. *Liver Transpl.* 2003;9(11):S28-S34.

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

Gellad ZF, Reed SD, Muir AJ. Economic evaluation of direct-acting antiviral therapy in chronic hepatitis C. *Antivir Ther.* 2012;17(6 Pt B):1189-99.

Gerberding JL. Incidence and prevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus, and cytomegalovirus among health care personnel at risk for blood exposure: final report from a longitudinal study. *J Infect Dis.* 1994;170(6):1410-7.

Gocke DJ, Greenberg HB, Kavey NB. Hepatitis antigen. Detection of infectious blood donors. *Lancet* 1969;2(7614):248-9.

Gordon SC. Utility of IL-28B Polymorphisms in the Era of Direct-Acting Antiviral Therapy. *Gastroenterol Hepatol*. 2011;7(8):531-3.

Grebely J, Petoumenos K, Hellard M, *et al*. Potential role for interleukin-28B genotype in treatment decision-making in recent hepatitis C virus infection. *Hepatology*. 2010;52(4):1216-24.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, *et al*. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med*. 2004;140(5):346-55.

Hagan H, Pouget ER, Des Jarlais DC, *et al*. Meta-regression of hepatitis C virus infection in relation to time since onset of illicit drug injection: the influence of time and place. *Am J Epidemiol*. 2008;168(10):1099-1109.

Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari A, *et al*. A tetra-primer amplification refractory mutation system-polymerase chain reaction for the detection of rs8099917 IL28B genotype. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2012;31(1):55-60.

Helle F, Vieyres G, Elkrief L, *et al*. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol*. 2010;84(22):11905-15.

Heller T, Rehermann B. Acute hepatitis C: a multifaceted disease. *Semin Liver Dis* 2005;25(1):7-17.

Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, *et al*. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med*. 2009; 360: 1839–50.

Hitomi Y, Cirulli ET, Fellay J, *et al*. Inosine triphosphate protects against ribavirin-induced adenosine triphosphate loss by adenylosuccinate synthase function. *Gastroenterology*. 2011;140(4):1314-21.

Hladik W, Kataaha P, Mermin J, *et al.* Prevalence and screening costs of hepatitis C virus among Ugandan blood donors. *Trop Med Int Health.* 2006;11(6):951-4.

Holmes JA, Desmond PV, Thompson AJ. Does IL28B genotyping still have a role in the era of direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C infection? *J Viral Hepat.* 2012;19(10):677-84.

Hong Z, Cameron CE, Walker MP, *et al.* A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology.* 2001;285(1):6-11.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):15S-20S.

Huang L, Hwang J, Sharma SD, *et al.* Hepatitis C virus non- structural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J Biol Chem.* 2005;280:36417–28.

Huang H, Sun F, Owen DM, *et al.* Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(14):5848–53.

Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, *et al.* Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;364 (25), 2405–2416.

Jeannel D, Fretz C, Traore Y, *et al.* Evidence for high genetic diversity and long-term endemicity of hepatitis C virus genotypes 1 and 2 in West Africa. *J Med Virol.* 1998;55(2):92-7.

Jirasko V, Montserret R, Lee JY, *et al.* Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog.* 2010;6(12):e1001233.

Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, *et al.* Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol.* 1994;75(Pt 7):1755-60.

Kamal SM. Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol*. 2008; 103(5):1283-97.

Kaneko T, Tanji Y, Satoh S, *et al*. Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205(1):320–6.

Karlsen TH, Melum E, Franke A. The utility of genome-wide association studies in hepatology. *Hepatology*. 2010;51(5):1833-42.

Khaliq S, Jahan S, Ljaz B, *et al*. Inhibition of core gene of HCV 3a genotype using synthetic and vector derived siRNAs. *Virology*. 2010;137:318.

Kim JS, Ahn SM, Jung YK, *et al*. The impact of inosine triphosphatase variants on hemoglobin level and sustained virologic response of chronic hepatitis C in Korean. *J Korean Med Sci*. 2013;28(8):1213-9.

Kıratlı K, Gül HC, Artuk C, *et al*. Investigation of the association between paraoxonase-1 gene polymorphisms and response to therapy in chronic hepatitis C patients. *Mikrobiyol Bul*. 2014;48(4):596-605.

Kiyosawa K, Sodeyama T, Tanaka E, *et al*. Hepatitis C in hospital employees with needlestick injuries. *Ann Intern Med*. 1991;115(5):367-9.

Kohli A, Shaffer A, Sherman A, *et al*. Treatment of Hepatitis C. *JAMA*. 2014;312(6):631.

Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, *et al*. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol*. 2000;74(4):2046–51.

Kowdley KV. Hematologic side effects of interferon and ribavirin therapy. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39: S3–8.

Kurosaki M, Tanaka Y, Nishida N, *et al.* Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013;85(3):449-58.

Kwo PY. Response-guided therapy for HCV. *Gastroenterol Hepatol (NY).* 2011;7(1):43-5.

Lajin B, Alachkar A, Michati R, *et al.* Association between polymorphisms in the genes for tumor suppressor protein p53 and its regulator NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and schizophrenia in a Syrian study cohort. *Arch Med Res.* 2013;44(2):121-6.

Lam AM, Frick DN. Hepatitis C virus subgenomic replicon requires an active NS3 RNA helicase. *J Virol.* 2006;80(1):404–11.

Lan S, Yuan Z, Hu Y. Study of the 3'noncoding region of Chinese hepatitis C virus genome. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.* 1999; 13(2):153-6.

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

Lavanchy D. The global burden of hepatitis C. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:74-81.

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

Lee JW, Liao PC, Young KC, *et al.* Identification of hnRNPH1, NF45, and C14orf166 as novel host interacting partners of the mature hepatitis C virus core protein. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4522-34.

Li M, Liu X, Zhou Y, *et al.* Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *J Leukoc Biol.* 2009;86:23–32.

Li JH, Lao XQ, Tillmann HL, *et al.* Interferon-lambda genotype and low serum low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepatology.* 2010;51(6):1904-11.

Li W, Zeng Y, Wang J, *et al.* Predicting sustained viral response to hepatitis C using a rapid and simple IL28B rs8099917 genotyping assay. *Antiviral Res.* 2012;94(1):54-6

Li HC, Lo SY. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. *World J Hepatol.* 2015;7(10):1377-89.

Lin C, Thomson JA, Rice C M. A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J Virol.* 1995;69(7):4373–80.

Lin C, Lin K, Luong YP, *et al.* In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17508-14.

Liu CH, Liang CC, Liu CJ, *et al.* Interleukin 28B genetic polymorphisms play a minor role in identifying optimal treatment duration in HCV genotype 1 slow responders to pegylated interferon plus ribavirin. *Antivir Ther.* 2012;17(6):1059-67.

Lo Re V, Kostman JR. Management of chronic hepatitis C. *Postgrad Med J.* 2005;81(956):376-82.

Lopes CL, Teles SA, Espírito-Santo MP, *et al.* Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, Central-Western Brazil. *Rev Saúde Pública.* 2009;43(Suppl 1):43-50.

Lukavsky PJ. Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.* 2009;139(2):166–71.

Lundin M, Monne M, Widell A, *et al.* Topology of the membrane associated hepatitis C virus protein NS4B. *J Virol.* 2003;77(9):5428– 38.

Luo G, Hamatake RK, Mathis DM, *et al.* De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol.* 2000;74(2):851-63.

Ma H, Leveque V, De Witte A, *et al.* Inhibition of native hepatitis C virus replicase by nucleotide and nonnucleoside inhibitors. *Virology*. 2005;332(1):8-15.

Ma Y, Anantpadma M, Timpe JM, *et al.* Hepatitis C virus NS2 protein serves as a scaffold for virus assembly by interacting with both structural and nonstructural proteins. *J Virol*. 2011;85(1):86–97.

Maeda T, Sumi S, Ueta A, *et al.* Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in the Japanese population. *Mol Genet Metab*. 2005;85(4):271-9.

Mangia A. IL28B: A new wager in the skyline of hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis*. 2011; 43(3):177-9.

Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358(9286):958-65.

Manns MP. Adherence to combination therapy: influence on sustained virologic response and economic impact. *Gastroenterol Clin North Am*. 2004;33(1 Suppl):S11-24.

Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, *et al.* Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1887-98.

Marconi A, Candido S, Talamini R, *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection among health-care workers: A 10-year survey. *Mol Med Report*. 2010;3(4):561-4.

Martinson FE, Weigle KA, Mushahwar IK, *et al.* Seroepidemiological survey of hepatitis B and C virus infections in Ghanaian children. *J Med Virol*. 1996;48(3):278-83.

Mast EE, Hwang LY, Seto DS, *et al.* Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis*. 2005;192(11):1880–9.

McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, *et al.* Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology*. 2010;138(7):2307-14.

McHutchison J. Hepatitis C therapy in treatment-naïve patients. *Am J Med* 1998;107(6B):56S-61S.

Ministério da Saúde. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

Minola E, Maccabruni A, Pacati I, Martinetti M. Amniocentesis as a possible risk factor for mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Hepatology* 2001;33(5):1341–2.

Mir A, Sadegh MH, Ahmadiania Z, *et al.* PIK3CA rs7640662 (C/G) single nucleotide polymorphism lacks association with breast cancer cases in Persians. *Interv Med Appl Sci*. 2015;7(1):3-8.

Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis* 2008;14(1):10-4.

Mok J, Pembrey L, Tovo PA, *et al.* European Paediatric Hepatitis C Virus Network. When does mother to child transmission of hepatitis C virus occur? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90(2):F156-60.

