

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA/RIBAVIRINA EM
PACIENTES COM O VÍRUS DA HEPATITE C

TARCIANA GRANDI

Porto Alegre, setembro de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR

ESTUDO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS E RESPOSTA AO
TRATAMENTO COM INTERFERON-ALFA/RIBAVIRINA
EM PACIENTES COM O VÍRUS DA HEPATITE C

TARCIANA GRANDI

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Dra. Maria Lúcia Rosa Rossetti

Porto Alegre, setembro de 2012.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

O presente estudo foi realizado no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CDCT) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS). O projeto recebeu financiamento do Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) Edital 07/2010 da FEPPS e Fundação e Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Editais 07/2006 e 06/2010.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Lúcia Rossetti, minha eterna gratidão pela oportunidade no desenvolvimento de minha profissão e da minha formação e, acima de tudo, pela amizade e apoio ao longo desse trabalho, tanto no plano pessoal quanto profissional.

À minha comissão de acompanhamento, Dr. Arnaldo Zaha e Dra. Tatiana Schaffer Gregianini pelas sugestões e colaborações neste trabalho, que reafirmam a importância do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS.

À Dra. Cláudia Dornelles, pela colaboração e ajuda durante todas as etapas desse trabalho, que ainda vai produzir muitos frutos.

Ao Dr. Christian Niel, uma pessoa com enorme conhecimento e vontade de produzir, ajudar e apoiar novas idéias. Espero que esta colaboração continue firme e forte!

À Marilu, indescritivelmente indispensável, pelas importantes discussões e análises de resultados.

À colega, comadre e amiga Cintia, que nestes anos de parceria esteve sempre presente me aconselhando e incentivando. Obrigada pela amizade, paciência e companheirismo.

À Nicole, por ser uma aluna tão responsável e dedicada, com fundamental colaboração na coleta de amostras e dados deste trabalho.

Às amigas e colegas de laboratório, Lila e Márcia pelo apoio em todas as horas, pela convivência, amizade e carinho.

A todos os colegas e amigos do CDCT, pelo agradável ambiente de trabalho, pelo espírito de equipe e, sobretudo, por compartilhar conhecimento, em especial: à Laura, Carol, Regina, Lucas, Karen, Raquel, Elis, Paulo, Marta e Mari.

Aos funcionários do PPGBCM, Sílvia e Luciano, sempre tão prestativos e simpáticos.

Aos funcionários e amigos do CAMMI, pela receptividade e conduta exemplar e por mostrar que é possível humanizar o serviço, acolher e respeitar os pacientes. Todos foram muito importantes para que este trabalho fosse cumprido.

Aos pacientes que gentilmente concordaram em participar do estudo e merecem receber o melhor tratamento, no sentido mais amplo da palavra.

Ao meu pai Tarcízio, minha mãe Joice, meus irmãos Juliano e Júnior, minha família maravilhosa a qual amo tanto e que sempre me apoiam em todos os momentos da minha vida.

E para finalizar, um agradecimento especial ao meu amado esposo Fernando, pelo amor incondicional, por todo o carinho e incentivo, principalmente neste momento tão maravilhoso que estamos vivendo à espera de nossas filhas Helena e Laura!

MUITO OBRIGADA!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	8
Resumo	10
Abstract	11
Capítulo 1 Introdução	12
A Hepatite C	13
O Vírus da Hepatite C	15
Diagnóstico Laboratorial	18
Tratamento	19
Imunopatogênese	22
Susceptibilidade genética e hepatite C	25
Interleucina-28B	27
Interleucina-10	28
Fator de Necrose Tumoral alfa	29
Proteína de resistência ao Myxovirus 1	29
Justificativa	30
Objetivos	31
Objetivo Geral	31
Objetivos Específicos	31
Capítulo 2 Resposta ao tratamento de pacientes brasileiros com hepatite C crônica é associada a um polimorfismo de base única próximo ao gene da Interleucina-28B	33
Capítulo 3 Polimorfismos no promotor do fator de necrose tumoral alfa são preditores de ausência de resposta virológica na terapia para infecção crônica pelo vírus da hepatite C entre pacientes brasileiros	53
Capítulo 4 Discussão Geral e Perspectivas	75
Apêndices	93
Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	94
Apêndice 2 Carta de aceitação condicional do artigo <i>Response to treatment in Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated with a single-nucleotide</i>	

<i>polymorphism near the interleukin-28B gene</i>	96
Apêndice 3 Carta de confirmação de submissão do artigo <i>Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms as predictors of null virological response in therapy for chronic hepatitis C virus infection among Brazilian patients</i>	97
Curriculum vitae resumido	98

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina-transaminase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAMMI	Centro de aplicação e monitorização de medicamentos injetáveis
CDCT	Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cEVR	Resposta virológica precoce completa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzimaimunoensaio
EOTR	Resposta virológica no final do tratamento
FAPERGS	Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon
IFN- α	Alfa-interferons
IFN- β	Beta-interferons
IFN- γ	Gama-interferons
IFN-2a	Interferon-alfa 2a
IFN-2b	Interferon-alfa 2b
<i>IL10</i>	Interleucina-10
<i>IL28A</i>	Interleucina-28A
<i>IL28B</i>	Interleucina-28B
<i>IL29</i>	Interleucina-29
MxA	Proteína de resistência ao Myxovirus 1
MxB	Proteína de resistência ao Myxovirus 2
NCR	Região não traduzida
NK	Célula <i>natural killer</i>
NR	Pacientes não respondedores
NVR	Resposta virológica nula

OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	Polietilenoglicol
PEG-IFN	Interferon peguilado
pEVR	Resposta virológica precoce parcial
RBV	Ribavirina
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
SNP	Polimorfismo de base única
SVR	Resposta virológica sustentada
<i>TNFα</i>	Fator de necrose tumoral alfa
UFCSPA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
VNTR	Repetição em tandem de número variável
VR	Resposta virológica

RESUMO

O tratamento da hepatite crônica C, uma combinação de interferon alfa peguilado e ribavirina (PEG-IFN/RBV), apresenta baixas taxas de resposta virológica sustentada (SVR) em pacientes portadores do vírus da hepatite C (HCV). Fatores como o genótipo do vírus, a carga viral e características do hospedeiro estão envolvidos com o sucesso da terapia. Os fatores do hospedeiro, especialmente os imunológicos e genéticos, parecem ter um papel importante no resultado do tratamento da hepatite C. Este estudo foi elaborado com o objetivo de investigar a associação entre polimorfismos de base única (SNP) nos genes da interleucina-28B (*IL28B*), interleucina-10 (*IL10*), fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) e proteína de resistência ao Myxovirus 1 (*MxA*) com a resposta virológica de pacientes com hepatite C crônica.

No estudo foram incluídos 299 pacientes infectados com HCV genótipo 1, em tratamento com PEG-IFN/RBV, no centro de aplicação e monitorização de medicamentos injetáveis (CAMMI), em Porto Alegre, RS. A identificação dos SNPs foi realizada através da técnica de PCR, seguida de sequenciamento. Através da montagem de um banco de dados com informações epidemiológicas e genéticas, análises estatísticas foram realizadas comparando os SNPs analisados com resultados da terapia antiviral em 114 pacientes que tiveram SVR e em 149 que não responderam ao tratamento. As distribuições dos polimorfismos dos genes *IL28B* e *TNF α* , mas não dos outros, foram estatisticamente diferentes entre os grupos de resposta ao tratamento. Após o tratamento com PEG-IFN/RBV, o genótipo CC do gene *IL28B* foi associado com maior taxa de SVR e menor taxa de recidiva, quando comparado com os demais genótipos (CT e TT), 76% vs 38% e 17% vs 40%, respectivamente. Os alelos A dos dois polimorfismos estudados do gene *TNF α* foram significativamente associados à ausência de resposta virológica (51,3% vs 24,0% na posição -308, e 62,1% vs 23,9% na posição -238, $P < 0.001$).

ABSTRACT

Chronic hepatitis C treatment, a combination of pegylated alpha interferon and ribavirin (PEG-IFN/RBV), presents low rates of sustained virologic response (SVR) in patients infected with the hepatitis C virus (HCV). Factors such as the virus genotype, viral load and host characteristics are involved with successful therapy. Host factors, especially the immunological and genetic, seem to have an important role in the treatment outcome. This study was designed with the objective to investigate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in interleukin-28B (*IL28B*), interleukin-10 (*IL10*), tumor necrosis factor alpha (*TNF α*) and myxovirus resistance protein 1 (*MxA*) genes with the virologic response in chronic hepatitis C patients.

The study included 299 infected patients with HCV genotype 1, in treatment with PEG-IFN/RBV. The SNPs identification of was performed by PCR, followed by DNA sequencing. In a database with informations genetic and epidemiological, statistical analyzes were performed comparing the SNPs analyzed with results of antiviral therapy in 114 patients who had SVR and 149 non responders. The distributions of *IL28B* and *TNF α* gene polymorphisms, but not the other, were statistically different between the groups of treatment response. After treatment with PEG-IFN/RBV the *IL28B* CC genotype was associated with higher rates of SVR and lower relapse rate when compared with other genotypes (CT and TT), 76% vs 38% and 17% vs. 40%, respectively. Carrying the A allele at one or both *TNF α* gene polymorphisms was significantly associated with a null virological response to treatment (51.3% vs. 24.0% at position -308 and 62.1% vs. 23.9% at position -238, $P < 0.001$).

Capítulo 1

Introdução

INTRODUÇÃO

A Hepatite C

A hepatite C é uma doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (HCV) com elevada taxa de cronicidade e que pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular, sendo essas consequências responsáveis pela maioria dos transplantes de fígado (CZEPIEL *et al.*, 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima 170 milhões de infectados pelo HCV, sendo que a prevalência de infecção crônica pelo HCV varia nas diferentes regiões do mundo (WHO, 2011).

Tanto a infecção crônica, quanto a infecção aguda pelo HCV são usualmente assintomáticas. Na infecção aguda, apesar de incomum, podem ocorrer sintomas inespecíficos como fadiga, mal-estar geral ou icterícia (CZEPIEL *et al.*, 2008). Após a infecção aguda, cerca de 20 a 50% dos casos evoluem para a cura, todavia esses indivíduos não se tornam imunes à reinfecção (PAWLOTSKY, 2004). A persistência do HCV por mais de seis meses após o contágio, caracteriza a infecção crônica. É tema controverso a proporção de pessoas infectadas pelo HCV que desenvolverá infecção crônica. Em geral, os estudos prospectivos têm demonstrado que 50 a 85% das pessoas infectadas pelo HCV desenvolvem infecção crônica. A transição da fase aguda para a crônica normalmente ocorre na ausência de sintomas (SEEFF, 2002; THOMAS & SEEFF, 2005; GHANY *et al.*, 2009).

A história natural da doença tem demonstrado que 20 a 30 anos após a infecção pelo HCV, cerca de 10 a 20% dos pacientes desenvolvem cirrose hepática. Desses, 1 a 5% poderão desenvolver carcinoma hepatocelular (PAWLOTSKY, 2004; ROE & HALL, 2008; BOSTAN & MAHMOOD, 2010) (Figura 1). Os pacientes infectados permanecem virêmicos e, portanto, transmissores por esse longo período de tempo. A partícula do HCV tende a persistir no sangue, no fígado e nos linfócitos, apesar da existência de resposta imune dos tipos humoral e celular (NIH, 2002; ROSEN, 2011).

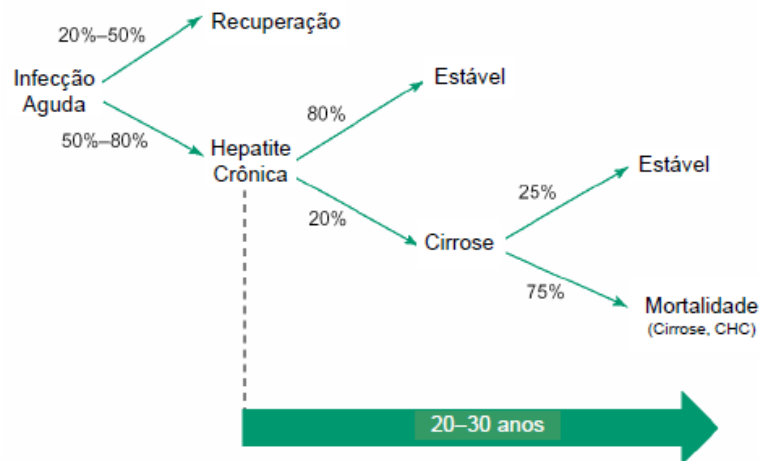


Figura 1: Representação esquemática da história natural da infecção pelo vírus da hepatite C (Adaptada de PAWLITSKY, 2004).

A transmissão do HCV ocorre através da exposição ao sangue contaminado. Sendo assim, são consideradas situações de risco o uso de drogas injetáveis ou cocaína intranasal compartilhadas, transfusões de sangue (antes de 1992), transplantes de órgãos sólidos de doadores infectados, práticas médicas e odontológicas inseguras (material médico-cirúrgico infectado), gestação em mãe infectada, práticas sexuais de risco e uso de produtos derivados de sangue. Os riscos de transmissão vertical (mãe para filho) parecem ser maiores em mulheres com alta viremia para o HCV ou co-infectadas com o HIV (ALTER, 2007). A transmissão por transfusão de sangue foi consideravelmente reduzida mediante a introdução de um teste sorológico para a detecção de anticorpos anti-HCV em bancos de sangue, em meados de 1992 (EASL, 1999; WHO, 1999).

As alterações hepáticas associadas ao HCV traduzem-se pelo grau de fibrose. Segundo a classificação METAVIR, o estágio de fibrose varia de F0 a F4, sendo F0 ausência de fibrose hepática e F4 fibrose avançada em estágio de cirrose (The French METAVIR Cooperative Study Group, 2004). A histopatologia, envolve a ocorrência de inflamação e fibrose, de forma lenta e progressiva, culminando em cirrose. A fibrose hepática é um achado histológico importante para indicação de tratamento antiviral e para avaliação da resposta ao esquema terapêutico (SEEFF, 2002; GOODMAN *et al.*, 2009).

Os mecanismos de inflamação, necrose e fibrose não estão completamente esclarecidos e são áreas de intensa investigação. Consistentes indícios epidemiológicos e/ou de biologia molecular envolvem fatores dependentes do vírus e do hospedeiro que perturbam as funções normais de reparação, metabolismo lipídico, apoptose e promoção do crescimento celular (BERTOLETTI & FERRARI, 2003; KATSOUNAS *et al.*, 2012). Neste sentido, o estudo das interações entre o vírus e o hospedeiro pode elucidar as diferenças observadas na história natural e na resposta à terapia da hepatite C crônica.

O Vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C é um vírus hepatotrópico, envelopado, com uma única fita de RNA de polaridade positiva, com cerca de 9500 nucleotídeos. O HCV foi identificado por Choo e colaboradores em 1989 nos Estados Unidos, sendo a doença anteriormente denominada hepatite não-A-não-B (CHOO *et al.*, 1989). A caracterização da sequência de ácido nucléico revelou que a organização genômica do HCV era similar à dos vírus pertencentes à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (MILLER & PURCELL, 1990).

O genoma do HCV contém três regiões distintas, sendo uma codificante, flanqueada por duas regiões não traduzidas (NCR) altamente conservadas nas extremidades 5' e 3'. A região codificante contém uma única e longa fase de leitura aberta (*open-reading frame*) que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos. As proteínas do núcleo (*core*), que formam o nucleocapsídeo viral, e as glicoproteínas E1 e E2 do envelope, são as proteínas estruturais, localizados na extremidade N-terminal. As proteínas não estruturais, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B, envolvidas no processamento da poliproteína e na replicação viral, estão na extremidade C-terminal. As sequências gênicas que codificam proteínas estruturais e não estruturais do HCV estão organizadas da seguinte maneira: 5' → 3', C – E1 – E2 - p7 – NS2 – NS3 – NS4A – NS4B – NS5A – NS5B (CHOO *et al.*, 1989; CHOO *et al.*, 1991; BOSTAN & MAHMOOD, 2010) (Figura 2).

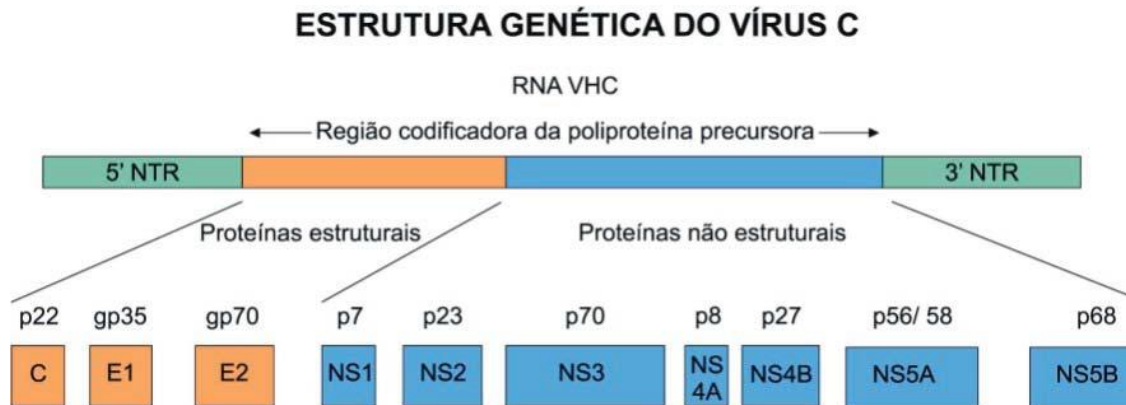


Figura 2: Genoma do HCV. As caixas de cor verde mostram as regiões: 5' não traduzida (5'-NTR) e 3' não traduzida (3'-NTR). As de cor laranja destacam as regiões que codificam proteínas estruturais. Na cor azul estão representadas as regiões que codificam proteínas não estruturais (ANZOLA & BURGOS, 2003).

O genoma do HCV funciona como molde para a sua replicação e também como RNA mensageiro viral. A replicação ocorre através de um RNA intermediário em um compartimento ligado a membrana e que contém RNAs de cadeia dupla. Feita a sua tradução, surge a poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos que é processada por proteases celulares e virais em proteínas estruturais (componentes do vírus maduro) e não estruturais. O vírus apresenta elevada capacidade replicativa associada à falta de capacidade de verificação de erros da sua polimerase, tal como acontece em outros vírus de RNA (LINDENBACH & RICE, 2005).

Análises filogenéticas de sequências completas ou parciais de isolados do HCV de várias regiões do mundo levaram a identificação de seis genótipos principais, designados por números arábicos de 1 a 6, e mais de 100 subtipos virais (isolados intimamente relacionados a um genótipo principal), identificados por letras minúsculas (SIMMONDS *et al.*, 1994). Um sétimo genótipo foi descrito em 2007 em três pacientes originários da África Central (MURPHY *et al.*, 2007).

Estudos epidemiológicos têm revelado que os genótipos variam quanto à distribuição geográfica. Os genótipos 1, 2 e 3 distribuem-se no mundo inteiro (ZEIN, 2000), os tipos 4 e 5 são encontrados principalmente na África, enquanto

que o tipo 6 é normalmente detectado na Ásia (MCOMISH *et al.*, 1994; MELLOR *et al.*, 1995; NGUYEN & KEEFE, 2005; NAINAN *et al.*, 2006). No Brasil, os genótipos 1, 2 e 3 são frequentes, enquanto os genótipos 4 e 5 são raros (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Alguns estudos no Brasil têm demonstrado considerável variação na distribuição dos genótipos. Observa-se maior prevalência do genótipo 1, seguido pelos genótipos 3 e 2. Na região sul do país, excepcionalmente, o genótipo 3 apresenta uma frequência aumentada, quando comparado a outras regiões (SILVA *et al.*, 2007). A alta frequência do genótipo 3 do HCV observada na região Sul é relevante e mostra que os pacientes dessa região do País têm um melhor prognóstico em comparação aos pacientes de outros estados, pois pacientes infectados com genótipos 2 ou 3 respondem melhor à terapia antiviral que pacientes infectados com genótipos 1 ou 4 (HADZIYANNIS *et al.*, 2004; SHIFFMAN, 2007).

O HCV circula, num mesmo indivíduo, como uma população de genomas diferentes, porém muito relacionados, chamados de quasispécies, cujas sequências diferem somente por alguns nucleotídeos (DUARTE *et al.*, 1994). Estas variantes podem ser determinadas por uma combinação entre a adaptação viral e a resposta à pressão do sistema imunológico do hospedeiro. A existência de populações de quasispécies de HCV dificulta o desenvolvimento de vacinas e favorece a permanência do vírus no organismo humano (CHAMBERS *et al.*, 2005).

A infecção pelo HCV tipicamente persiste durante toda a vida do indivíduo e, a não ser que seja interrompida por terapêutica, ocorrem muitas oportunidades de transmissão dentro da população humana. O sucesso da transmissão do HCV está ligado à capacidade do vírus evadir, antagonizar a resposta imune do hospedeiro e resistir às ações antivirais do interferon. A ação dos interferons em células do hospedeiro infectadas por vírus provoca um estado antiviral que é caracterizado pela expressão de genes com atividade antiviral estimulados pelo interferon. Os vírus, por outro lado, têm mecanismos e diversas estratégias que se contrapõem à resposta do hospedeiro e permitem uma replicação eficiente, minimizando o poder terapêutico antiviral dos interferons. A compreensão da complexa rede de processos celulares antivirais e as interações vírus hospedeiro

deverão ajudar na identificação das estratégias de evasão, infecção persistente e propagação do HCV (GALE & FOY, 2005).

Diagnóstico Laboratorial

A identificação e a caracterização do genoma do HCV foram acompanhadas pelo desenvolvimento de métodos diagnósticos sorológicos e moleculares. Uma combinação destes testes é necessária para diagnosticar a infecção pelo HCV, direcionar as decisões de tratamento e avaliar a resposta ao tratamento.

A infecção pelo HCV é normalmente diagnosticada através da detecção de anticorpos anti-HCV no plasma ou no soro, utilizando o teste enzimaimunoensaio (ELISA). Por ser uma técnica de fácil execução, o ELISA é amplamente utilizado para triagem do HCV em bancos de sangue e em laboratórios de análises clínicas (GHANY *et al.*, 2009). Atualmente, esse teste, de terceira geração, utiliza proteínas recombinantes derivadas do *core*, NS3, NS4 e NS5 do HCV. Com a utilização dos testes de terceira geração é possível alcançar uma especificidade superior a 99% em populações com alta prevalência de infecção pelo HCV (COLIN *et al.*, 2001). A detecção de anti-HCV, entretanto, não diferencia uma infecção ativa de uma outra já resolvida. Portanto, esse marcador serve apenas para indicar exposição ao vírus. Além disso, resultados falsos positivos ainda ocorrem, especialmente em populações de baixo risco, como doadores de sangue. Resultados falsos positivos são atribuídos a ligações inespecíficas entre imunoglobulinas presentes no soro ou no plasma e contaminantes das preparações antigênicas dos *kits* ou regiões não específicas dos antígenos recombinantes. Por outro lado, resultados falsos negativos podem ser obtidos, quando o diagnóstico é feito no período da janela imunológica, antes da soroconversão, ou em casos de imunossupressão e imunodeficiência (CARUNTU & BENEÀ, 2006; GHANY *et al.*, 2009).

A hepatite C é um dos melhores exemplos de aplicação direta do diagnóstico molecular na prática clínica. A detecção do RNA viral é aceita como

“padrão ouro” entre os métodos existentes de identificação do HCV. A aplicação de testes moleculares para detecção, quantificação e genotipagem do vírus é uma ferramenta valiosa para o manejo clínico do paciente. Os ensaios quantitativos fornecem as informações sobre a carga viral pré-tratamento, redução da carga viral com a terapia e de resposta virológica sustentada (SCOTT & GRETCH, 2007).

Tratamento

O tratamento da hepatite C tem como objetivo primário a supressão sustentada da replicação viral. Reconhecidamente, a denominada Resposta Virológica Sustentada é o desfecho laboratorial de maior relevância nos estudos clínicos sobre o tratamento desta doença, a qual significa a ausência do RNA viral após 24 semanas do término da terapia farmacológica (ALBERTI & BENVEGNI, 2003).

O interferon foi o primeiro medicamento capaz de promover a SVR em pacientes com hepatite C, porém mostrava-se com baixa efetividade (15-20%). A associação com a ribavirina tornou o tratamento mais efetivo, com variação nas taxas de resposta virológica de acordo com o genótipo, sendo que para o genótipo 1 foram obtidas as menores taxas de resposta virológica (31-38%) (MCHUTCHISON *et al.*, 1998; POYNARD *et al.*, 1998).

Os interferons são um grupo de proteínas com amplo espectro antiviral, sendo de grande importância na regulação das funções imunológicas. As três principais classes reconhecidas são: alfa-interferons (IFN- α), derivados de linfócitos e macrófagos; beta-interferons (IFN- β), produzidos por células epiteliais e fibroblastos; e gama-interferons (IFN- γ), derivados de linfócitos T e macrófagos após estimulação mitogênica e antigênica. O IFN- α é o tipo de interferon com maior uso terapêutico, sendo aprovado como medicamento antiviral para o tratamento das hepatites B e C, sarcoma de Kaposi e condiloma acuminado (ARONSON, 2000).

O IFN- α liga-se em receptores de superfície da célula, promovendo a ativação de enzimas citoplasmáticas que afetam a tradução do RNA mensageiro e, assim, a síntese protéica (ARONSON, 2000). Na prática clínica, são utilizados dois tipos de IFN- α bastante semelhantes, química e farmacologicamente: o alfa-interferon-2a (IFN-2a) e o alfa-interferon-2b (IFN-2b). As formas peguiladas dos IFN-2a e IFN-2b, que se constituem do acoplamento do IFN a diferentes tipos de polietilenoglicóis (PEG), foram desenvolvidas com o objetivo de prolongar o tempo de meia-vida dessas moléculas, permitindo que a administração passasse a ser 1 vez por semana, ao invés de três vezes, com discreto aumento da SVR para o genótipo 1. Sintomas tipo gripais, desordens hematológicas, neurológicas e hepáticas são os eventos adversos comumente relatados com o uso de IFN- α (ALBERTI & BENVENEGNU, 2003).

A ribavirina é um análogo de nucleosídeo que inibe a ação da polimerase viral e, conseqüentemente, a replicação do genoma do HCV. No interior da célula, a ribavirina é convertida nas formas mono-, di- e trifosfatadas que inibem a ação das enzimas envolvidas na síntese da cadeia do ácido nucléico viral. Por outro lado, a ribavirina é acumulada nos eritrócitos, resultando em hemólise dessas células, conseqüentemente, ocasionando anemia hemolítica dose-dependente. Essa é a toxicidade mais significativa no uso da ribavirina (ARONSON, 2000).

O tratamento de hepatite C crônica é indicado a pacientes com elevados níveis de transaminases no soro, fibrose detectada por biópsia do fígado e presença de RNA viral no sangue. A determinação do genótipo do HCV é o principal determinante para a definição da duração do tratamento. De acordo com a Associação Européia para Estudos do Fígado (EASL, 1999) e o Consenso estabelecido pelo *National Institutes of Health* (NIH, 2002) para o manejo da Hepatite C, a terapia padrão para infecção crônica pelo HCV é baseada na combinação de interferon-peguilado alfa-2a ou alfa-2b com ribavirina durante 48 semanas para pacientes infectados com os genótipos 1 ou 4, ou IFN-2a ou IFN-2b com ribavirina durante 24 semanas para aqueles infectados com os genótipos 2 ou 3.