Montes-Cano MA, García-Lozano JR, Abad-Molina C, *et al.* Interleukin-28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*. 2010;52(1):33-7.

Motomura T, Koga E, Taketomi A, *et al.* Efficacy of splenectomy in preventing anemia in patients with recurrent hepatitis C following liver transplantation is not dependent on inosine triphosphate pyrophosphatase genotype. *Hepatol Res*. 2012;42(3):288-95.

MS, Programa Nacional de Hepatites Virais. Hepatites Virais: O Brasil está atento. 2008a. 3ª Edição. Série B. Textos Básicos em Saúde. Brasília – DF.

MS, Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. 2008b. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Murphy DG, Willems B, Deschênes M, *et al.* Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1102-12.

Naderi M, Hashemi M, Khorgami P, *et al.* Lack of Association between miRNA-146a rs2910164 and miRNA-499 rs3746444 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis. *Int J Mol Cell Med.* 2015;4(1):40-5.

Naggie S, Rallon NI, Benito JM, *et al.* Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia in HIV/HCV-coinfected patients with all HCV genotypes. *J Infect Dis.* 2012;205(3):376-83.

Ochi H, Maekawa T, Abe H, *et al.* ITPA polymorphism affects ribavirin-induced anemia and outcome of therapy - a genome-wide study of Japanese HCV patients. *Gastroenterology.* 2010;139(4):1190-7.

Okochi K, Mayumi M, Haguino Y, Saito N. Evaluation of frequency of Australia antigen in blood donors of Tokyo by means of immune adherence hemagglutination technique. *Vox Sang.* 1970;19(3):332-7.

Oliveira ML, Bastos FI, Telles PR, *et al.* Epidemiological and genetic analyses of Hepatitis C virus transmission among young/short- and long-term injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol.* 2009; 44(3):200-6.

Op De Beeck A, Voisset C, Bartosch B, *et al.* Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol.* 2004;78(6):2994-3002.

Patterson JL, Fernandez-Larsson R. Molecular mechanisms of action of ribavirin. *Rev Infect Dis.* 1990;12(6):1139-46.

Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology*. 2000; 32(5):889-96.

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

Perry JL, Pearson RD, Jagger J. Infected health care workers and patient safety: a double standard. *Am J Infect Control*. 2006;34(5):313–19.

Perz JF, Farrington LA, Pecoraro C, *et al.* Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America; Boston, MA, USA, 2004.

Poordad F, McCone JJr, Bacon BR, *et al.* Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011;364 (13), 1195–1206.

Poynard T, Marcellin P, Lee SS, *et al.* Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet*. 1998;352(9138):1426-32.

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, *et al.* Viral hepatitis C. *Lancet*. 2003;362(9401):2095-100.

Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: A global review. *J Hepatology*. 2006;45(4):607-16.

Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, *et al.* HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct*. 2004;22(6):353-8.

Puro V, Petrosillo N, Ippolito G. Risk of hepatitis C seroconversion after occupational exposures in health care workers. Italian Study Group on Occupational Risk of HIV and Other Bloodborne Infections. *Am J Infect Control*. 1995;23(5):273-7.

Quezada EM, Kane CM. The hepatitis C virus NS5A stimulates NS5B during in vitro RNA synthesis in a template specific manner. *Open Biochem J.* 2009;3:39–48.

Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, *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. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012a;107(7):888-92.

Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, *et al.* Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. *BMC Res Notes.* 2012b;5:508.

Rau M, Stickel F, Russmann S, *et al.* Impact of genetic SLC28 transporter and ITPA variants on ribavirin serum level, hemoglobin drop and therapeutic response in patients with HCV infection. *J Hepatol.* 2013;58(4):669-75.

Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, *et al.* Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology.* 2010;138:1338-45, 1345.

Rembeck K, Waldenström J, Hellstrand K, *et al.* Variants of the inosine triphosphate pyrophosphatase gene are associated with reduced relapse risk following treatment for HCV genotype 2/3. *Hepatology.* 2014;59(6):2131-9.

Resti M, Azzari C, Mannelli F, *et al.* Mother to child transmission of hepatitis C virus: prospective study of risk factors and timing of infection in children born to women seronegative for HIV-1. Tuscany Study Group on Hepatitis C Virus Infection. *BMJ.* 1998;317(7156):437- 41.

Richard-Lenoble D, Traore O, Kombila M, *et al.* Hepatitis B, C, D, and E markers in rural equatorial African villages (Gabon). *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(4):338-41.

Riddell LA, Sherrard J. Blood-borne virus infection: the occupational risks. *Int J STD AIDS*. 2000;11(10):632-9.

Romero-Gómez M, Berenguer M, Molina E, *et al*. Management of anemia induced by triple therapy in patients with chronic hepatitis C: challenges, opportunities and recommendations. *J Hepatol*. 2013;59(6):1323-30.

Roth WK, Weber M, Buhr S, *et al*. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. *Transfusion*. 2002;42(7):862-8.

Sakai A, Claire MS, Faulk K, *et al*. The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(20):11646-51.

Sakamoto N, Tanaka Y, Nakagawa M, *et al*. ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res*. 2010;40(11):1063-71.

Sandres-Sauné K, Deny P, Pasquier C, *et al*. Determining hepatitis C genotype by analyzing the sequence of NS5b region. *J Virol Methods*. 2003;109:187-193.

Seto WK, Tsang OT, Liu K, *et al*. Role of IL28B and inosine triphosphatase polymorphisms in the treatment of chronic hepatitis C virus genotype 6infection. *J Viral Hepat*. 2013;20(7):470-7.

Scherzer TM, Stättermayer AF, Stauber R *et al*. Effect of gender and ITPA polymorphisms on ribavirin induced anemia in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol*. 2013;59(5):964-71.

Sharma SD. Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res*. 2010;131:17-34. Brasília – DF.

Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, *et al*. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol*. 2003;4:63-68.

Sherman KE. Managing adverse effects and complications in completing treatment for hepatitis C virus infection. *Top Antivir Med.* 2012;20(4):125-8.

Shipkova M, Lorenz K, Oellerich M, *et al.* Measurement of erythrocyte inosine triphosphate pyrophosphohydrolase (ITPA) activity by HPLC and correlation of ITPA genotype-phenotype in a Caucasian population. *Clin Chem.* 2006;52(2):240-7.

Shirota Y, Luo H, Qin WS, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11149–55.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol.* 1993;74(Pt 11):2391-99.

Sirén J, Pirhonen J, Julkunen I, *et al.* IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29. *J Immunol.* 2005;174(4):1932-7.

Smith DB, Bukh J, Kuiken C, *et al.* Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014;59(1):318-27.

Stapleford KA, Lindenbach BD. Hepatitis C virus NS2 coordinates virus particle assembly through physical interactions with the E1-E2 glycoprotein and NS3- NS4A enzyme complexes. *J Virol.* 2011;85(4):1706–17.

Stättermayer AF, Scherzer T, Beinhardt S, *et al.* Review article: genetic factors that modify the outcome of viral hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(10):1059-70.

Steinmann E, Penin F, Kallis S, *et al.* Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 2007;3(7):103.

Summers BB, Beavers JWF, Klibanov OM. Sofosbuvir, a novel nucleotide analogue inhibitor used for the treatment of hepatitis C virus. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(12):1653–66.

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

Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, *et al*. Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. *Hepatology*. 2011;53(2):415-21.

Suzuki T. Morphogenesis of infectious hepatitis C virus particles. *Front Microbiol* 2012;3:38.

Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, *et al*. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet*. 2009;41(10):1105-9.

Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, *et al*. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet*. 2010;20(17):3507-16.

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

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Rice CM. Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature*. 2005;435(7040):374–9.

Tellinghuisen TL, Foss KL, Treadaway JC, *et al*. Identification of residues required for RNA replication in domains II and III of the hepatitis C virus NS5A protein. *J Virol*. 2008;82(3):1073–83.

Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5 Suppl 1):S99-105.

Thiel HJ, Collett MS, Gould EA, *et al.* Flaviviridae. In: Fauquier CM, Mayo MA, Msnilogg J, Desslberger U, Baa LA, eds. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICT. 2005:979-96.

Thimme R, Oldach D, Chang KM, *et al.* Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med.* 2001;194(10):1395-406.

Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, *et al.* Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(24):15661-8.

Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, *et al.* The natural history of hepatitis C virus infection: host, viral, and environmental factors. *JAMA.* 2000;284(4):450-6.

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

Thomas DL. Global control of hepatitis C: where challenge meets opportunity. *Nat Med.* 2013;19(7):850-8.

Thompson BJ, Finch RG. Hepatitis C virus infection. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(2):86-94.

Thompson AJ, Fellay J, Patel K, *et al.* Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. *Gastroenterology.* 2010;139(4):1181-9.

Tillmann HL, Thompson AJ, Patel K, *et al.* A polymorphism near IL28B is associated with spontaneous clearance of acute hepatitis C virus and jaundice. *Gastroenterology.* 2010;139(5):1586-92, 1592.

Tomei L, Altamura S, Bartholomew L, *et al.* Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by nonnucleosides. *J Virol.* 2004;78(2):938-46.

Van den Berg CH, Grady BP, Schinkel J, *et al.* Female sex and IL28B, a synergism for spontaneous viral clearance in hepatitis C virus (HCV) seroconverters from a community-based cohort. *PLoS One*. 2011;6(11):e27555.

Vandelli C, Renzo F, Romanò L, *et al.* Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(5):855-9.

Vassilaki N, Mavromara P. The HCV ARFP/F/core+1 protein: production and functional analysis of an unconventional viral product. *IUBMB Life*. 2009;61(7):739-52.

Vermehren J, Sarrazin C. New HCV therapies on the horizon. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(2):122-34.

Vieyres G, Thomas X, Descamps V, *et al.* Characterization of the envelope glycoproteins associated with infectious hepatitis C virus. *J Virol*. 2010;84(19):10159-68.

Wasley A, Alter M. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Sem Liver Dis*. 2000;20:1-6.

Wendt A, Adhoute X, Castellani P, *et al.* Chronic hepatitis C: future treatment. *Clin Pharmacol*. 2014;6:1-17.

Wiesner RH, Sorrell M, Villamil F. Report of the first Internacional Liver Transplantation Society expert panel consensus conference on liver transplantation and hepatitis C. *Liver Transp*. 2003;9:S1-S9.

Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, *et al.* Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol*. 2000;74(5):2293–2304.

Woodfield DG, Harness M, Rix-Trott K. Hepatitis C virus infections in oral and injectable drug users. *N Z Med J*. 1993;106(961):332-4.





Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, *et al.* Faldaprevir and deleobuvir for HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med.* 2013;369 (7), 630–639.


Zeuzem S, Soriano V, Asselah T, *et al.* SVR4 and SVR12 with an interferon-free regimen of BI 201335 and BI 207127, +/- ribavirin, in treatment-naive patients with chronic genotype-1 HCV infection: interim results of SOUND-C2. *J Hepatol.* 2012;56 (Suppl. 2), S45.

Zhang X, Hong X, Deng G, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and functional analysis of class II transactivator (CIITA) promoter IV in persistent HBV infection. *J Clin Virol.* 2007;40(3):197-201.

VIII. ANEXOS

Anexo I. E-mail da revista *Brazilian Journal of Infectious Diseases* referindo-se à submissão do artigo “*Association of IL28B polymorphisms with spontaneous resolution of infection and with treatment response to HCV infection*”, na data de 16/07/2015.

 **Brazilian Journal of Infectious Diseases** <ees.bjid.0.329f73.83f917e9@eesmail.elsevier.cor> 16 de jul (Há 4 dias) ☆  
para nmdr, nathaliandr 

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês ×

Ms. Ref. No.: BJID-D-15-00422
Title: ASSOCIATION OF IL28B POLYMORPHISMS WITH SPONTANEOUS RESOLUTION OF INFECTION AND WITH TREATMENT RESPONSE TO HCV INFECTION
Brazilian Journal of Infectious Diseases

Dear Mrs Nathália Delvaux,

Your submission "ASSOCIATION OF IL28B POLYMORPHISMS WITH SPONTANEOUS RESOLUTION OF INFECTION AND WITH TREATMENT RESPONSE TO HCV INFECTION" will be handled by Editor-in-Chief Carlos Brites.

You may check the progress of your paper by logging into the Elsevier Editorial System as an author at <http://ees.elsevier.com/bjid/>.

Enter these login details:
Your username is: Nathália Delvaux

If you can't remember your password please click the "Send Password" link on the Login page.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Brazilian Journal of Infectious Diseases

Anexo II. Delvaux N, Paula VS, Espírito-Santo MP, Silva EF, Miguel JC, Oliveira JC, Silva AS, Vieira YR, Lampe E, Villar LM. Knowledge about viral hepatitis among participants of Gay Pride Event in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(3):377-8 (doi: 10.1016/j.bjid.2012.09.015).



The Brazilian Journal of INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Letter to the Editor

Knowledge about viral hepatitis among participants of Gay Pride Event in Brazil

Dear Editor,

Male or female homosexual, bisexual and transgender individuals (HBT) can be more exposed to viral hepatitis, but few studies worldwide have been conducted about viral hepatitis knowledge among HBT.¹⁻⁵ The aim of this study was to evaluate viral hepatitis knowledge and potential risk of HBT and heterosexual individuals attending a Gay Pride Event.

A cross-sectional survey was carried out among a randomized sample of 121 Brazilian individuals attending to Gay Pride Event at Copacabana (Rio de Janeiro City) on November 2010. A questionnaire consisting of 23 items regarding demographic data, knowledge about viral hepatitis, sexual and risk factors behaviour was distributed to participants. Viral

Hepatitis knowledge score was created based on the participants' responses that were scored as follows: poor (0-2 correct answers), regular (3-4 correct answers), good (5-6 correct answers) and excellent (7-8 correct answers). The following variables were used to examine associations between knowledge of viral hepatitis and socio-demographic characteristics: age, sexual orientation, education years, sexual gender born, the number of partners in the last six months, and condom usage. All of the statistical analyses were made using GraphPad Instat version 3.0 for Windows. In this study, 42 women and 79 men at birth (median age \pm SD of 26 ± 13.3 years) were included. Most of individuals reported as HBT (68.6%), had more than 12 years of education (74.4%), were earning among US\$18.7-956.2 per month (50.4%), did not report previous HBV

Table 1 – Knowledge scores about viral hepatitis for the main characteristics of Brazilian individuals attending Gay Pride Event in Copacabana Rio (n = 121).

Characteristic	Knowledge score				p
	n (S)				
	Low (n = 10)	Regular (n = 16)	Good (n = 37)	Excellent (n = 58)	
Sexual gender born					
Male	4 (9)	11 (68.8)	26 (70.3)	38 (65.5)	p = 0.38
Female	6 (6)	5 (31.2)	11 (29.7)	20 (34.5)	
Time of education					
>12 years	4 (9)	3 (18.8)	9 (24.3)	7 (12.1)	p = 0.34
≤12 years	6 (6)	13 (81.2)	28 (75.7)	51 (87.9)	
Sexual orientation					
Heterosexual	6 (6)	6 (37.5)	8 (21.6)	18 (31)	p = 0.01
Homosexual	2 (2)	8 (50)	29 (78.4)	51 (87.5)	
Bisexual	2 (2)	2 (12.5)	0 (0)	9 (15.5)	
Number of partners in the last six months					
≤1	4 (9)	10 (62.5)	22 (59.5)	31 (54.9)	p = 0.68
>1	6 (6)	6 (37.5)	15 (40.5)	25 (43.1)	
Condom usage					
Never	1 (1)	4 (25)	8 (21.6)	15 (25.9)	p = 0.1
Always	5 (5)	8 (50)	21 (56.8)	36 (62.1)	
Others answers	4 (9)	4 (25)	8 (21.6)	7 (12)	

vaccination (61.7%), had only one sexual partner in the last six months (57%) and always used condom in sexual intercourse (57.8%).

Regarding risk factors, most people who reported having tattoos (94.6%) ($p=0.01$) and more than one sexual partner (82.7%) ($p=0.003$) belonged to HBT group. A large fraction of respondents presented good to excellent knowledge regarding viral hepatitis (78.5%) recognizing that viruses can be transmitted by sexual intercourse (86.8%), drug use (85.7%) or sharing of contaminated instruments (pliers, toothbrushes, razors, blades; 84.3%). However fewer individuals recognized that hepatitis A can be transmitted through oral anal sex (56.7%) or through water and sewage or contaminated food (57.8%). Level of knowledge was higher among HBT (85.7%) as compared to heterosexual individuals (80.4%) ($p=0.01$) (table 1).

The present study highlights the need to improve specific health messages in media campaigns carried out to the general population, since education campaigns about sexually transmitted diseases (STD) directed to the HBT population in the last years resulted in general good knowledge about viral hepatitis aspects in this group as compared to heterosexual individuals. Also, using a Gay Pride Event, this study was able to recruit HBT individuals who would have not necessarily been reached through more traditional recruiting techniques such as advertising in HBT-frequented venues.

Conflict of interest

All authors declare to have no conflict of interest.

Acknowledgements

Authors thank to Dr. Adilson José de Almeida for assistance in questionnaire development and Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), FAPERJ and CNPq for financial support.

REFERENCES

- Urbanus AT, van Houdt R, van de Laar TJ, et al. Viral hepatitis among men who have sex with men, epidemiology and public health consequences. *Euro Surveill*. 2009;14: 19471.
 - Seage GR, Moyer KB, Lenderking WR, et al. HIV and hepatitis B infection and risk behavior in young gay and bisexual men. *Public Health Rep*. 1997;112:158-67.
 - Bears JE, Boon R, Garretsen HF, et al. The reach of a free hepatitis B vaccination programme: results of a Dutch study among drug users. *Int J Drug Policy*. 2002;21:247-50.
 - Rhodes SD, Hengemanter EC. Attitudes and beliefs about hepatitis B vaccination among gay men: the Birmingham Measurement Study. *J Homosex*. 2008;55:124-41.
 - De Ryck I, Berghe VM, Antonneau C, Colebunders R. Awareness of hepatitis C infection among men who have sex with men in Flanders, Belgium. *Acta Clin Belg*. 2011;66:44-8.
- Nathália Delvaux
Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil
- Varena S. de Paula
Laboratory of Viral Technology Development, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil
- Márcia P. do Espírito-Santo, Elisângela F. da Silva, Juliana C. Miguel, Jaqueline C. de Oliveira
Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil
- Alexandre S. da Silva, Yasmine R. Vieira
Laboratory of Viral Technology Development, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil
- Elizabeth Lampe, Livia M. Villar*
Laboratory of Viral Hepatitis, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, RJ, Brazil
- *Corresponding author at: Laboratório de Hepatites Virais Pavilhão Hélio e Peggy Pereira, Térreo, sala 309, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365 Mangueiras, RJ 21045-900, Brazil.
E-mail address: lvillar@ioc.fiocruz.br (L.M. Villar).