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C do Ministério da Saúde (SANDER *et al.*, 2002), o esquema recomendado para

tratamento dos pacientes portadores de hepatite crônica C com genótipo 1 deve ser feito com interferon-peguilado-2a aplicado semanalmente na dose de 180 µg, independente do peso corporal, ou com interferon-peguilado-2b aplicado semanalmente, na dose de 1,5 µg/kg de peso corporal. A ribavirina deve ser utilizada diariamente, na dose de 1.000 mg ou 1.250 mg (para pacientes acima de 75 kg) (Figura 3).

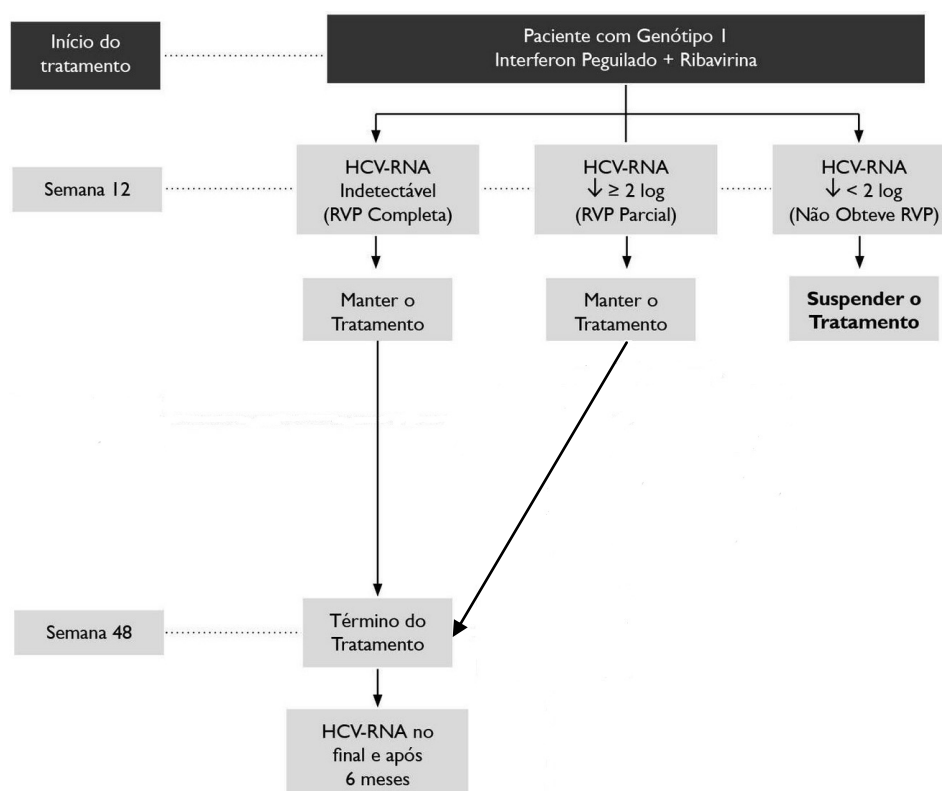


Figura 3: Fluxograma do tratamento da hepatite C crônica realizado pelos pacientes portadores do genótipo 1 do HCV que participaram do estudo (Adaptada do Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C, 2011).

Muitos estudos têm demonstrado que o tratamento com interferon-peguilado é efetivo em cerca de 80% dos pacientes com infecção por HCV genótipos 2 ou 3 e em menos de 50% nos pacientes com HCV genótipo 1.

Infelizmente o genótipo 1 é a causa de aproximadamente 70-80% das infecções crônicas com danos hepáticos mais graves, tornando o tratamento atualmente utilizado insatisfatório para muitos pacientes. Além disso, a terapia combinada e prolongada apresenta altos custos e está associada com eventos adversos de difícil tolerância pelos pacientes. Os principais eventos adversos descritos são sintomas de gripe, citopenias e distúrbios neuropsiquiátricos. Isso levou à busca permanente de novas abordagens terapêuticas que podem aumentar as taxas de SVR e também ser melhor toleradas (LISKER-MELMAN & SAYUK, 2007; O'BRIEN *et al.*, 2011; SALLOUM & TAI, 2012).

No ano de 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização de dois novos medicamentos para o tratamento da hepatite C. Tratam-se de dois inibidores da protease viral NS3, Boceprevir (Victrelis) e Telaprevir (Incivek) que, administrados em terapia tripla, ou seja, em combinação com PEG-IFN/RBV, aumentam significativamente as taxas de resposta ao tratamento para os pacientes portadores do genótipo 1 do HCV e se apresentam como uma opção de cura para aqueles que não responderam a um tratamento anterior com PEG-IFN/RBV. Apesar de melhores taxas de resposta virológica sustentada, os novos medicamentos representam aumento do risco de eventos adversos e seleção para resistência antiviral. Com enfoque em uma abordagem personalizada, várias outras opções terapêuticas estão sendo desenvolvidas, com objetivo de melhoria de eficácia e segurança do PEG-IFN, RBV e inibidores de proteases; desenvolvimento de novos inibidores da polimerase e de moléculas de RNA de interferência (RNAi) (POORDAD *et al.*, 2011; JACOBSON *et al.*, 2011).

Imunopatogênese

As etapas iniciais da infecção viral pelo HCV envolvem dois grupos de proteínas: as proteínas estruturais do vírus e as moléculas receptoras presentes na superfície das células alvo. A primeira linha de defesa, com um papel crucial no controle do HCV, é a imunidade inata. Nas infecções virais agudas esta

resposta imune não específica, cujos mecanismos de defesa celulares e moleculares existem antes do estabelecimento de uma infecção, envolve principalmente a secreção de IFN tipo I, ativação de células *natural killers* (NK) e ativação de células fagocitárias (neutrófilos, monófilos e células dendríticas). Estudos têm sugerido que a secreção endógena de IFN tipo I, embora induzida pela replicação do HCV, não consegue de forma eficiente inibi-la. Esses estudos demonstram que os genes induzidos por IFN- α são amplamente expressos durante o curso da infecção aguda, mas esta resposta falha no controle da replicação viral (POYNARD *et al.*, 2003; PAWLOTSKY *et al.*, 2007).

As citocinas são essenciais na defesa do hospedeiro contra a invasão pelo HCV, mas elas também estão implicadas na lesão hepatocelular observada na maioria dos pacientes cronicamente infectados pelo HCV. Durante o curso da infecção, as citocinas podem ser caracterizadas como tendo efeitos estimulantes (pró-inflamatórios) ou inibidores (antiinflamatórios), podendo, assim, prolongar a resposta inflamatória e levar à necrose, fibrose ou doença hepática crônica. A persistência do vírus e a resposta à terapia antiviral têm sido associadas com a produção inapropriada de concentrações plasmáticas de interleucina 10 e fator de necrose tumoral alfa, entre outras importantes citocinas e quimiocinas. Diferenças individuais nos níveis séricos de citocinas estão associadas, principalmente, a fatores genéticos, como mutações e polimorfismos em regiões regulatórias dos genes dessas citocinas (KHAKOO, 2011; ROMERO-GOMEZ *et al.*, 2011).

No fígado humano, quando há multiplicação de HCV, observa-se uma grande proporção de células NK que promovem a ativação das células dendríticas e iniciam a resposta imune adaptativa, uma resposta mais forte e específica do que a observada na resposta inata. Seus componentes são as células da linhagem linfóide e seus produtos, como os anticorpos (FLAJNIK & DU PASQUIER, 2004). As respostas de linfócitos T CD4 e T CD8 específicas na hepatite C se mostram fracas e ineficientes, e as células T CD8 parecem possuir suas funções efetoras deficientes, tanto na secreção de citocinas antivirais, quanto na sua atividade lítica (POYNARD *et al.*, 2003). Acredita-se que os linfócitos T citotóxicos ou CD8 desempenham um papel essencial na resposta imunológica para a eliminação do HCV, bem como na lesão hepática com

consequente evolução para a cronicidade da infecção. Quando os linfócitos T CD4 respondem de forma vigorosa e duradoura à infecção pelo HCV, são responsáveis pela eliminação viral já na fase aguda. A perda de reatividade dos linfócitos T CD4 tem sido associada à persistência do vírus e progressão do dano hepático (ROSEN, 2003; KHAKOO, 2011) (Figura 4).

A lesão hepatocelular desenvolvida na hepatite C se faz pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. A dinâmica desse processo mostra-se extremamente variável, fazendo com que as interações HCV-hospedeiro regulem a resposta do hospedeiro e afetem a evolução da infecção pelo HCV (GALE & FOY, 2005).

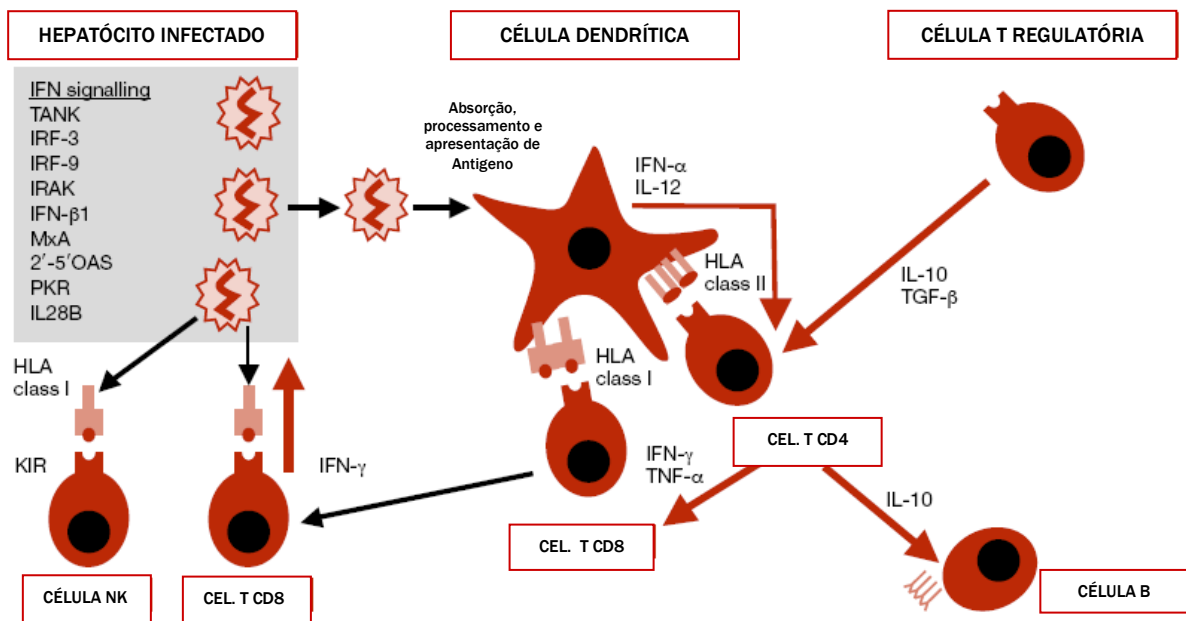


Figura 4: Uma visão geral da resposta imune da infecção pelo HCV. São demonstradas as proteínas, envolvidas nas vias da resposta imune ao HCV, que possuem polimorfismos que são potenciais candidatos para influenciar no resultado da infecção pelo HCV (Adaptado de KHAKOO, 2011).

Susceptibilidade genética e Hepatite C

O desenvolvimento de uma doença infecciosa resulta de uma complexa interação entre o microrganismo, o hospedeiro e o ambiente. A susceptibilidade a doenças infecciosas não segue os padrões simples de herança mendeliana, e a resposta imune em humanos é um complexo sistema geneticamente controlado (BURGNER *et al.*, 2006). A resposta imune a uma doença infecciosa pode ser definida como sendo poligênica (envolve mais de um gene) e multifatorial (dependendo da interação de mais de um gene e um ou vários fatores ambientais) (CLEMENTI & DI GIANANTONIO, 2006).

Os estudos de doenças autoimunes e infecciosas indicam que a susceptibilidade de muitos genes na resposta imune possui pouca influência quando analisados isoladamente, mas com efeitos somados, quando analisados dentro da resposta imune total (HILL, 2001; BURGNER *et al.*, 2006).

Genes são considerados funcionalmente “polimórficos” quando variantes alélicas existem estavelmente na população, sendo que a atividade da proteína codificada pode ser alterada em relação à sequência do tipo-selvagem. As variações genéticas são chamadas de polimorfismos quando presentes numa frequência maior que 1% na população. Elas podem ser de vários tipos, incluindo deleção/inserção, polimorfismo de base única (SNP), repetição em tandem de número variável (VNTR), entre outros. Entretanto, o tipo mais comum responsável por aproximadamente 90% da variabilidade entre os indivíduos, é o SNP. Milhões de polimorfismos vêm sendo identificados e catalogados, tanto em regiões regulatórias dos genes, como em regiões não codificantes (WRIGHT AF, 2005; WJST & WERNER, 2006).

As alterações do tipo SNP em genes que codificam citocinas ou nas suas regiões promotoras podem acarretar alterações na expressão gênica e na síntese e na atividade biológica de proteínas envolvidas com respostas às drogas, além de influenciar a taxa e a magnitude de produção de citocinas, podendo influenciar a intensidade e a duração da resposta imune (SANDRIM *et al.*, 2006).

Embora o genótipo viral seja um dos principais determinantes da resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo HCV, a produção de níveis inapropriados

de algumas citocinas pode contribuir para a persistência viral, influenciando, tanto no curso natural da infecção, como na resposta ao tratamento (BARRETT *et al.*, 2003; KNAPP *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004; DAÍ *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2009). Estas variações sugerem que os pacientes portadores do HCV podem ter diferentes mecanismos regulatórios genéticos. Os polimorfismos em regiões não codificantes de genes do sistema imunológico, bem como variações genéticas em enzimas metabolizadoras de drogas, sugerem que os polimorfismos tem importância funcional e evolutiva e podem fornecer pistas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (REGO-PÉREZ *et al.*, 2008).

Os resultados de vários estudos são conflituosos. Uma das possíveis explicações porque hospedeiros com o mesmo genótipo e carga viral semelhante apresentam diferentes respostas ao tratamento é o fato dos estudos terem sido efetuados em populações com frequências alélicas diferentes, mostrando claramente o efeito da heterogeneidade genética das populações de estudo. A frequência alélica das variantes genéticas, o desequilíbrio de ligação e o haplótipo dos polimorfismos estudados são parâmetros importantes na determinação das diferenças genéticas entre os pacientes (BARRETT *et al.*, 2003; KNAPP *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004; DAÍ *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2009).

Os avanços das pesquisas na área da genética e os dados gerados a partir do sequenciamento do genoma humano geraram importantes descobertas a respeito da influência de variações genéticas humanas nas respostas às drogas. A identificação de polimorfismos em genes que influenciam nas variações interindividuais, na eficácia ou toxicidade de agentes terapêuticos e a aplicação desta informação na prática clínica está sendo estudada pela farmacogenômica e/ou farmacogenética (PANG, 2003).

Polimorfismos estudados neste trabalho

Com o objetivo de determinar como as variações genéticas do hospedeiro influenciam a resposta ao tratamento da hepatite C crônica, serão apresentados alguns dados sobre o potencial papel dos genes candidatos que foram

selecionados para este estudo: interleucina-28B, interleucina-10, fator de necrose tumoral alfa e proteína de resistência ao Myxovirus 1.

Interleucina-28B

A Interleucina-28, descrita em 2003 por Sheppard e colaboradores, é uma citocina que possui duas isoformas, IL28A e *IL28B*, e desempenha um papel importante na defesa imunológica contra vírus. As IL28A e *IL28B* pertencem à família de citocinas do interferon tipo III e são muito semelhantes em relação às sequências de aminoácidos a proteína IL29. O gene *IL28B* codifica uma citocina distantemente relacionada com o IFN tipo I e da família *IL10*. Sua classificação como interferon se deve à sua capacidade de induzir um estado antiviral, enquanto sua classificação como citocina decorre de sua localização cromossômica (SHEPPARD *et al.*, 2003).

Recentemente, estudos de associação ampla de genoma (*Genome-Wide Association Studies* - GWAS) sugeriram que vários SNPs, altamente correlacionados e em desequilíbrio de ligação, localizados nas proximidades de três genes situados no cromossomo 19, codificando interferon λ 1 (IL29), λ 2 (IL28A), e λ 3 (*IL28B*), estão fortemente associados com a eficiência da resposta à terapia PEG-IFN/RBV entre os pacientes infectados com HCV genótipo 1 (GE *et al.*, 2009; SUPPIAH *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2009). A presença destes polimorfismos provavelmente está associada à produção de interferon λ 3, que pode contribuir para a eliminação do HCV, atuando de forma sinérgica com o IFN tipo 1, embora o mecanismo de ação ainda precise ser elucidado (THIO & THOMAS, 2010). Especificamente, o polimorfismo rs12979860, localizado a três kilobases a montante do gene *IL28B*, foi associado significativamente com alta taxa de SVR (GE *et al.*, 2009).

Interleucina-10

Em 1988, Fiorentino e colaboradores descreveram uma substância que estava presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2 e que era capaz de inibir a produção de citocinas produzidas por células Th1 em cultivos celulares. Posteriormente, essa citocina passou a ser chamada Interleucina-10 (FIORENTINO *et al.*, 1989).

A *IL10* é uma importante citocina imunossupressora envolvida em muitos aspectos da resposta imunológica e normalmente produzida por linfócitos T ativados, monócitos, linfócitos B e timócitos. Possui forte atividade anti-inflamatória e desempenha um papel crítico na regulação da resposta imune, predominantemente, através da inibição de mediadores pró-inflamatórios incluindo fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) e Interleucina-12 (*IL12*) (SARAIVA & O'GARRAM, 2010).

A infecção por HCV induz a ativação da secreção de *IL10*, sendo que o aumento da produção de *IL10* tem sido correlacionado com infecção persistente pelo HCV, além de inflamação em grau avançado e aumento do risco de câncer de fígado (HOFER *et al.*, 2005).

O gene *IL10* humano está localizado no cromossomo 1 (1q31-q32), sua região promotora abrange 5 kb e é muito polimórfica (ESKDALE *et al.*, 1999). Os polimorfismos de base única melhor caracterizados estão localizados na região promotora, nas posições -1082 A/G, -819 T/C e -592 A/C. Essas variantes têm sido envolvidas na taxa de transcrição de *IL10* e, portanto, no nível de produção da citocina. O polimorfismo na região -1082 tem se mostrado importante na determinação na produção alta, média e baixa da Interleucina-10. Vários estudos têm associado um possível envolvimento da *IL10* na patogênese de doenças inflamatórias, assim como com a resistência à terapia com IFN-alfa (SARAIVA & O'GARRAM, 2010).

Fator de Necrose Tumoral Alfa (*TNF α*)

O *TNF α* é uma citocina usualmente presente na resposta imunológica mediada por células, que foi descrita em meados de 1970, como resultado de longas pesquisas sobre mecanismos que caracterizavam os efeitos autoimunes induzidos por endotoxinas (CARSWELL *et al.*, 1975).

O gene *TNF α* humano apresenta 3 kb, 4 exons e localiza-se no cromossomo 6p21, na região de classe III do complexo de histocompatibilidade principal humano (MHC). O produto gênico do *TNF α* é uma proteína de membrana tipo II que exerce uma variedade de efeitos mediados por dois tipos de receptores (*TNFR-I* e *TNFR-II*), atuando como uma citocina imunomoduladora, pró-inflamatória e pleiotrópica produzida sobretudo por macrófagos ativados e, em menores quantidades, por outros tipos celulares como linfócitos T e B. Os linfócitos T citotóxicos estão envolvidos na depuração de hepatócitos infectados por HBV ou HCV e na patogênese das hepatites virais crônicas. A produção de *TNF α* é um dos eventos iniciais em muitos tipos de lesão hepática. A apoptose hepatocelular induzida pelo *TNF α* é iniciada pela sua ligação deste ao *TNFR-I*, desencadeando a produção de outras citocinas que recrutam células inflamatórias e iniciam a resposta de cicatrização hepática (GHAVAMI *et al.*, 2005).

Estudos têm demonstrado que o *TNF α* pode ter um papel na patogênese da hepatite C crônica, influenciando a taxa de progressão para fibrose. Na região promotora do gene *TNF α* , os polimorfismos de base única das posições -238 e -308 foram associados com a persistência do vírus, com doença hepática avançada, além de influenciar a resposta a terapia com IFN α (YEE *et al.*, 2000; DAI *et al.*, 2006; THIO, 2008).

Proteína de resistência ao Myxovirus 1

O gene Mx, identificado pela primeira vez em camundongos, após estudos de associação entre resistência genética à infecção pelo vírus influenza, codifica uma proteína que exerce atividade antiviral, através de sua função principal como

uma GTPase (LINDENMANN, 1962). Nos seres humanos, duas proteínas chamadas de proteína de resistência ao Myxovirus 1 (MxA) e de proteína de resistência ao Myxovirus 2 (MxB) são codificadas por genes fortemente ligados no braço longo do cromossomo 21 (posição 21q22.3) (HALLER & KOCHS, 2011).

A proteína MxA é componente chave da resposta antiviral inata e desempenha um papel importante na defesa precoce do hospedeiro contra vários vírus. Em mamíferos e outros vertebrados, a proteína MxA é conhecida por inibir a replicação de uma grande variedade de vírus de RNA fita simples. Os detalhes estruturais de oligomerização da proteína MxA foram recentemente elucidados e permitiram novas hipóteses sobre o mecanismo antiviral dessa proteína, sugerindo que a mesma tem como alvo a nucleoproteína dos vírus, inibindo, assim, a função de transcrição e replicação (HALLER & KOCHS, 2011).

A proteína antiviral MxA atua como um marcador biológico induzido, exclusivamente, por IFN tipo 1 de uma maneira dose-dependente, devido ao fato do gene *MxA* ter um promotor que é ativado pelo IFN. A dosagem dessa proteína foi usada com sucesso no monitoramento da terapia com IFN- α em pacientes com hepatite crônica (ANTONELLI *et al.*, 1999; BERTOLOTTO *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que o aumento dos níveis séricos da proteína MxA está relacionado com resposta à terapia com IFN- α em pacientes com HCV. Polimorfismos localizados na região promotora do gene, nas posições -123 e -88, foram associados com o desfecho da terapia baseada no uso de IFN (KNAPP *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004).

JUSTIFICATIVA

Como o tratamento contra a infecção pelo HCV com a combinação de Interferon- α e Ribavirina tem baixas taxas de resposta e não há uma vacina eficaz na prevenção da infecção, justifica-se a busca por novos estudos que possam dar subsídios ao médico no manejo correto do tratamento da hepatite C e às políticas de saúde pública. A compreensão das diferenças entre os perfis genéticos de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento, auxiliará na identificação daqueles que se beneficiarão com as medicações preconizadas, possibilitando o uso racional das mesmas, uma vez que, além dos eventos adversos existentes, o tratamento atualmente utilizado para hepatite C é efetivo em menos de 50% dos indivíduos com HCV genótipo 1. O HCV genótipo 1 é a causa de aproximadamente 70-80% das infecções crônicas com danos hepáticos graves.

Assim torna-se de grande importância o estudo da influência de variações genéticas nas respostas às drogas para auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes, com um menor risco de eventos adversos, possibilitando uma terapia individualizada mais segura.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Este estudo foi elaborado com o objetivo de estimar a frequência dos polimorfismos nos genes Interleucina-28B, Interleucina-10, Fator de Necrose Tumoral-alfa e Proteína de Resistência ao Myxovirus e a possível relação desses polimorfismos com a resposta ao tratamento da hepatite C em um grupo de pacientes portadores de HCV, genótipo 1, em tratamento no CAMMI do Hospital Sanatório Partenon, em Porto Alegre.

Objetivos Específicos

- A) Selecionar os pacientes com HCV, genótipo 1, em tratamento com interferon-peguilado e ribavirina pela primeira vez, no CAMMI do Hospital Sanatório Partenon.
- B) Analisar a frequência dos polimorfismos presentes nos genes *IL28B*, *IL10*, *TNF* alfa e *MxA* dos pacientes com HCV, genótipo 1, em tratamento com PEG/IFN e RBV.
- C) Associar a presença dos polimorfismos genéticos com a resposta ao tratamento.
- D) Investigar a relação dos genótipos com as variáveis clínicas, bioquímicas e virológicas disponíveis nas fichas terapêuticas dos pacientes em estudo.

Capítulo 2

Resposta ao tratamento de pacientes brasileiros com hepatite C crônica é associada a um polimorfismo de base única próximo ao gene da Interleucina-28B

CAPÍTULO 2. Resposta ao tratamento de pacientes brasileiros com hepatite C crônica é associada a um polimorfismo de base única próximo ao gene da Interleucina-28B

Autores: Tarciana Grandi, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Karine Medeiros Amaral, Paulo Dornelles Picon, Cintia Costi, Nicole Nascimento da Fré, Marilu Fiegenbaum, Christian Niel e Maria Lucia Rosa Rossetti

Artigo submetido à publicação no periódico *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Resumo

Problemática Um polimorfismo de base única (SNP), localizado a montante do gene *IL28B* foi recentemente encontrado como um importante preditor da resposta ao tratamento da hepatite C crônica com interferon peguilado e ribavirina (PEG-IFN/RBV). O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo do gene *IL28B* (rs12979860) e a resposta virológica em pacientes com hepatite crônica C.

Métodos Foram genotipados 263 pacientes brasileiros infectados com HCV genótipo 1, em tratamento com PEG-IFN/RBV. As resposta virológica precoce (EVR, 12 semanas), resposta de fim-de-tratamento (EOTR, 48 semanas), resposta virológica sustentada (SVR, 72 semanas) e de recidiva foram avaliadas por PCR qualitativo e quantitativo.

Resultados A frequência do alelo C na população foi de 39%. No geral, 43% dos pacientes apresentaram SVR. O genótipo CC *IL28B* foi associado com maiores taxas de resposta ao tratamento quando comparado com os demais genótipos (CT e TT), que apresentaram 84% vs 58% EVR, 92% vs EOTR 63%, e 76% vs 38% SVR, e menor taxa de recidiva (17% vs 40%).

Conclusão O genótipo CC do gene *IL28B* parece ser um forte preditor de resposta virológica sustentada na terapia com PEG-IFN/RBV em pacientes infectados com o genótipo 1, sem tratamento prévio. Ensaios clínicos são

necessários para definir os melhores protocolos para o tratamento de pacientes infectados com HCV genótipo 1.

Palavras-chave: IL28B, HCV, resposta virológica, tratamento

Response to treatment of Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated to a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene

Tarciana Grandi ^{a, b}, Cláudia Maria Dornelles da Silva ^{a, c, d}, Karine Medeiros Amaral ^e, Paulo Dornelles Picon ^e, Cintia Costi ^a, Nicole Nascimento da Fré ^a, Marilu Fiegenbaum^{f,g,h}, Christian Niel ^j and Maria Lucia Rosa Rossetti ^{a, b, d, *}

^a *Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, Brazil*

^b *Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil*

^c *Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil*

^d *Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil*

^e *Centro de Aplicação e Monitorização de Medicamentos Injetáveis (CAMMI), Porto Alegre, Brazil*

^f *Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

^h *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

ⁱ *Programa de Pós-Graduação em Biociências e Reabilitação, Centro Universitário Metodista, do IPA, Porto Alegre, Brazil*

^j *Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil*

* Corresponding author at: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS, Av. Ipiranga 5400, 3º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3352 0336; Fax: +55 51 3352 0336.