Received 24 August 2012

Accepted 23 September 2012

Available online 19 April 2013

1613-8670/\$ – see front matter

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.09.015>

Anexo III. Lampe E, Lewis-Ximenez L, Espírito-Santo MP, Delvaux NM, Pereira SA, Peres-da-Silva A, Martins RM, Soares MA, Santos AF, Vidal LL, Germano FN, de Martinez AM, Basso R, Pinho JR, Malta FM, Gomes-Gouvêa M, Moliterno RA, Bertolini DA, Fujishima MA and Bello G. Genetic diversity of HCV in Brazil. *Antivir Ther.* 2013; 18(3PtB):435-44 (doi: 10.3851/IMP2606).

Original article

Genetic diversity of HCV in Brazil

Elisabeth Lampe^{1*}, Lia Lewis-Ximenes², Marcia P Espirito-Santa³, Nathália M Delvaux⁴, Sergio A Pereira¹, Allan Peves-da-Silva⁵, Regina MB Martins⁶, Marcelo A Soares⁷, André F Santos⁸, Luanna I Vidal⁹, Fabiana N Germano², Ana Maria B de Martinez⁴, Rossana Bassa¹⁰, João R Rebelo Pinho¹¹, Fernanda M Malta¹², Michele Gomes-Gouveia¹³, Ricardo A Moliterno¹⁴, Dennis A Bertalin¹⁵, Mayara AI Fujishima¹⁶, Gonzalo Bellei¹⁷

¹Laboratório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brazil

³Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil

⁵Departamento de Gastroenterologia Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, Brazil

⁶Departamento de Ciências Básicas da Saúde e Departamento de Análises Clínicas e Biomédicas, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brazil

⁷Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

*Corresponding author e-mail: elampe@ioc.fiocruz.br

Background: Many studies have documented the molecular epidemiological scenario of HCV within individual Brazilian states, but we still have an incomplete understanding of the dispersion dynamics of the virus in different regions throughout the country.

Methods: A total of 676 HCV NS5B gene sequences of subtypes 1a (*n*=321), 1b (*n*=170) and 3a (*n*=185), isolated from seven different Brazilian states covering four out of five regions were analysed in the present study. We also analysed 22 HCV NS5B gene sequences of minor genetic variants including genotype 2 (*n*=13), genotype 4 (*n*=6) and subtype 2a (*n*=3). Brazilian HCV sequences were aligned with sequences of non-Brazilian origin and subjected to maximum likelihood phylogenetic analyses.

Results: These analyses revealed that the Brazilian HCV epidemic resulted from multiple introductions and autochthonous transmission of subtypes 1a, 1b, 3a and genotypes 2, 4 and 5. Brazilian HCV subtype 1a epidemic

is dominated by the dissemination of one major clade; while Brazilian HCV subtypes 1b and 3a epidemics are characterized by concurrent dissemination of several independent HCV lineages. Some HCV Brazilian lineages of subtypes 1a, 1b, 2b and 3a were successful in becoming established and disseminated through several regions in the country. Despite significant phylogenetic intermixing of Brazilian sequences, the distribution of HCV strains from different states across lineages was not completely homogeneous.

Conclusions: These results demonstrate the existence of multiple introductions and local propagation of both prevalent and uncommon HCV genetic variants in Brazil and identify some major Brazilian HCV clades with nationwide dissemination. This study also suggests that the observed HCV diversity in Brazil has been shaped by both frequent viral migration among regions and *in situ* viral dissemination.

Introduction

HCV infects nearly 2.5% of the world's human population (>160 million people) and is recognized as a major cause of hepatitis and liver cancer worldwide [1]. HCV is a member of the *Hepacivirus* genus of the *Flaviviridae* family. The virus is classified into six major genotypes (labelled 1 to 6), each with multiple subtypes (labelled 1a, 1b, and so on) [2]. A recent study showed that HCV subtype 1a isolates can be further sub-categorized into two distinct sub-subtypes designated 1 and 2 [3]. Although most HCV lineages

remain restricted to endemic regions of Africa and Asia, a few HCV lineages (such as subtypes 1a, 1b and 3a) are globally disseminated. These 'epidemic' HCV lineages have likely exploited highly efficient routes of viral transmission that arose during the 20th century such as blood transfusion, haemodialysis, injection drug use and non-sterile medical injections [4–6].

It has been estimated that around 1.4% of the Brazilian population (>2.5 million people) is HCV-positive [7,8]. Most diagnosed cases of HCV infection occur in

the south-east region, followed by the south, central-west, north-east and north Brazilian regions; yet the estimated prevalence rate of HCV infection is roughly similar in different regions of the country [7]. The most prevalent HCV strains in Brazil are genotypes 1 (50–78%) and 3 (11–43%), varying in different proportions according to the geographic area. Genotype 2 is found to a lesser extent throughout the country (1–11%), whereas genotypes 4 and 5 have been rarely found (<1%) [9–21]. Previous studies based on the analysis of the NSSB gene showed that multiple introductions of the epidemic HCV subtypes have occurred in Brazil, although only a few HCV clades have been successfully disseminated during the second half of the 20th century [22,23]. Additional characterization of the NS3 gene of HCV isolates from Rio de Janeiro further revealed that most Brazilian subtype 1a sequences branched within the previously designated clade 1 [24].

Most previous studies have focused on the analysis of HCV epidemics within individual Brazilian states, but Brazil is a country of continental dimensions and little is known on the dispersion dynamics of HCV across different regions. In this study, partial NSSB gene sequences of HCV subtype 1a ($n=321$), 1b ($n=170$) and 3a ($n=185$) strains, along with 22 sequences of the less prevalent genotypes 2, 4 and 5, isolated from seven Brazilian states, were combined with HCV sequences from other countries to determine the degree of isolation of each local HCV epidemic and to identify the scale of expansion of major Brazilian HCV lineages.

Methods

HCV sequences datasets

Partial NSSB gene sequences were obtained from a total of 254 HCV strains (subtype 1a:99, subtype 1b:76, subtype 3a:61, genotype 2:10, genotype 4:6 and subtype 5a:2) isolated in the south (Rio Grande do Sul), south-east (Rio de Janeiro), central-west (Goiás and Mato Grosso do Sul) and north (Amapá) Brazilian regions, between 2002 and 2011. These new sequences were added along with 444 Brazilian HCV NSSB gene sequences (subtype 1a:222, subtype 1b:94, subtype 3a:124, genotype 2:3 and genotype 5:1) isolated in the south-east (São Paulo), central-west (Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul) and north (Rondônia) regions that were previously published [18,22,23,25–27]. The Brazilian HCV sequences were analysed together with global reference sequences available at the Los Alamos HCV database [28] that matched the selected genomic region. In order to illustrate the extent of genetic diversity of most prevalent HCV lineages, subtype 1a reference sequences were represented by isolates of both clade 1 and clade 2 taken from various cities in the United States, Europe

and Latin America, whereas subtypes 1b and 3a reference sequences were represented by isolates from Africa, Asia, Europe, the Caribbean, North America, South America, the former Soviet Union and Oceania.

Phylogenetic analyses

Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL X program [29] to generate a final alignment of 297 bp (nucleotide positions 8309–8606 relative to the reference sequence H77). Phylogenies were reconstructed by the maximum likelihood (ML) method with PhyML [30] in an online web server [31]. ML trees were reconstructed under the GTR+I+ Γ_4 [32] nucleotide substitution model, selected using the jModeltest program [33]. Heuristic tree searches were performed using the SPR branch-swapping algorithm. The reliability of the phylogenies was estimated with the approximate likelihood-ratio test (aLRT) [34] based on a Shimodaira-Hasegawa-like procedure.

Results

A total of 698 HCV Brazilian NSSB gene sequences (subtype 1a:321, subtype 1b:170, subtype 3a:185, genotype 2:13, genotype 4:6 and subtype 5a:3) were analysed in the present study. The most prevalent Brazilian HCV strains, 1a, 1b and 3a, were isolated from seven different states including Rio de Janeiro (RJ) and São Paulo (SP) from the south-east region, Goiás (GO) and Mato Grosso do Sul (MS) from the central-west region, Amapá (AP) and Rondônia (RO) from the north region, and Rio Grande do Sul (RS) from the south region (Figure 1). Uncommon Brazilian HCV strains of genotypes 2, 4 and 5 were isolated from eight different states including RJ and SP from the south-east region, Mato Grosso, GO and MS from the central-west region, RO from the north region, and Paraná (PR) and RS from the south region (Figure 1).