E-mail address: mrossett@terra.com.br (M.L.R. Rossetti).

Abstract

Background A single-nucleotide polymorphism (SNP) upstream of *IL28B* has recently been found to be an important predictor of the outcome of chronic hepatitis C treatment with pegylated interferon plus ribavirin (PEG-IFN/RBV). The aim of this study was to investigate the association between the *IL28B* gene polymorphism (rs12979860) and virological response in chronic hepatitis C patients.

Methods Brazilian patients (n=263) infected with HCV genotype 1 and receiving PEG-IFN/RBV were genotyped. Early virological response (EVR, 12 weeks), end-of-treatment response (EOTR, 48 weeks), sustained virological response (SVR, 72 weeks) and relapse were evaluated by conventional and quantitative PCR assays.

Results The frequency of the C allele in the population was 39%. Overall, 43% of patients experienced SVR. The *IL28B* CC genotype was associated with higher treatment response rates when compared to the other genotypes (CT and TT), with 84% vs. 58% EVR, 92% vs. 63% EOTR, and 76% vs. 38% SVR, and a lower relapse rate (17% vs. 40%).

Conclusion *IL28B* genotype appears to be a strong predictor of SVR with PEG-IFN/RBV therapy in treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1. Clinical trials are needed to define the best protocols for the treatment of patients infected with HCV genotype 1, especially those with a bad prognosis.

Keywords: *IL28B*, HCV, virological response, treatment

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is a global health problem affecting an estimated 170 million people worldwide.¹ HCV infection is usually persistent, and approximately 30% of individuals with persistent infection develop chronic liver disease, including cirrhosis and hepatocellular carcinoma, after an asymptomatic period of several years.^{2,3} Patients with chronic hepatitis C are treated for 24-48 weeks with pegylated interferon (PEG-IFN) alpha 2a or 2b in combination with ribavirin (RBV). This treatment is not only expensive, but also associated with side effects that result in reduced compliance or even in treatment interruption. HCV clearance, or sustained virological response (SVR) is defined as a negative HCV RNA test 24 weeks after cessation of therapy.

A higher SVR rate has been observed in patients infected with HCV genotypes 2 and 3 compared to those infected with genotype 1, which is the most common genotype found in Europe and the Americas.⁴⁻⁸ Furthermore, other host and viral factors, such as advanced liver fibrosis, advanced age and high baseline viral load, have been associated with poorer treatment outcomes.⁸ For this reason, decisions regarding the inclusion of certain individuals in treatment protocols with the current standard-of-care IFN-based therapy are complex and based on a balanced assessment of host and viral characteristics.^{9,10}

Recently, Genome-Wide Association Studies (GWAS) have suggested that several highly correlated, common single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on a linkage disequilibrium block in the vicinity of three genes located on chromosome 19, encoding interferon λ 1 (*IL29*), λ 2 (*IL28A*), and λ 3 (*IL28B*), are strongly associated with the efficiency of response to PEG-IFN/RBV therapy among patients infected with HCV genotype 1.¹¹⁻¹³ Specifically, SNP rs12979860, located three kilobases upstream of the *IL28B* gene, is associated with a more than 2-fold difference in the proportion of SVR.¹¹

The aim of this study was to investigate the effect of the *IL28B* gene polymorphism (rs12979860) and other variables predictive of outcome of antiviral therapy in a cohort of HCV genotype 1-infected, PEG-INF treatment-naïve Brazilian patients under PEG-IFN/RBV therapy.

2. Patients and methods

2.1. Patients

A prospective cohort study was carried out between September 2008 and August 2009. The patients received free antiviral treatment at the Center for Injectable Drug Administration and Monitoring (*Centro de Aplicação e Monitorização de Medicamentos Injetáveis*, CAMMI) in Porto Alegre, RS. To receive free treatment, the patients had to fulfill the conditions of the Brazilian Ministry of Health¹⁴ i.e., (i) positive HCV RNA assays, (ii) elevated transaminase levels (alanine aminotransferase [ALT] and aspartate aminotransferase [AST] at least 1.5 times the upper limit on at least three separate measurements), (iii) recent liver biopsy showing septal fibrosis (METAVIR score of F2 or greater), (iv) age between 18 and 70 years, and (v) platelet count > 75,000/mm³ (patients with cirrhosis) or > 90,000/mm³ (without cirrhosis), and neutrophil granulocyte counts > 1,500/mm³. Treatment could begin only after determination of the genotype and calculation of the viral load. A few patients failed to exactly fulfill these conditions but accessed free treatment subsequent to judicial decisions. To be enrolled in the study, patients had to be infected with HCV genotype 1 and be naïve to PEG-IFN therapy. Overall, 299 patients received the standard dose of PEG-IFN 2a or 2b (180 µg or 1.5 µg/kg, respectively) plus ribavirin (1,250 mg/day for body weight > 75 kg or 1,000 mg/day for body weight ≤ 75 kg). The normal duration of antiviral therapy was 48 weeks. However, treatment was interrupted after 12 weeks for non-responders (see below). Furthermore, analysis of data was not possible for 36 subjects because of death or interruption of treatment due to severe side effects or other reasons. Therefore, the results from 263 patients were analyzed. Demographic, biochemical and histological data were collected from the patients' clinical charts.

Written informed consent was obtained from each patient. The study protocol was conducted in accordance with the provisions of the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki, and it was approved by the Research Ethics Committee of the Public Health School of Rio Grande do Sul, Brazil.

2.2. SNP analysis

The three possible *IL28B* genotypes (SNP rs12979860) are CC, CT and TT. SNP genotyping was performed by direct sequencing after PCR amplification. PCR oligonucleotide primer sequences, designed using the NCBI DNA database, were 5'-CGGAGGATCCCTCCTGGGGC-3'(sense) and 5'-TTCCCACCACGAGACCCCG-3' (antisense). The PCR amplification mixture contained 5 µL of genomic DNA extracted from blood, 20 pmol of each oligonucleotide, 200 mM of deoxyribonucleoside triphosphates, 2 mM MgSO₄, 1 x high-fidelity PCR buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA), and 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) in a total reaction volume of 50 µL. Cycling parameters were: one cycle of denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 65°C for 30 s, and extension at 72°C for 45 s. The final extension step was followed by a 7-min incubation at 72°C. The resulting 366-nt PCR product was sequenced in both directions using PCR primers, a Big Dye v1.1 kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) and a 3130XL DNA sequencing system (Applied Biosystems). The electropherogram was visualized by using the Lasergene (DNASTar, Madison, WI) software.

2.3. Laboratory and histological tests

Null virological response (NVR) was defined as < 2 log IU/mL reduction in HCV RNA at 12 weeks of treatment or detectable HCV RNA by conventional PCR at the end of the course of therapy. In the first case, treatment was interrupted. Complete early virological response (cEVR) was defined as undetectable HCV RNA at week 12. Partial early virological response (pEVR) was defined by an HCV RNA decline greater than 2 log IU/mL at week 12. End-of-treatment response (EOTR) was defined as the absence of detectable HCV RNA at the end of the course of treatment, and SVR was defined as undetectable HCV RNA 24 weeks after the completion of therapy, i.e., 72 weeks after the initiation of treatment. Finally, relapse was defined by detectable HCV RNA levels during follow-up evaluation of patients who had achieved EOTR.

The stage of liver fibrosis was scored according to the METAVIR scoring system (F0 –F4) and coded as a three-level variable (F0–F2, mild/moderate; F3–F4, severe; Cirrhosis) for analysis. Serum HCV RNA quantitation results were classified as low (< 600,000 IU/mL) or high (\geq 600,000 IU/mL) viral load for analysis.

2.4. Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. Both deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and comparisons between groups were assessed by Chi-squared tests or, when appropriate, by Fisher's exact test, using GraphPad InStat software version 2.04a (GraphPad Software, San Diego, CA). Univariate logistic regression analyses were used to determine the predictors of treatment success. Age, gender, stage of liver fibrosis and viral load were included into a multivariate logistic regression model to estimate adjusted odds ratios and 95% confidence intervals. *P* values less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. SPSS software v.16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for these analyses.

3. Results

3.1. Demographic, biochemical, virological and histological data and response to treatment

Patients were asked about possible modes of HCV infection. Blood transfusion (27.5%), use of illicit drugs (13.1%), surgery (13.1%) and combinations of some of these factors (10.3%) were the most frequently cited routes. Tattoos, sexual transmission and other modes of transmission were also reported. HCV-HIV co-infection was mentioned in the clinical records of 57 patients. Analysis of PEG-IFN/RBV treatment response according to patients' baseline characteristics is shown in Table 1.

Table 1

Baseline characteristics of genotype 1 chronic hepatitis C patients treated with PEG-IFN/RBV and rate of sustained virological response.

Variable	All (n = 263)	Non-SVR (n = 149)	SVR (n = 114)	<i>P</i>
Age (years, mean ± S.D.)	50.4 ± 10.7	50.8 ± 10.1	48.9 ± 11.5	0.435
Sex, male (%)	152 (58.6)	92 (61.7)	62 (54.4)	0.257
ALT level (IU/L, mean ± S.D.)	96.3 ± 71.9	97.2 ± 70.8	95.2 ± 73.5	0.827
Viral load (%)				0.001
< 600,000 IU/mL	56 (21.8)	20 (13.8)	36 (32.1)	
≥ 600,000 IU/mL	201 (78.2)	125 (86.2)	76 (67.9)	
METAVIR fibrosis stage (%)				
F0–F2	146 (60.1)	80 (58.0)	66 (62.9)	0.509 (F0-F2 vs. F3-F4)
F3–F4	97 (39.9)	58 (42.0)	39 (37.1)	
Cirrhosis	41 (16.9)	28 (20.3)	13 (12.4)	0.121 (cirrhosis vs. others)

SVR, sustained virological response; ALT, alanine aminotransferase; METAVIR scoring: F0–F2, mild/moderate; F3–F4, severe and Cirrhosis.

Overall, 114/263 (43.3%) patients experienced SVR and 149 (56.7%) did not. The mean age of the patients was 50.4 years, and 152/263 (58.6%) were male. No significant differences were observed with respect to gender, age or ALT levels between the SVR and non-SVR groups, although the mean age of the SVR patients was slightly lower. As expected, responders to PEG-IFN/RBV treatment

had a significantly lower viral load ($p = 0.001$). As for stage of liver fibrosis, no statistical differences were found between the two groups coded as F0–F2 (mild/moderate) and F3–F4 (severe).

3.2. *IL28B* genotype prevalence and baseline viral loads

The frequencies of the various *IL28B* genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium and the frequency of the C allele was 39%. *IL28B* genotypes were found to be CC, CT and TT in 38 (14.4%), 128 (48.7%) and 97 (36.9%) patients, respectively. Patients with the *IL28B* CC genotype had a slightly lower mean viral load at baseline compared to patients with a T allele (6.20 ± 0.99 , 6.39 ± 0.74 , and 6.27 ± 0.74 log IU/mL for patients with CC, CT and TT genotypes, respectively). However, when viral load was categorized according to the threshold of 600,000 IU/mL, the proportion of patients with low baseline viral load did not differ depending on *IL28B* genotype (not shown).

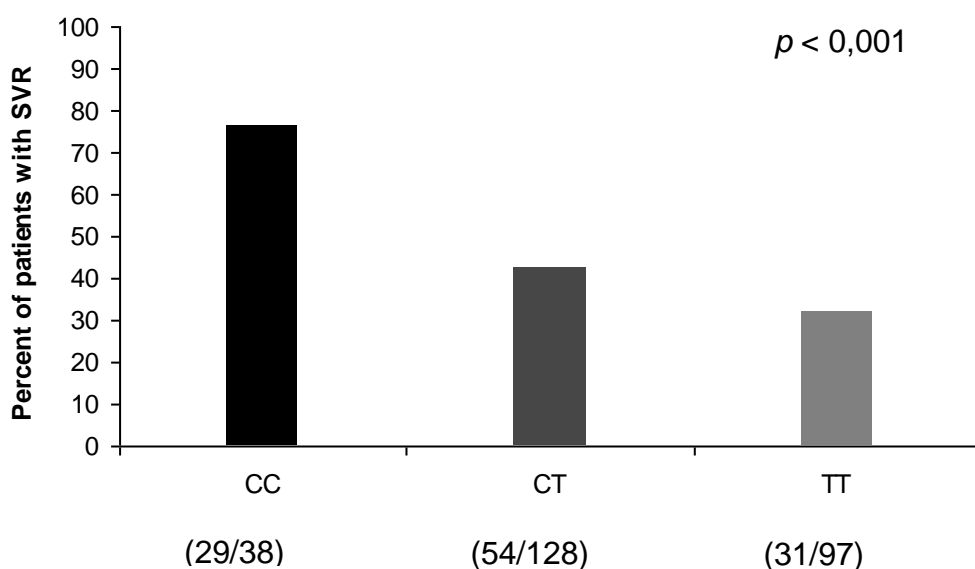


Figure 1. Association of *IL28B* genotype with SVR in HCV genotype 1 patients receiving PEG-IFN/RBV treatment. For each genotype, the proportion of patients with SVR out of the total number of patients is shown.

3.3. Association between *IL28B* genotype and PEG-IFN/RBV response

Figure 1 demonstrates that the C allele was significantly associated with SVR with PEG-IFN/RBV, particularly when two copies of the C allele (genotype CC) were present, with an odds ratio of 5.31 when compared to non-CC (CT and TT) genotypes (95% confidence interval, 2.29–13.30; $p < 0.001$).

Table 2

Rates of virological response and *IL28B* genotypes.

Treatment response	Overall	CC	CT	TT	CCvs.CT <i>p</i> -value	CCvs.TT <i>p</i> -value	CTvs.TT <i>p</i> -value
cEVR – week 12	158/269 (59%)	32/38 (84%)	76/132 (58%)	58/99 (59%)	0.002	0.005	0.894
pEVR – week 12	58/269 (21%)	5/38 (13%)	30/132 (23%)	25/99 (25%)	0.257	0.167	0.755
EOTR – week 48	175/270 (65%)	36/39 (92%)	83/130 (64%)	64/101 (63%)	0.001	0.001	1.000
Relapse	64/178 (35%)	6/35 (17%)	28/82 (34%)	30/61 (49%)	0.077	0.002	0.086
SVR – week 72	114/263 (43%)	29/38 (76%)	54/128 (42%)	31/97 (32%)	< 0.001	< 0.001	0.128

Table 2 shows that the overall rates of cEVR and pEVR (measured at week 12) were 59% and 21%, respectively (total 80%). One hundred seventy-five out of 270 (65%) patients reached EOTR after 48 weeks of treatment. However, among subjects who initially achieved SVR with PEG-IFN/RBV therapy, 64 (35%) relapsed.

Among patients with the CC genotype, 84% achieved cEVR, and 13% achieved pEVR. Thus, only one (3%) patient did not achieve a 2-log reduction in

viral load at 12 weeks of treatment. Greater than 90% of patients showed virological response at the end of the treatment period (EOTR), and 76% achieved SVR.

The *IL28B* CC genotype was associated with higher treatment response rates at all time points (12, 48 and 72 weeks). Moreover, when compared to all other patients, rates of cEVR, EOTR and SVR were significantly higher for carriers of the CC genotype (all *p*-values ≤ 0.005). Furthermore, relapse occurred with a lower frequency among CC patients. Statistically significant differences were not observed between T heterozygotes and homozygotes. However, the rate of SVR was higher among CT patients (42%) than among TT subjects (32%) and the relapse rate was lower (34% vs. 49%).

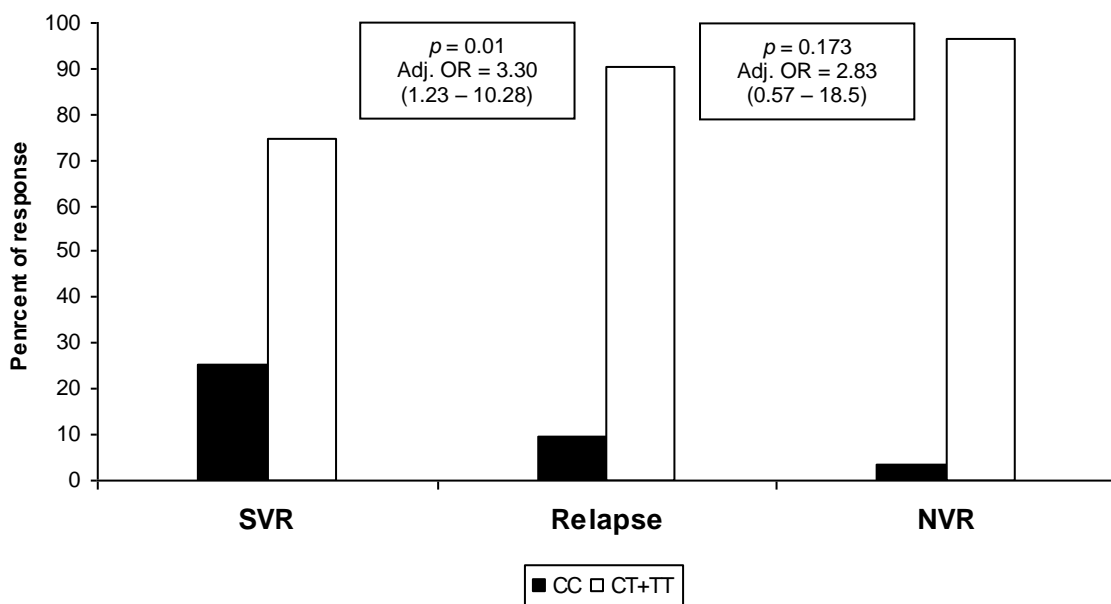


Figure 2. Association between *IL28B* genotype and three-level treatment outcome in chronic HCV patients. The rates of null virological response (NVR), relapse and sustained virological response (SVR) are shown. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals are for *IL28B* CC vs. CT/TT genotypes, comparing SVR patients to relapsers and relapsers to NVR patients. The *p* value shown is for the effect of the *IL28B* CC genotype in a univariate logistic regression analysis.

Figure 2 shows the proportion of CC and non-CC genotypes among patients who reached SVR, relapsers and non-responders. The frequency of the

IL28B CC genotype in the relapse group was between the frequencies observed for the SVR and NVR groups. Statistically significant differences with univariate analysis were found between patients who reached SVR and relapsers ($p = 0.01$; OR= 3.3, CI = 1.23-10.28) but not between relapsers and end-of-treatment non-responders, suggesting that the *IL28B* CC genotype influenced SVR but could not be used to accurately distinguish patients who would relapse from those with NVR ($p = 0.173$; OR = 2.83, CI = 0.57-18.05). After adjustment for age, gender, stage of liver fibrosis and viral load with multivariate analysis, the difference remained statistically significant (Table 3).

Table 3

Association between *IL28B* genotype and three-level treatment outcome with multivariate analysis adjusted for age, gender, viral load and stage of liver fibrosis.

Variable	OR	95% CI	p-value
SVR x RELAPSE			
Age (years)	0.974	0.938-1.010	0.155
Sex, male	1.976	0.928-4.210	0.077
Viral load < 600,000 IU/mL	0.291	0.115-0.735	0.009
Fibrosis	1.343	0.620-2.905	0.454
<i>IL28B</i> CC genotype	3.981	1.381-11.480	0.011
RELAPSE x NVR			
Age (years)	1.031	0.99-1.073	0.137
Sex, male	0.842	0.385-1.840	0.666
Viral load < 600,000 IU/mL	1.243	0.431-3.586	0.687
Fibrosis	0.354	0.168-0.748	0.007
<i>IL28B</i> CC genotype	2.531	0.531-12.062	0.244

4. Discussion

Chronic hepatitis C has been recognized as a progressive fibrotic liver disease. However, little is known about the molecular and cellular mechanisms responsible for inter-individual heterogeneity in the virological response to PEG-IFN/RBV treatment in patients infected with HCV genotype 1. A better understanding of these mechanisms may facilitate treatment strategies and delay disease progression, especially for patients who fail to achieve SVR after undergoing current standard therapy.

IL28B gene encodes a protein also known as IFN lambda 3 that is thought to suppress the replication of various viruses, including HCV.^{15,16} A polymorphism near the *IL28B* gene on chromosome 19, rs12979860, has recently been described as a determining factor in the response to treatment, with the CC genotype carrying a more favorable prognosis than the CT and TT genotypes. The frequency of the C allele at that genome position may vary depending on geographical region and ethnic group.¹⁷ The Brazilian genetic structure is considered to be quite complex and is one of the most heterogeneous in the world due to the ethnic admixture of people classified in European-derived, African-derived, Brazilian Mulattos and Asian-derived according to their ethnicity.¹⁸ In this study, the first to investigate a large number of Brazilian patients, the frequency of the C allele, assessed in a cohort of 263 patients with liver fibrosis due to infection with HCV genotype 1, was 39%, a number lower than those reported from Europe, Asia and Oceania, and similar to those observed in Africa.^{17,19} This finding may be due to the large proportion of African descendants in the Brazilian population.

The present study confirmed that *IL28B* polymorphism is a good predictor of SVR, independent of other factors. Indeed, SNP rs12979860 was strongly associated with response to standard-of-care PEG-IFN/RBV therapy, as demonstrated by higher virological response rates at weeks 12, 48 and 72, and lower rates of post-treatment relapse. The findings of the present work are consistent with previous reports demonstrating that PEG-IFN/RBV therapy is more effective in blocking the production of HCV in patients with the *IL28B* CC genotype and showing that patients with the CC genotype had increased the rate of viral

decline than those with the CT or TT genotypes, with higher rates of SVR.²⁰⁻²² Here, the SVR rate was 76% for patients with the CC genotype and 38% for those with the CT or TT genotypes. Even so, the SVR rate for non-CC patients was higher than the rates reported for Caucasian (23%), African-American (9%)⁹ and European (28%) patients.²³

These findings, together with the results of GWAS studies¹¹⁻¹³, may provide, in the near future, a rationale for the development of prognostic tests and customized IFN-based therapies for chronic hepatitis C. Well-adapted therapies should be based on baseline characteristics of the patient and a response-guided approach. The presence of the *IL28B* CC genotype should indicate a high probability of achieving SVR. In contrast, patients with non-CC genotypes, those with other predictors of poor response, such as advanced fibrosis or high viral load, would be unlikely to achieve SVR. Results obtained by us and others may be used to implement PEG-IFN/RBV treatment regimen or to wait for more effective therapeutic protocols such as those currently in development that are based on HCV protease and polymerase inhibitors.^{24,25}

In conclusion, *IL28B* genotype appears to be, based on current knowledge, the strongest predictor of SVR with PEG-IFN plus RBV therapy in treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1. Recent important genetic findings related to antiviral response in patients with chronic hepatitis C suggest that customized therapy is likely to be implemented in the near future. Further clinical trials are needed to determine whether HCV genotype 1-infected patients with the favorable *IL28B* CC genotype could be treated for a shorter duration with equal clinical benefit, which would reduce the cost of long-term treatment as well as the burden of associated adverse effects.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde and Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – Edital 06/2010). The authors would like to thank Nilo Ykuta and Viviane Oliveira for their help in collecting data and samples. We also thank the CAMMI staff for their kind secretarial support.

Conflict of interest: The authors who took part in this study declare that they do not have anything to disclose regarding funding or conflicts of interest with respect to this manuscript.

References

1. World Health Organization (WHO). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed June, 2011.
2. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007;**13**: 2461–66.
3. Manzia TM, Di Paolo D, Sforza D, Toti L, Angélico R, Brega A, et al. Liver transplantation for hepatitis B and C virus-related cirrhosis: mid-term results. *Transplant Proc* 2010;**42**:1200–03.
4. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, et al. Peginterferon alpha-2b plus ribavirin compared with interferon alpha-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *Lancet* 2001;**358**:958–65.
5. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, et al. Peginterferon alpha-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002;**347**:975–82.
6. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005;**38**:41–9.
7. Silva CMD, Costi C, Krug LP, Ramos AB, Grandi T, Gandolfi VL, et al. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;**102**:867–70.
8. McHutchison JG, Lawitz EJ, Shiffman ML, Muir AJ, Galler GW, McCone J, et al. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *N Engl J Med* 2009;**361**:580–93.
9. McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, et al. Replicated association between an *IL28B* gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin. *Gastroenterology* 2010;**138**:2307–14.
10. Mangia A. *IL28B*: A new wager in the skyline of hepatitis C virus infection. *Dig Liver Dis.* 2011;**43**:177–9.

11. Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009;**461**:399–401.
12. Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML et al. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat Genet* 2009;**41**:1100–4.
13. Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat Genet* 2009;**41**:1105–9.
14. Sander GB, Kuchenbecker RS, Amaral KM, Krug BC. Hepatite viral crônica C. In: Beltrame A, editor. *Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas – medicamentos excepcionais*. Porto Alegre: Gráfica Pallotti; 2002. p. 431–54.
15. Robek MD, Boyd BS, Chisari FV. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005;**79**:3851–4.
16. Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, et al. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* 2006;**131**:1887–98.
17. Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009;**461**:798–801.
18. Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (IBGE), *BRASIL 500 Anos de Povoamento*, IBGE, Rio de Janeiro, 2000.
19. Lin CY, Chen JY, Lin TN, Jeng WJ, Huang CH, Huang CW, et al. *IL28B* SNP rs12979860 is a critical predictor for on-treatment and sustained virologic response in patients with hepatitis C virus genotype-1 infection. *PLoS One* 2011;**6**:e18322.
20. Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, et al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology* 2010;**139**:120–9.

21. Lindh M, Lagging M, Arnholm B, Eilard A, Nilsson S, Norkrans G, et al. *IL28B* polymorphisms determine early viral kinetics and treatment outcome in patients receiving peginterferon/ribavirin for chronic hepatitis C genotype 1. *J Viral Hepat* 2011;**18**: 325–31.
22. Stattermayer AF, Stauber R, Hofer H, Rutter K, Beinhardt S, Scherzer TM, et al. Impact of *IL28B* genotype on the early and sustained virologic response in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;**9**:344–50.
23. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology* 2010;**138**:1338–45.
24. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, Di Bisceglie AM, Reddy KR, Bzowej NH, et al. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus. *N Engl J Med* 2011;**364**:2405–16.
25. Poordad F, McCone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, et al. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *N Engl J Med* 2011;**364**:1195–1206.

Capítulo 3

Polimorfismos no promotor do fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) são preditores de ausência de resposta virológica na terapia da infecção crônica pelo vírus da hepatite C entre pacientes brasileiros

CAPÍTULO 3. Polimorfismos no promotor do fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) são preditores de ausência de resposta virológica na terapia para infecção crônica pelo vírus da hepatite C entre pacientes brasileiros

Autores: Tarciana Grandi, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Karine Medeiros Amaral, Paulo Dornelles Picon, Cintia Costi, Nicole Nascimento da Fré, Marilu Fiegenbaum, Christian Niel e Maria Lucia Rosa Rossetti

Artigo submetido à publicação no periódico *BMC Medical Genetics*.