ML phylogenetic analysis of partial NSSB gene showed that HCV subtype 1a isolates previously designated as clade 1 and clade 2 formed two distinct monophyletic sub-clusters, confirming the classification of Pickett *et al.* [3] (Figure 2A). The vast majority (98%) of Brazilian HCV subtype 1a sequences branched within clade 1 and only a few strains isolated in RJ ($n=3$), GO ($n=2$), RS ($n=1$) and AP ($n=1$) branched within clade 2 (Figure 2A). Most (83%) clade 1 Brazilian strains formed a highly supported monophyletic sub-cluster here called BR1a-I (Figure 2A). The remaining clade 1 Brazilian isolates branched in a second monophyletic sub-clade, here designated BR1a-II, or were interspersed among clade 1 strains of non-Brazilian origin (Figure 2A). Brazilian sequences from different country regions were highly intermixed in the phylogenetic tree, pointing to a low degree of viral

Figure 1. Political map of Brazil showing its regions and states



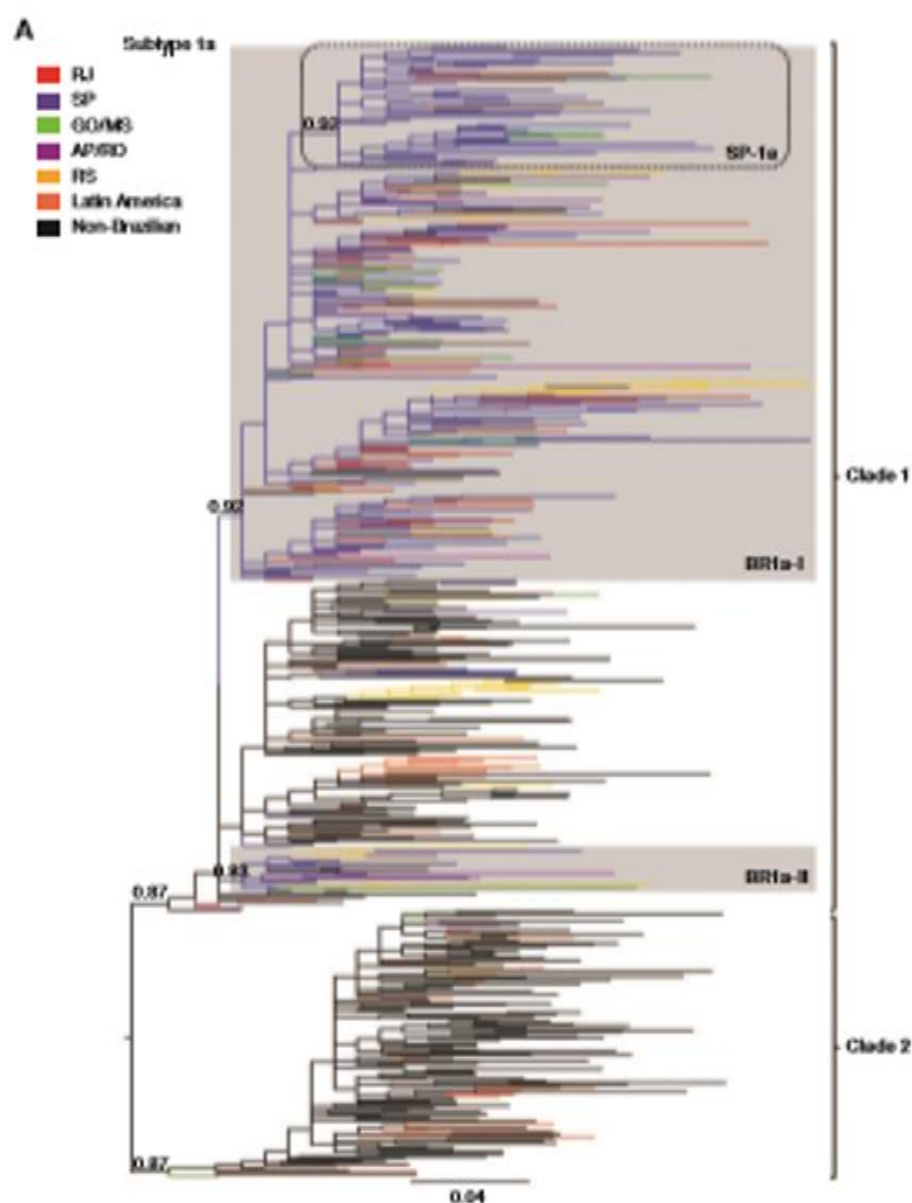
Units of regions and states are indicated by black and grey lines respectively. The position of the nine sites analyzed in the present study are indicated with a line letter code: Arapá (AP), Goiás (GO), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Sul (RS), São Paulo (SP) and Rondônia (RO). The number of HCV sequences from each location included in the present study is indicated.

isolation by geographic origin. One highly supported ($aLRT=0.93$) Brazilian sub-clade mainly composed of sequences from SP, however, was identified within lineage BR1a-I (Figure 2A). This clade, here called SP-1a, comprised 30% of subtype 1a sequences from SP, 15% of sequences from GO/MS and <5% of sequences from other Brazilian states (Table 1). Another interesting observation is that while most sequences from RJ (84%), SP (96.5%) and GOM/MS (91%) branched within Brazilian clades BR1a-I and BR1a-II, an important fraction of sequences from RS (30%) branched outside these Brazilian lineages (Table 1).

The 170 Brazilian HCV subtype 1b sequences analyzed in this study were distributed in multiple ($n=30$) independent lineages among global reference sequences (Figure 2B). Most Brazilian subtype 1b lineages are

of small size ($n<5$). A total of seven Brazilian clades (BR1b-I to BR1b-VII), however, contained ≥ 10 strains. Some of these major Brazilian subtype 1b clades were highly supported ($aLRT>0.93$) whereas others displayed only a moderate support ($0.75<aLRT<0.90$; Figure 2B). Together, the seven major Brazilian clades contain 75% of Brazilian subtype 1b sequences and their scale of dissemination seems to be highly variable. Although clades BR1b-VI and BR1b-VII contain sequences from all geographic regions, clade BR1b-III contains sequences from one single state (AP). Analysis of strain composition of major Brazilian lineages indicated that 30% of sequences from RJ branched within clade BR1b-IV, 55% of sequences from SP and 64% of sequences from GOM/MS branched within clades BR1b-II and BR1b-VII, 64% of sequences from AP/RO

Figure 2. Maximum likelihood phylogeny of prevalent Brazilian HIV-1 subtypes



(A) Subtype 1a strains of Brazilian (n=107) and non-Brazilian (n=220) origin. Branches indicate the monophyletic clades formed by reference sequences from Europe and North America previously classified as clades 1 and 2. The tree root was placed at the branch connecting clades 1 and 2. (B) Subtype 1a strains of Brazilian (n=130) and non-Brazilian (n=157) origin. The tree was rooted with three subtype 1a strains from West Africa (M017215, K007206 and K007207, not shown). (C) Subtype 1a strains of Brazilian (n=107) and non-Brazilian (n=104) origin. The tree was rooted with three subtype 1a strains from Palau (M844404, M844405 and M844406, not shown). The colours of internal branches represent the geographic region from where the HIV-1 strains were sampled, according to the legend given in each figure. For visual clarity, internal branches of the major Brazilian lineage were also coloured. Grey boxes indicate Brazilian monophyletic clades with ≥ 10 individuals. The dashed box highlights the position of the monophyletic sub-clade SP-1a. Approximate likelihood ratio test (aLRT) support values are indicated only at key nodes. The scale bar is in units of nucleotide substitutions per site. RJ, Aragoi; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; RJ, Rio de Janeiro; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