Objetivo: Fatores genéticos têm sido associados com a história natural da infecção por vírus da hepatite C (HCV). Este estudo examinou se os polimorfismos nos genes da interleucina 10 (*IL10*), proteína de resistência ao Myxovirus 1 (*MxA*) e fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) poderia prever a probabilidade de resposta sustentada a terapia antiviral em pacientes com infecção crônica pelo genótipo 1 do HCV.

Métodos: A relação entre os polimorfismos de base única (SNPs) *IL10* -1082 A/G, *MxA* -123 C/A, *MxA* -88 G/T, *TNF* -308 G/A e *TNF* -238 G/A com o resultado da terapia antiviral (combinação interferon peguilado [PEG-IFN] alfa e ribavirina [RBV] para hepatite C crônica, foi estudada em 114 pacientes que tiveram uma resposta virológica sustentada (SVR) e em 149 não respondedores (NR).

Resultados: Ser portador do alelo A em um ou em ambos os polimorfismos do gene *TNF α* foi significativamente associado com ausência de resposta virológica (51.3% vs. 24.0% na posição -308 e 62.1% vs. 23.9% na posição -238, $P < 0.001$). A análise de regressão logística múltipla dos diplótipos do gene *TNF α* mostrou que indivíduos com duas ou mais cópias do alelo A apresentaram aumento significativo do risco de ter ausência de resposta virológica ($P < 0.001$; OR 16.43; CI 5.70-47.34) e de ter recidiva ($P = 0.001$; OR 6.71; CI 2.18-20.66). Não houve associação para os outros SNPs estudados.

Conclusão: Os dados reportados destacam que os polimorfismos do promotor do gene *TNF α* estão associados à resposta ao tratamento com PEG-IFN/RBV e

podem ser utilizados como uma ferramenta de utilidade clínica para discriminar os pacientes que iniciam tratamento para hepatite C.

Keywords: *TNF α* ; polimorfismos; HCV; resposta virológica

Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms as predictors of null virological response in therapy for chronic hepatitis C virus infection among Brazilian patients

Tarciana Grandi ^{1, 2}, Cláudia Maria Dornelles da Silva ^{1, 3, 4}, Karine Medeiros Amaral ⁵, Paulo Dornelles Picon ⁵, Cintia Costi ¹, Nicole Nascimento da Fré ¹, Marilu Fiegenbaum ^{6,7,8}, Christian Niel ⁹ and Maria Lucia Rosa Rossetti ^{1, 2, 4, *}

¹ *Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre,* ² *Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre,* ³ *Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas,* ⁴ *Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas,* ⁵ *Centro de Aplicação e Monitorização de Medicamentos Injetáveis (CAMMI), Porto Alegre,* ⁶ *Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA), Porto Alegre,* ⁷ *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde (UFCSPA), Porto Alegre,* ⁸ *Programa de Pós-Graduação em Biociências e Reabilitação, Centro Universitário Metodista, do IPA, Porto Alegre,* ⁹ *Laboratório de Virologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil*

* Correspondence: Dra Maria Lucia Rosa Rossetti, Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT/FEPPS, Av. Ipiranga 5400, 3º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: mrossett@terra.com.br

Aim: Host genetic factors have been reported to influence the natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. This study examined whether polymorphisms in cytokines interleukin 10 (*IL10*), myxovirus resistance protein 1 (*MxA*) and tumor necrosis factor-alpha (*TNFα*) genes would predict the likelihood of a sustained response to antiviral therapy in patients with HCV genotype 1 chronic infection.

Methods: The relationships between single nucleotide polymorphisms (SNPs) *IL10* -1082 A/G, *MxA* -123 C/A, *MxA* -88 G/T, *TNFα* -308 G/A and *TNFα* -238 G/A, and outcome of antiviral therapy (combination of pegylated interferon [PEG-IFN] alfa and ribavirin [RBV]) for chronic HCV infection, were studied in 114 patients who had a sustained virological response and in 149 non responders.

Results: Carrying the A allele at one or both *TNFα* gene polymorphisms was significantly associated with a null virological response to treatment (51.3% vs. 24.0% at position -308 and 62.1% vs. 23.9% at position -238, $P < 0.001$). Multiple logistic regression of *TNFα* diplotypes showed that individuals with two or more copies of the A allele exhibited a more significant increased risk of having a null virological response ($P < 0.001$; OR 16.43; CI 5.70-47.34) and relapsing ($P = 0.001$; OR 6.71; CI 2.18-20.66). No significant association was found for the other SNPs under study.

Conclusion: The reported data highlight that *TNFα* promoter polymorphisms are associated to the response to PEG-IFN/RBV therapy and may be used as a tool of clinical utility to discriminate patients who start hepatitis C treatment.

Keywords: *TNFα*; polymorphisms; HCV; virological response

Background

Infection with hepatitis C virus (HCV) has many clinical outcomes that range from viral elimination to the development of end-stage liver disease and hepatocellular carcinoma. Also patterns of response to interferon-based anti-HCV therapy are different from person to person [1,2].

HCV genotype is the most prominent association with the outcome of therapy since genotype 1 is much less sensitive to treatment than genotypes 2 and 3. HCV clearance, or sustained virological response (SVR), defined as having no detectable HCV RNA six months after stopping pegylated interferon (PEG-IFN) alfa and ribavirin (RBV) treatment, occurs in less than 50% of the patients infected with genotype 1 [3,4].

On the other hand, it is known that inter-individual genome variations contribute considerably to the differences observed in natural susceptibility to specific microorganisms, to the disease outcome once infection is established, and to the therapeutic response when the infectious disease is pharmacologically treated. In particular, several studies have addressed the role of host factors in spontaneous clearance, fibrosis progression and response to combined therapy against HCV infection [5,6].

It has been shown that the development and resolution of an inflammatory process is regulated by a complex interplay among cytokines that have pro- and anti-inflammatory effects. Regulatory mechanisms that control the production of cytokines include genetic polymorphisms in particular promoter regions. Polymorphisms may directly or indirectly modulate the benefits of antiviral therapy, thereby influencing the outcome of the disease [5].

Interleukin 10 (*IL10*) is a cytokine that is important to the immune response to HCV through its downregulation of the Th1 response and suppression of the secretion of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha (*TNF α*) and interferon- γ [1]. Heterogeneity in the promoter region of the *IL10* gene has been reported to have a role in determining the initial and sustained response of chronic hepatitis C to IFN- α therapy [7,8].

Tumor necrosis factor-alpha is a potent pro-inflammatory cytokine and antagonist of *IL10*. The *TNF α* gene promoter polymorphisms at positions -308 and

-238 are the most well-characterized *TNF α* polymorphisms and have been shown to influence *TNF α* expression [9]. *TNF α* promoter polymorphisms have been reported to be associated with the pathogenesis of acute and chronic HCV infection, the persistence of the virus, and the response to IFN- α therapy [1,10].

The human myxovirus resistance protein 1 (MxA) is a key mediator of the interferon-induced antiviral response against a wide range of single-stranded RNA viruses. Polymorphisms in the *MxA* gene promoter have been associated with both spontaneous resolution to hepatitis C infection and a favorable response to hepatitis C treatment [11-13].

The aim of the present study was to determine the relevance of *IL10*, *TNF α* and *MxA* gene promoter polymorphisms to the outcome of HCV infection and response in PEG-IFN treatment-naïve patients in southern Brazil.

Methods

Patients

Patients from this study were recruited from September 2008 to August 2009 at a public center for injectable drug administration and monitoring in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. To receive free anti-HCV treatment, the patients had to fulfill the conditions of the Brazilian Ministry of Health. To be enrolled in the study, patients had to be infected with HCV genotype 1 and naïve for PEG-IFN therapy. Overall, 299 patients received the standard dose of PEG-IFN 2a or 2b (180 μ g or 1.5 μ g/kg, respectively) plus RBV (1,250 or 1,000 mg/day for body weight higher or lower than 75 kg, respectively). The normal duration of antiviral therapy was 48 weeks. However, treatment was interrupted after 12 weeks for non-responders (see below). Data analysis was not possible for 36 subjects because of interruption of treatment due to severe side effects or other reasons. Results from 263 patients were therefore analyzed. Demographic, biochemical and histological data were collected from the patients clinical charts. Written informed consent was obtained from each patient. The study protocol was conducted in accordance with the provisions of the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki, and was

approved by the Research Ethics Committee of the Public Health School of Rio Grande do Sul, Brazil.

Analysis of polymorphisms in the *IL10*, *TNF α* and *MxA* genes

Gene promoter polymorphisms were assessed for *IL10* (position -1082, rs1800896), *TNF α* (positions -308, rs1800629, and -238, rs361525) and *MxA* (positions -123, rs17000900, and -88, rs2071430).

Genomic DNA was extracted from dried blood samples preserved in FTA elute cards (Whatman Bioscience, Cambridge, UK) following the manufacturer's instructions. The polymorphisms were detected by direct sequencing of PCR products (both strands) using the BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Table 1 shows the sequences of the oligonucleotide primers used in the PCR assays.

Follow-up of the patients

HCV load of the patients was used to determine the response to PEG-IFN/RBV therapy. Early virological response was defined as an at least 2-log reduction in viral load at 12 weeks. Continued absence of detectable virus by conventional PCR at 48 weeks of treatment is referred to as end of treatment response (ETR). Sustained virological response (SVR) was assessed 24 weeks after treatment conclusion (week 72). Relapse was defined as having detectable HCV RNA levels during follow-up evaluations in patients who had achieved an ETR. Finally, all other patterns of HCV RNA results were classified as virologic nonresponse (NR) [14].

Stage of liver fibrosis was scored according to the METAVIR scoring system (F0-F4) and coded as a three-level variable (F0-F2, mild/moderate; F3-F4, severe; Cirrhosis) for analysis. Serum HCV RNA levels were classified as low (< 600,000 IU/mL) or high (\geq 600,000 IU/mL) viral load for analysis.

Table 1 The positions, polymorphisms, primer sequences and PCR conditions in *IL10*, *TNF α* and *MxA* genes

Gene	Polymorphisms	Oligonucleotide primers		PCR conditions	Ref.
		Sense	Sequence 5' - 3'		
<i>IL10</i>	-1082 A/G	Sense Antisense	ATCCAAGACAACACTACTAA TAAATATCCTCAAAGTTCC	95°C 5 min; 95°C 40 s, 66°C 1 min, 72°C 30 s (35 x); 72°C 7 min	[31]
<i>TNFα</i>	-308 G/A and -238 G/A	Sense Antisense	CAAACACAGGCCTCAGGACTC AGGGAGCGTCTGCTGGCTG	94°C 5 min; 94°C 30 s, 54°C 45 s, 72°C 30 s (35X); 72°C 7 min	[32]
<i>MxA</i>	-123 C/A and -88 G/T	Sense Antisense	TGAAGACCCCAATTACCAA CTCTCGTTCGCCTCTTTCAC	94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min (40X); 72°C 7 min	[13]

Statistical analysis

Allele frequencies were estimated by gene counting. Both deviation from Hardy-Weinberg equilibrium and allelic distributions between groups were assessed by χ^2 tests or, when appropriate, by Fisher's exact test using the GraphPad InStat software version 2.04a (GraphPad Software, San Diego, CA). Haplotypes and linkage disequilibrium (D) were estimated using the ARLEQUIN software (version 3.1) [15]. D theoretical maximum (D_{max}), and D' (D/D_{max}) values were calculated as described by Lewontin [16]. Univariate logistic regression analyses were used to determine the predictors of treatment success. Age, gender, baseline viral load and cirrhosis and *IL28B* SNP were included in a multivariate logistic regression model to estimate adjusted odds ratios and 95% confidence intervals. Mean adjusted variables were compared among *TNF α* genotypes and haplotypes by ANOVA or Student's t-test. The general linear model was used to test the association of *TNF α* polymorphisms and virological response. A multiple logistic regression analysis was carried out to estimate the odds ratios (OR) with 95%

confidence intervals. The statistical analysis was performed using the SPSS v.16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) statistical package.

Results

Virological response to treatment

Two hundred and sixteen out of 263 (82%) patients showed early virological response, and 178 of them (65%) reached ETR (not shown). During follow-up evaluations, 35% (64/178) of patients who had achieved ETR were classified as relapsers. Table 2 shows the sustained virological response rates after PEG-IFN/RBV therapy according to the characteristics of the patients. The mean age of the patients was 50.4 years, and 152/263 (58.6%) were male. Overall, 114 (43.3%) patients experienced an SVR, and 149 (56.7%) did not. No significant differences were observed with respect to gender, age or alanine aminotransferase (ALT) levels between the SVR and non-SVR groups, although the mean age of the SVR patients was slightly lower. As expected, responders to PEG-IFN/RBV treatment had a significantly lower viral load ($P = 0.001$). The stages of liver fibrosis showed no significant correlation between groups F0-F2 (mild/moderate fibrosis) and F3-F4 (severe). However, when comparing patients with cirrhosis to the others, the first ones had a tendency to be non-responders ($P = 0.121$).