Figure 2. Continued

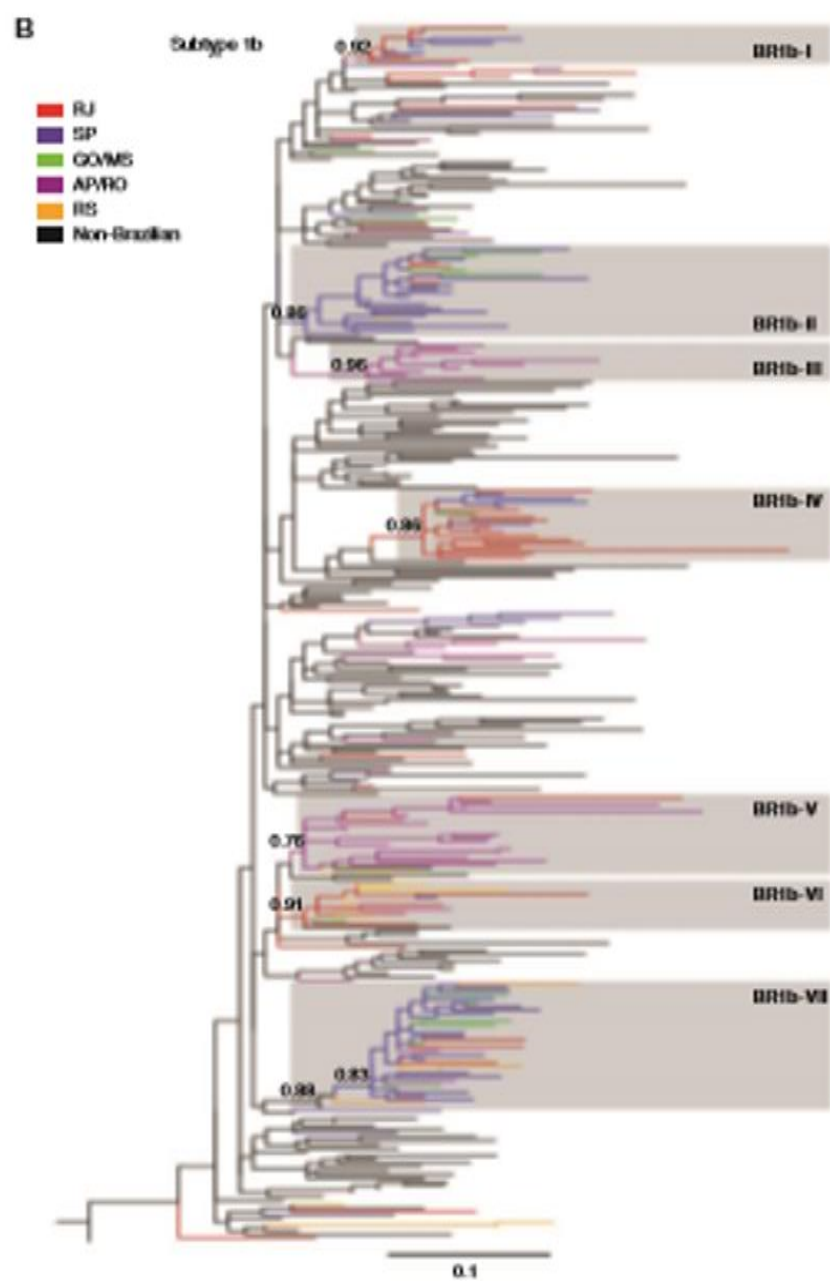
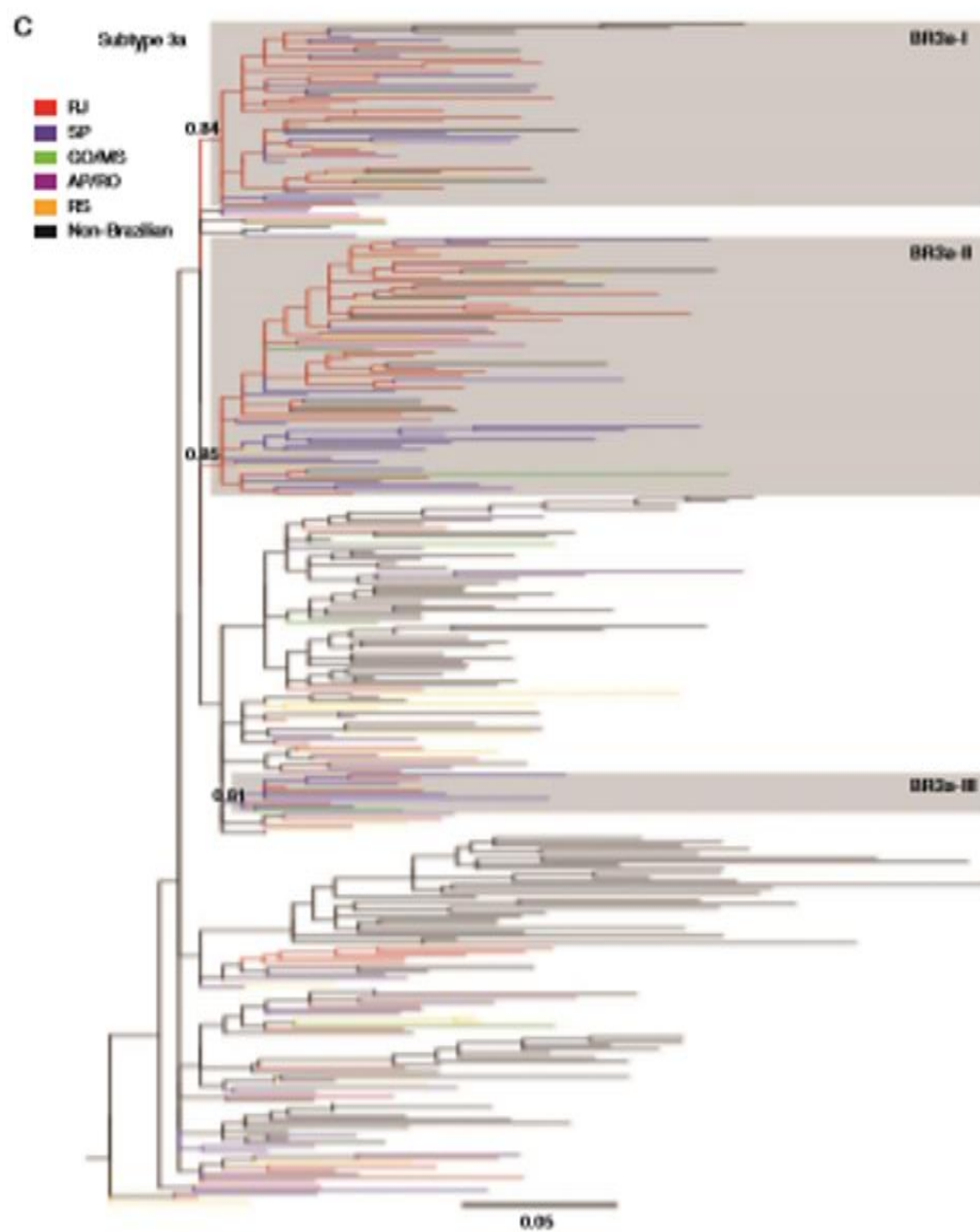


Figure 2. Continued



branched within clades BR1b-III and BR1b-V and 64% of sequences from RS branched within clades BR1b-VI and BR1b-VII (Table 1).

Similarly to the Brazilian subtype 1b, the 185 Brazilian subtype 3a sequences were scattered across several ($n=30$) independent lineages that were intermixed among reference sequences of non-Brazilian origin (Figure 2C). Most Brazilian subtype 3a lineages are of small size ($n<5$), with exception of three clades (BR3a-I to BR3a-III) with medium support (0.80<LRT<0.90) that contain ≥ 10 strains (Figure 2C). The three major Brazilian clades contained 62% of Brazilian subtype 3a sequences included here. Analysis of strain composition of major Brazilian lineages indicates no clear association between location and phylogenetic clades. The major Brazilian clade, here named BR3a-II, was detected in all country regions and contained a similar proportion of sequences from each location, ranging between 26% and 38% (Table 1). The clade BR3a-I contained a total of 37 sequences, including 13% of sequences from RS, 27% of sequences from RJ and 18% of sequences from SP (Table 1). The minor clade, designated BR3a-III, contained a total of 10 sequences, including 5% of sequences from RJ, 7% of sequences from SP and 12% of sequences from GOMMS (Table 1). The low number of HCV subtype 3a sequences from RS, GOMMS and AP/RO included in this study may explain the apparent absence of sequences from these regions within major Brazilian clades.

ML phylogenetic analysis of a partial NS5B gene from uncommon HCV Brazilian strains revealed the existence of multiple introductions and autochthonous transmission of genotypes 2, 4 and 5 in Brazil (Figure 3). The six genotype 4 sequences from RJ branched in two well-supported lineages with three sequences each that were classified as subtypes 4a and 4b. The 13

genotype 2 Brazilian sequences formed three well-supported monophyletic clades. The major clade belongs to subtype 2b and included sequences from RO ($n=3$), RS ($n=2$), GO ($n=1$), PR ($n=1$), RJ ($n=1$) and SP ($n=1$). Two sequences from SP branched in a second clade within subtype 2a, whereas the other two sequences from RJ formed an independent clade positioned between subtypes 2c, 2i and 2j. Finally, the three genotype 5 sequences branched in two independent lineages within subtype 5a.

Discussion

Despite many regional studies on Brazilian HCV genotype distribution, the dispersion dynamics of the virus in Brazil as a whole is largely unknown. Two previous studies showed that multiple introductions of HCV subtypes 1a, 1b and 3a occurred in the southeast and central-west Brazilian regions in the second half of the 20th century [22,23]. Here, the number of analysed Brazilian localities was expanded and new insights were observed in the diversity of HCV subtypes. Despite the fact that our assembled dataset derived from convenience studies, the data observed reflect the heterogeneity of HCV variants occurring in Brazil as a country.

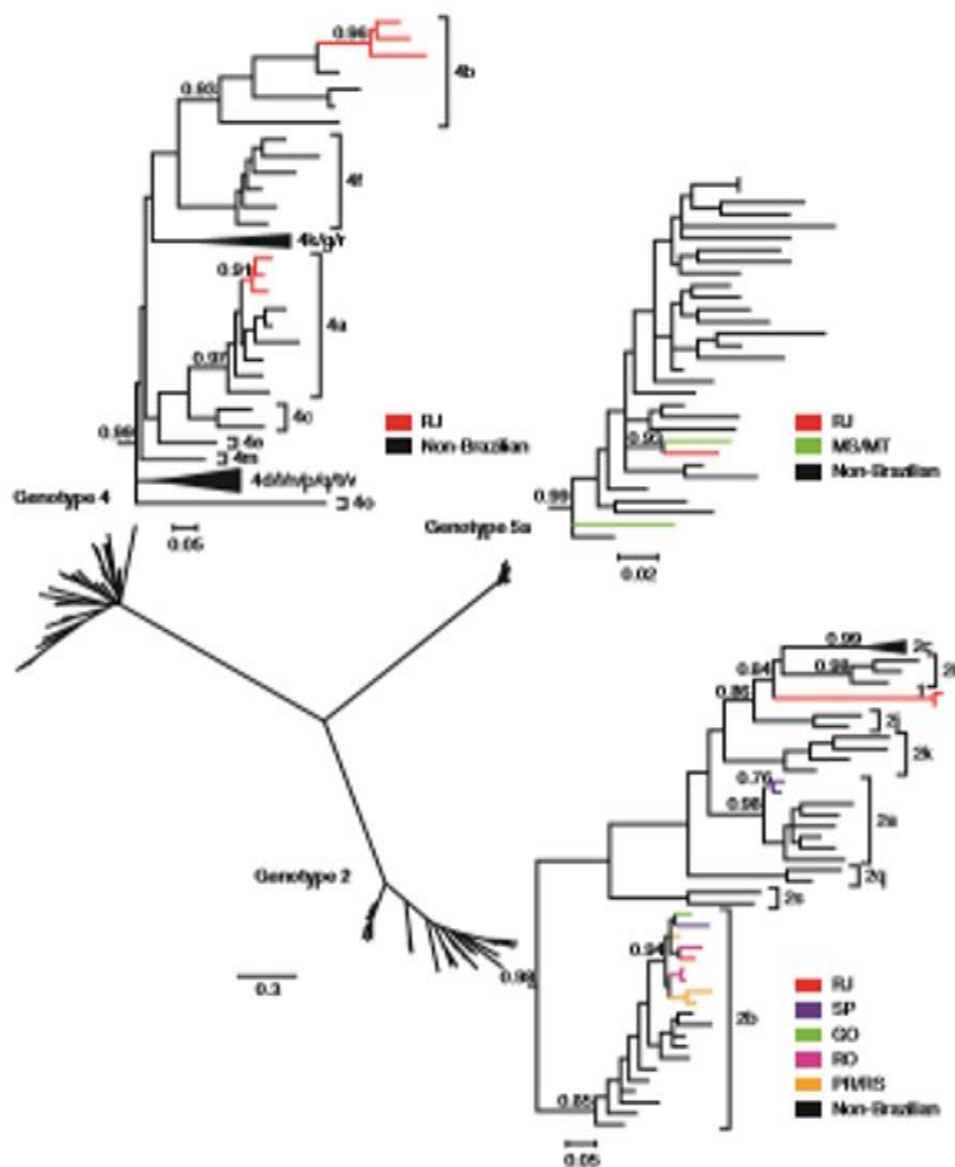
Most (98%) Brazilian subtype 1a strains grouped in clade 1. Within clade 1, Brazilian strains from different regions formed two distinct and monophyletic exclusive clusters demonstrating at least two entries and subsequent irradiation of this subtype in the country. Brazilian sequences from different locations were highly intermixed in the two major country-specific clade 1 monophyletic clusters, indicating a low degree of viral isolation by geographic origin. However, the

Table 1. Distribution of HCV sequences among major Brazilian lineages

Subtype	Lineage	Location				
		RS	RJ	SP	GOMMS	AP/RO
1a	I	22 (59)	46 (80)	164 (84)	29 (88)	7 (64)
	I (SP)	1 (2.5)	2 (4)	54 (28)	5 (15)	-
	II	6 (15)	1 (2)	30 (15.5)	1 (3)	2 (18)
1b	I	-	5 (13)	5 (8)	-	-
	II	1 (2)	3 (7)	16 (8)	4 (12)	-
	III	-	-	-	-	10 (9)
	IV	-	13 (31)	5 (8)	1 (3)	-
	V	1 (2)	2 (5)	-	-	17 (16)
	VI	5 (12)	4 (9)	1 (2)	1 (3)	1 (7)
3a	VI	4 (9)	3 (7)	16 (8)	5 (15)	3 (7)
	I	3 (13)	21 (37)	13 (18)	-	-
	II	6 (24)	27 (45)	21 (28)	2 (8)	2 (23)
	III	-	4 (5)	5 (7)	1 (3)	-

Values are a (%) of sequence from each location that belong to major HCV subtype 1a, 1b and 3a Brazilian lineages identified in the maximum likelihood phylogenetic analysis. AP, Amapá; GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; RJ, Rio de Janeiro; RO, Rondônia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

Figure 3. Maximum likelihood phylogeny of uncommon Brazilian HCV strains of genotype 2, genotype 4 and subtype 4a



A close view of the sub-tree corresponding to each HCV genotype/subtype is shown. The values of internal branches represent the geographic region from where the HCV strains were sampled, according to the legend given in each figure. Approximate likelihood ratio test (LRT) support values are indicated only at key nodes. The scale-bar is in units of nucleotide substitutions per site. GO, Goiás; MS, Mato Grosso do Sul; MT, Mato Grosso; RJ, Rio de Janeiro; RO, Rondônia; RS, Rio Grande do Sul; SP, São Paulo.

circulation of clade 1 HCV sequences of 'non-Brazilian' origin in RS was higher (30%) than in any other Brazilian state (<15%). Interestingly, HCV subtype 1a strains from other Latin American countries were more evenly distributed among clades 1 and 2 sequences from USA and Europe, and only a few clade 1 strains from other countries of Latin America grouped within Brazilian monophyletic clades. This demonstrates that the pattern of dispersion of HCV subtype 1a in Brazil was unique and different from the other Latin American countries. Despite the fact that some Brazilian samples were located basally to clade 1, the geographical and temporal origin of this clade remains unknown and warranted further investigation.

The aggregation of most Brazilian HCV NS5B subtype 1a sequences in a distinct and strongly supported monophyletic group within clade 1 has been also recently reported in a phylogenetic analysis of the entire NS3 region with strains from the state of Rio de Janeiro [35]. Of note was the observation that 93.8% of the Brazilian subclade 1 sequences present the glutamine (Q) amino acid residue at position 80, whereas 60% of non-Brazilian sequences of that clade exhibited a lysine (K). R0K has been reported to exhibit reduced susceptibility to macrocyclic inhibitors (MK-7009, ITMN-191 and TMC-435) [36,37]. Recently, in a clinical Phase IIIb trial with TMC435, Lertx *et al.* [38] found that the sustained virological response rates were significantly higher in patients infected with HCV subtype 1a containing the Q80K polymorphism at baseline. These results show that information regarding sequence variations among HCV genotypes, subtypes and even clades within subtypes may be important for therapeutic approaches using new antiviral drugs.

Brazilian strains of HCV subtypes 1b and 3a were dispersed in many monophyletic lineages interbred with those of other countries, suggesting multiple introductions of both HCV subtypes in Brazil. Some major Brazilian clades composed of ≥10 sequences were identified within each HCV subtype that together comprised 75% and 63% of subtype 1b and 3a sequences included here, respectively. Analysis of strain composition of major Brazilian lineages provided evidence that HCV subtype 1b strains exhibit some level of genetic isolation by geographic origin, whereas HCV subtype 3a strains display a more random phylogenetic mixing by sampling location, fully consistent with our previous findings [22]. It is important to note, however, that some major Brazilian subtype 1b and 3a clusters displayed only a moderate support (0.75<ai.LRT<0.90), indicating that partial NS5B gene sequences may not be informative enough to resolve all within-subtype relationships. Thus, the statistical support of Brazilian HCV subtype 1b and 3a clusters here identified should be confirmed in the future by increasing the length of

the NS5B gene sequences analysed or by concatenating different partial gene fragments.

The results presented here demonstrate that HCV subtypes 2a, 2b, 4a, 4b and 5a were also introduced into the country, as well as a divergent HCV genotype 2 lineage that branched between clades 2c, 2i and 2j. Sequencing of larger fragments or full-length genomes is necessary to undoubtedly classify these two HCV Brazilian strains as recombinant viruses or as a new subtype within genotype 2. Of note, all minor HCV genotypes here analysed established autochthonous transmission networks. Most networks seem to be restricted to a few individuals from the same state, with exception of subtype 2b lineage that was disseminated throughout the different regions here studied. Analysis of a larger number of samples for these 'rare' HCV subtypes will be necessary to obtain a more detailed knowledge of their transmission dynamics in Brazil.

In summary, in this study we show evidence of complex HCV genotype and subtype dissemination dynamics in Brazil, as expected in a country with continental proportions. Although subtype 1a appeared to be robustly widespread from a single entry event, subtypes 1b and 3a showed evidence of multiple small introductions in definite regions of the country. This study further suggests that viral transmission between different Brazilian regions seems to be more frequent for HCV subtypes 1a and 3a than for subtype 1b and demonstrates the existence of multiple introductions and autochthonous transmission of genotypes 2, 4 and 5 in Brazil. With the increasing evidence of distinct phenotypes of HCV genotypes, subtypes and intra-subtype clades with respect to response to treatment and drug resistance, a continuous surveillance of HCV genetic diversity in a large country such as Brazil is relevant.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the 'Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico' (CNPq) the 'Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior' (CAPES) the 'Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro' (FAPERJ) and 'Programa de Excelência em Pesquisa - PROEP/FIOCRUZ'. The authors wish also to thank 'Plataforma Genômica de Sequenciamento de DNA/DTIS-FIOCRUZ' for DNA sequencing.

Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

References

1. Lavanchy D. Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin Microbiol Infect* 2001; 17:109-115.

2. Simmonds P, Buith J, Comber C, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42:962–973.
3. Pickett JB, Striker R, Lefkowitz EJ. Evidence for separation of HCV subtype 1a into two distinct clades. *J Viral Hepat* 2011; 18:608–618.
4. Hajar AM, Armstrong GL, Hahn YJ. The global burden of disease attributable to contaminated injections given in health care settings. *Int J STD AIDS* 2004; 15:7–16.
5. Tanaka Y, Hamada K, Orito E, et al. Molecular evolutionary analyses implicate injection treatment for schistosomiasis as the initial hepatitis C epidemics in Japan. *J Hepatol* 2005; 42:47–53.
6. Pybus OG, Cochrane A, Holmes EC, Simmonds P. The hepatitis C virus epidemic among injecting drug users. *Infect Genet Evol* 2005; 5:131–139.
7. Brazil Health Ministry. Department of STDs, AIDS and viral hepatitis, Brazil. [Viral hepatitis in numbers]. Portuguese. (Accessed 15 April 2013.) Available from <http://www.casos.gov.br/pagina/hepatites-virais-em-numeros>
8. Zucchi MA, Silva LK, Silva MB, et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100:663–668.
9. Sawyer L, Rossan K, Wynson A, et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. *J Gen Virol* 1993; 74:1093–1102.
10. Holland PV, Barrera JM, Lucilla MG, et al. Genotyping hepatitis C virus isolates from Spain, Brazil, China, and Macau by a simplified PCR method. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2372–2378.
11. Martins RM, Vanderborcht BO, Yoshida CE. Hepatitis C virus genotypes among blood donors from different regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93:299–300.
12. Oliveira ML, Bastos FI, Sabino RR, et al. Distribution of HCV genotypes among different exposure categories in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:279–282.
13. Silva LK, Parana R, Souza SP, et al. Hepatitis C virus genotypes in a northeastern area of Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2000; 62:257–260.
14. Pereira LM, Spinelli V, Ximenes RA, et al. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes, and HIV-1/HCV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. *J Med Virol* 2002; 67:27–32.
15. Peres RM, Ferraz MI, Figueiredo MS, et al. Unexpected distribution of hepatitis C virus genotypes in patients on hemodialysis and kidney transplant recipients. *J Med Virol* 2003; 69:489–494.
16. Campioto S, Pinho JR, Carrilho FJ, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38:41–49.
17. Martins RM, Teles SA, Freitas NR, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from mid-west region of Brazil. *Braz Inst Med Trop Sao Paulo* 2006; 48:55–55.
18. Carneiro MA, Teles SA, Lampe E, et al. Molecular and epidemiological study on nosocomial transmission of HCV in hemodialysis patients in Brazil. *J Med Virol* 2007; 79:1325–1331.
19. Freitas SZ, da Cunha RV, Martins RM, Teles SA, Bastos MI, Motta-Castro AR. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:405–408.
20. Lopes CI, Teles SA, Espirito-Santo MP, et al. Prevalence, risk factors and genotypes of hepatitis C virus infection among drug users, central western Brazil. *Rev Saude Publica* 2009; 43 Suppl 1:43–50.
21. Oliveira ML, Yoshida CE, Teles PR, et al. Trends in HCV prevalence, risk factors and distribution of viral genotypes in injecting drug users: findings from two cross-sectional studies. *Epidemiol Infect* 2009; 137:970–979.
22. Lampe E, Espirito-Santo MP, Martins RM, Bello G. Epidemic history of hepatitis C virus in Brazil. *Infect Genet Evol* 2010; 10:386–393.
23. Romano CM, de Carvalho-Mello JM, Jamal LF, et al. Social networks shape the transmission dynamics of hepatitis C virus. *PLoS ONE* 2010; 5:e11170.
24. Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS5 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:254–261.
25. Oliveira ML, Bastos FI, Teles PR, et al. Epidemiological and genetic analyses of hepatitis C virus transmission among young adult and long-term injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Virol* 2009; 44:200–206.
26. Vieira DS, Alvarado-Mora MV, Botelho L, Camillo FJ, Pinho JR, Saketko JM. Distribution of hepatitis C virus (HCV) genotypes in patients with chronic infection from Rondônia, Brazil. *Viral J* 2011; 8:165.
27. Ribeiro LC, Santos FJ, do Espirito-Santo MP, G Oliveira R, Lampe E. An atypical case of hepatitis C virus genotype 1a in Brazil: phylogenetic analysis. *Arch Virol* 2009; 154:663–670.
28. Kulkarni C, Yasin K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos hepatitis C sequence database. *Bioinformatics* 2003; 21:379–384.
29. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin J, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res* 1997; 25:4187–4192.
30. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 2003; 52:696–704.
31. Guindon S, Lethiec F, Duroux F, Gascuel O. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucl Acids Res* 2003; 31:W527–W531.
32. Rodriguez E, Oliver JL, Marin A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* 1990; 142:485–501.
33. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 2008; 25:1253–1256.
34. Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 2006; 55:539–552.
35. Peres-da-Silva A, Almeida AJ, Lampe E. Genetic diversity of NS5 protease from Brazilian HCV isolates and possible implications for therapy with direct-acting antiviral drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:254–261.
36. Eze A, Sun SC, Gu X, et al. Susceptibility of treatment-naïve hepatitis C virus (HCV) clinical isolates to HCV protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:5284–5297.
37. Halton P, Lecarniani S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 2011; 55:192–206.
38. Lenz O, Bevery B, Vigen J, et al. TMC435 in patients infected with HCV genotype 1 who have failed previous pegylated interferon/ribavirin treatment: virologic analysis of the ASPERG trial. *J Hepatol* 2012; 56 Suppl 2:55.

Accepted 13 September 2012; published online 21 June 2013

Anexo IV. Parecer do Comitê de Ética do Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



PARECER COM SUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único nos genes humanos da interleucina 28B e inosina trifosfato pirofosfatase em amostras de sangue e esfregaço de mucosa bucal e seu impacto sobre o tratamento da hepatite C

Pesquisador: ADILSON JOSÉ DE ALMEIDA

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 1

CAAE: 14082513.9.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 243.396

Data da Relatoria: 09/04/2013

Apresentação do Projeto:

Estudos têm demonstrado que, além de fatores relacionados ao vírus, fatores dos hospedeiros também teriam papel fundamental na presença ou ausência de resposta ao tratamento e na proteção ou não contra a anemia induzida pela ribavirina (RBV). Variações genéticas perto dos genes da interleucina 28B (IL28B) e da inosina trifosfato pirofosfatase (ITPA) estão fortemente associadas com a RVS e a proteção contra a anemia hemolítica, respectivamente. Dentre os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) estudados no gene IL28B, o rs12979860 genótipo C/C, e o alelo G do rs8099917 foram os que apresentaram a mais forte associação com resposta RVS. Da mesma forma, no gene da ITPA os SNPs mais relacionados com a anemia são os que possuem o genótipo CC no rs1127354 e o genótipo AA no rs7270101. O objetivo geral deste trabalho é avaliar o impacto dos SNPs nos genes da IL28B e ITPA sobre o tratamento da hepatite C.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar o perfil alélico humano dos genes IL28B e ITPA em amostras de sangue e

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Cidade: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: hugg@unirio.br; cepp@unirio.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



esfregaço bucal de pacientes com hepatite C submetidos a terapia antiviral com PEGIFN α /RBV e o seu impacto sobre os resultados do tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: inerentes a coleta de sangue (discreto desconforto doloroso ou rouidão local).

Benefícios: constatação da eventual existência de algum marcador genético (IL28B ou ITPA) que possa estar associado as

respostas possíveis ao tratamento da hepatite C ou ao desenvolvimento de anemia durante este tratamento, resultados desses exames. Desta forma, também estará contribuindo para o avanço no conhecimento científico sobre a hepatite C.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Avaliação retro e prospectiva envolvendo pacientes que trataram ou tratarão de infecção pelo vírus da hepatite C nos ambulatórios de hematologia e de hepatologia do HUGG.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Atende aos objetivos que pretendem proteger o participante do estudo.

Recomendações:

Nenhuma recomendação relacionada a esta análise.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 11 de Abril de 2013

Assinado por:
Pedro Eder Portari Filho
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 776
Bairro: Tijuca
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)1264-5317 Fax: (21)1264-5177 CEP: 22.270-904
E-mail: hugg@unirio.br ou pefugg@gmail.com

Anexo V. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Título da Pesquisa: Análise dos polimorfismos de nucleotídeo único nos genes humanos da interleucina 28B e inosina trifosfato pirrofosfatase em amostras de sangue e esfregaço de mucosa bucal e seu impacto sobre o tratamento da hepatite C

► Informações ao paciente:

Durante esta consulta você terá a oportunidade de participar de uma PESQUISA onde serão estudados pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) com idade maior que 18 anos.

Objetivo: O objetivo principal desta pesquisa é caracterizar o perfil genético humano para os genes IL28B e ITPA utilizando amostras de sangue e esfregaço da mucosa bucal de pacientes com hepatite C submetidos ao tratamento com interferon peguilado (IFN-PEG) e ribavirina (RBV) e avaliar o seu impacto sobre a resposta ao tratamento com esses medicamentos.

Procedimentos: Durante a consulta com o médico assistente, os pacientes com hepatite C que já receberam tratamento ou estão em avaliação para iniciar tratamento deverão fornecer duas alíquotas de sangue (5 ml e 10 ml) e de esfregaço de mucosa bucal para análise posterior. As coletas de sangue e esfregaço de mucosa bucal serão realizadas uma única vez por profissionais de saúde especializados nestes tipos de coleta e não implicarão em custos ao paciente.

Riscos: Os possíveis riscos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, como discreto desconforto doloroso ou vermelhidão local. O uso de dispositivos coletores semelhantes à cotonetes para a realização do esfregaço de células da mucosa bucal não produz desconforto ou risco para os pacientes.

Benefícios: Pelos testes que serão realizados, o(a) Sr(a) será informado(a) se apresenta algum marcador genético (IL28B ou ITPA) que possa estar associado à resposta ao tratamento da hepatite C ou desenvolvimento de anemia durante este tratamento, além de receber orientações após análise dos resultados desses exames. Desta forma, também estará contribuindo para o avanço no conhecimento científico sobre a hepatite C.

A sua participação é VOLUNTÁRIA, isto é, a sua decisão em participar ou não do estudo, ou mesmo abandoná-lo sem comunicação não irá afetar de forma alguma a assistência médica que de outra forma você teria neste hospital.

Em caso de dúvida sobre a pesquisa ou direito dos pacientes poderá ser contatado o médico ADILSON JOSÉ DE ALMEIDA por meio dos telefones 2264-1193/2264-1165 ou do e-mail adilsonjose@ig.com.br, bem como o CEP do HUGG, por meio do telefone 2264-5177 ou do email cep@ig.com.br. Também poderão ser contatados os seguintes pesquisadores médicos: Cristiane Alves Vilela Nogueira, cristvilela@hucf.ufrj.br e Eliane Bortolo Cathalá Esberard, elianeboard@terra.com.br e elianeboard@ig.com.br.

► Consentimento do paciente:

1. Eu, _____ (nome do(a) paciente), abaixo identificado(a) e firmado(a), declaro ter sido informado(a) claramente sobre todos os procedimentos de coleta de amostras envolvidos nesta pesquisa.

2. Os termos médicos foram explicados e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas pelo médico _____ (nome do médico assistente).