Table 2 Sustained virological response rates after PEG-IFN/RBV therapy according to the characteristics of the patients

Variable	All <i>n</i> = 263	Non-SVR <i>n</i> = 149	SVR <i>n</i> = 114	P value
Age (years, mean ± S.D.)	50.4 ± 10,7	50.8 ± 10,1	48.9 ± 11.5	0.435
Sex, male (%)	152 (58.6)	92 (61.7)	62 (54.4)	0.257
ALT level (IU/L, mean ± S.D.)	96.3 ± 71.9	97.2 ± 70.8	95.2 ± 73.5	0.827
Viral load (%)				
< 600,000 IU/mL	56 (21.8)	20 (13.8)	36 (32.1)	0.001
≥ 600,000 IU/mL	201 (78.2)	125 (86.2)	76 (67.9)	
METAVIR fibrosis stage (%)				
F0-F2	146 (60.1)	80 (58.0)	66 (62.9)	0.509 (F0-F2 vs. F3-F4)
F3-F4	97 (39.9)	58 (42.0)	39 (37.1)	
Cirrhosis	41 (16.9)	28 (20.3)	13 (12.4)	0.121 (cirrhosis vs. others)

SVR, sustained virological response; ALT, alanine aminotransferase; METAVIR scoring: F0-F2, mild/moderate; F3-F4, severe and cirrhosis.

***IL10*, *MxA* and *TNFα* polymorphisms and PEG-IFN/RBV response**

The distribution of genotypes was consistent with the proportions expected under Hardy-Weinberg equilibrium. The associations between polymorphisms and treatment response are shown in Table 3. *IL10* (-1082 A/G promoter) polymorphisms were found to be AA, AG and GG in 132 (44.1%), 120 (40%) and 47 (15.7%) of the patients, respectively. No significant differences were detected in the distribution of the *IL10* genotypes between the treatment response groups, although SVR was more frequent among carriers of the GG genotype (52.3%). As well, analyses of two bi-allelic polymorphisms in the *MxA* gene (-123 C/A promoter and -88 G/T promoter) did not show any significant association between genotype and PEG-IFN/RBV treatment response. Genotypes GG, GA and AA in *TNFα* -308 promoter were found in 199 (69.3%), 79 (27.5%) and 8 (2.7%) patients, respectively. At position -238, the corresponding distribution was 225 (78.4%), 57 (19.0%) and 4 (1.4%), respectively. Therefore, the frequency of the G allele was 83% at position -308 and 89% at position -238. The occurrence of A allele in both *TNFα* gene polymorphisms was significantly associated with a null virological response to therapy with PEG-INF/RBV ($P < 0.001$), with a frequency of SVR higher among patients with GG genotype. The rate of relapse showed little difference between the genotypes. A synergy was observed when combined effect of polymorphisms -308 and -238 was analyzed, with 80.6% of non responders in the presence of two or more copies of the A allele ($P < 0.001$).

Table 3 Genotype frequencies of *IL10*, *MxA* and *TNF α* polymorphisms in patients with SVR, relapsers and non-responders (NR)

Polymorphisms	SVR n (%)	Relapse n (%)	NR n (%)	P value
<i>IL10</i> -1082				
AA	45 (39.5)	35 (30.7)	34 (29.8)	0.247
AG	46 (43.8)	21 (20.0)	38 (36.2)	
GG	23 (52.3)	8 (18.2)	13 (29.5)	
<i>MxA</i> -123				
CC	94 (44.5)	51 (24.2)	66 (31.3)	0.777
CA + AA	20 (39.2)	13 (25.5)	18 (35.3)	
<i>MxA</i> -88				
GG	91 (45.0)	47 (23.3)	64 (31.7)	0.577
GT + TT	23 (37.7)	17 (27.9)	21 (34.4)	
<i>TNFα</i> -308				
GG	91 (49.7)	48 (26.2)	44 (24.0)	<0.001
GA + AA	23 (28.7)	16 (20.0)	41 (51.3)	
<i>TNFα</i> -238				
GG	101 (49.3)	55 (26.8)	49 (23.9)	<0.001
GA + AA	13 (22.4)	9 (15.5)	36 (62.1)	
<i>TNFα</i> -308/-238 diplotypes				
G-G/G-G	81 (52.9)	40 (26.1)	32 (20.9)	<0.001
Diploypes with one risk allele (G-G/G-A or G-G/A-G)	28 (35.4)	23 (29.1)	28 (35.4)	
Diploypes with two or more A alleles *	5 (16.1)	1 (3.2)	25 (80.6)	

* Possible combinations: G-A/A-G or G-A/A-A or A-G/A-A or A-A/A-A.

***TNF* polymorphisms are independent predictors of null virological response**

A logistic regression analysis was performed to estimate if *TNF* genotypes and diplotypes are independent predictors of null virological response or relapsing. Multivariate model was designed with known important covariates as age, gender, baseline viral load and cirrhosis. Besides, *IL28B* SNP (rs 12979870) has received considerable interest for their association with SVR when treating patients of HCV genotype-1 with PEG-IFN/RBV. In a recent study [17], *IL28B* was a strong predictor of SVR. Therefore the polymorphism was also added as a covariate. The adjusted odds ratios for both polymorphisms at positions -308 and -238 and for -308/-238 diplotypes are shown in Table 4, which shows the results obtained 24 weeks after treatment conclusion (72 weeks, SVR versus Relapse) along with those after 48 weeks of therapy (ETR versus NR).

After adjusting for the confounding effects, the results showed that carriers of A allele at positions -308 or -238 exhibited a more significant increased risk of having a null virological response ($P = 0.001$; OR 2.58; CI 1.44-4.63 and $P < 0.001$; OR 7.33; CI 3.59-14.93, respectively) and relapsing ($P = 0.001$; OR 2.87; CI 1.51-5.44 and $P = 0.001$; OR 4.20; CI 1.93-9.10). Analysis with a non-adjusted logistic model also revealed an increased risk in these groups (see footnote of Table 4).

Since the genetic effect on treatment outcomes was associated with the presence of both single polymorphisms, we considered a possible combined effect of *TNF* gene polymorphisms -308 and -238. Diploidy frequencies for all four *TNF* gene polymorphisms were estimated using a maximum likelihood method. Polymorphisms are in linkage disequilibrium ($D' > 0.31$, $P = 0.00002$) and the haplotypes frequencies were: 76.8% for G/G, 7.6% for G/A, 11.8% for A/G and 4.9% for A/A. Haplotype combinations (diplotypes) were assessed in terms of response to PEG-IFN/RBV at the end of treatment (48 weeks) and after the follow-up evaluation in patients who had achieved SVR (72 weeks). Multivariate model showed a synergistic effect of -308/-238 polymorphisms on treatment outcomes. Individuals with two or more copies of the A allele at positions -308 and -238 (G-A/A-G or G-A/A-A or A-G/A-A or A-A/A-A) exhibited a more significant increased

risk of having a null virological response ($P < 0.001$; OR 16.43; CI 5.70-47.34) and relapsing ($P < 0.001$; OR 6.71; CI 2.18-20.66).

Table 4 Logistic regression model adjusted by age, gender, baseline viral load and cirrhosis for association between *TNF α* genotype or haplotype and virological response

	Adjusted OR (CI)	P value
<i>SVR versus Relapse</i>		
<i>TNFα</i> -308		
GA+AA ^a	2.87 (1.51-5.44)	0.001
Age	1.01 (0.99-1.04)	0.208
Sex, male	0.55 (0.30-0.99)	0.047
Viral load \geq 600,000 UI/mL	3.71 (1.86-7.39)	<0.001
Cirrhosis	2.12 (0.94-4.76)	0.069
<i>IL28B</i>	6.29 (2.67-14.82)	<0.001
<i>TNFα</i> -238		
GA+AA ^b	4.20 (1.93-9.10)	<0.001
Age	1.01 (0.98-1.04)	0.259
Sex, male	0.64 (0.35-1.16)	0.146
Viral load \geq 600,000 UI/mL	3.55 (1.78-7.10)	<0.001
Cirrhosis	2.32 (1.02-5.26)	0.043
<i>IL28B</i>	6.75 (2.77-16.42)	<0.001
<i>TNFα</i> -308/-238		
Diploypes with one risk allele (G-G/G-A or G-G/A-G)	2.68 (1.41-5.11)	0.003
Diploypes with two or more A alleles [*]	6.71 (2.18-20.66)	0.001
Age	1.01 (0.98-1.04)	0.235
Sex, male	0.58 (0.31-1.05)	0.075
Viral load \geq 600,000 UI/mL	3.88 (1.92-7.86)	<0.001
Cirrhosis	2.24 (0.97-5.15)	0.056
<i>IL28B</i>	6.53 (2.72-15.68)	<0.001
<i>ETR versus NR</i>		
<i>TNFα</i> -308		
GA+AA ^c	2.58 (1.44-4.63)	0.001
Age	0.99 (0.97-1.02)	0.929
Sex, male	0.74 (0.41-1.34)	0.323

Viral load \geq 600,000 UI/mL	2.59 (1.20-5.60)	0.015
Cirrhosis	2.32 (1.11-4.84)	0.024
<i>IL28B</i>	6.94 (2.01-23.91)	0.002
<i>TNFα</i> -238		
GA+AA ^d	7.33 (3.59-14.93)	<0.001
Age	0.99 (0.96-1.02)	0.636
Sex, male	0.91 (0.49-1.71)	0.788
Viral load \geq 600,000 UI/mL	2.85 (1.26-6.44)	0.012
Cirrhosis	2.84 (1.30-6.17)	0.008
<i>IL28B</i>	9.22 (2.47-34.43)	0.001
<i>TNFα</i> -308/-238		
Diploypes with one risk allele (G-G/G-A or G-G/A-G)	1.88 (0.99-3.56)	0.052
Diploypes with two or more A alleles [*]	16.43 (5.70-47.34)	<0.001
Age	0.99 (0.97-1.02)	0.948
Sex, male	0.75 (0.40-1.41)	0.385
Viral load \geq 600,000 UI/mL	2.79 (1.22-6.36)	0.014
Cirrhosis	2.60 (1.20-5.61)	0.015
<i>IL28B</i>	7.10 (1.98-25.34)	0.003

CI, confidence interval; OR, odds ratio; (a) Non adjusted OR 2.45 (P 0.002); (b) Non adjusted OR 3.36 (P <0.001); (c) Non adjusted OR 2.69 (P <0.001); (d) Non adjusted OR 5.71 (P <0.001); * possible combinations: G-A/A-G or G-A/A-A or A-G/A-A or A-A/A-A.

Discussion

Host immune responses and genetic background have been shown to play crucial roles in HCV infection pathogenesis and interindividual heterogeneity of the disease outcome [18]. Cytokine production varies among individuals, and variations are associated with SNPs located in the coding and promoter regions of cytokine genes [19]. *TNF α* , in particular, has been reported to play a critical role in the host immune response to HCV infection [10,20].

The *TNF α* gene promoter has been shown to contain numerous binding sites for transcriptional factors, suggesting that the presence of a polymorphism might directly influence transcriptional regulation of the *TNF α* gene. However, some studies have shown a significant association, while others did not [10,21-23]. Currently, the G/A genotypes associated with the two *TNF α* promoter

polymorphisms at positions -308 and -238 are the best characterized. Hohler *et al.* [20] reported an association between the A allele of polymorphism G/A at position -238 and chronic hepatitis C, suggesting that this polymorphism may contribute to viral persistence. Dai *et al.* [10] suggested that *TNF α* polymorphism at position -308 may be an independent predictor of treatment failure in patients treated with the combination of IFN-alpha and RBV. However, studies conducted in United States, Ireland and Japan have been unable to identify association between *TNF α* genetic polymorphisms and histological severity or response to antiviral therapy [21-23]. In the present study, a significant association was found between these two polymorphisms and SVR rates after combination therapy with PEG-IFN/RBV. Furthermore, it was found that both serum HCV RNA level and presence of the A allele were independent predictors of SVR in patients infected with HCV genotype 1. The disadvantage of having an A allele became more apparent when diplotype frequencies for all four polymorphism combinations were considered. Carrying two or more copies of the A may be valuable for predicting treatment difficulties. *IL28B* confirm that is a independent predictor of SVR and the polymorphisms studied could be used as a tool of clinical utility to discriminate patients who start hepatitis C treatment.

Polymorphisms in the cytokine *IL10* promoter region have been associated with a beneficial treatment response and, to a lesser extent, with spontaneous resolution of HCV infection [7,24-26]. Here, no significant association was found for *IL10*, although GG genotype at position -1082 was more prevalent among patients who responded to PEG-IFN/RBV therapy (52.3%) than among non-responders (29.5%) and relapsers (18.2%). In a similar manner, previous investigations have reported that GG genotype does influence neither HCV outcome nor response to PEG-IFN/RBV therapy [22,27].

Infection with HCV leads to a rapid type I IFN response within the liver. Antiviral proteins involved in the type I IFN pathway, such as MxA protein, together with pro-inflammatory cytokines have been associated with treatment response in patients with genotype 1 chronic HCV infection [11,12]. Previous studies have reported that *MxA* polymorphisms are important in predicting the IFN response among patients with chronic HCV infection [12,13,28]. In this study the presence of

the polymorphisms, -123 C/A and -88 G/T, in the *MxA* gene promoter, were not correlated with response to PEG-IFN/RBV therapy.

Differences among studies on the relationships between SNPs and IFN response might be due to the human genetic diversity and the type of therapy (monotherapy with IFN alone vs. combination therapy with ribavirin). It is noteworthy that the genetic structure of the Brazilian population is considered as one of the most heterogeneous in the world, due to the ethnic mix of the population resulting of five centuries of massive interethnic crosses between peoples from different continents [29,30]. Skin colour is only one of the many physical characteristics of the individuals. In this manner, to classify patients into black and white subjects would not be so relevant when working with Brazilian populations.

Conclusions

In conclusion, results from this study corroborate that response to PEG-IFN/RBV therapy may be associated, at least in part, with host genetic factors, particularly *TNF α* promoter polymorphisms. Studies on the effects of other genes, either acting alone or not, and on environmental factors, will be necessary to confirm these associations. Further studies will also provide a better understanding of the host immune response to HCV and help in the development of better therapeutic strategies.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS). The authors would like to thank the CAMMI staff members for their kind secretarial support.

Authors' contributions

Identifying the research question, designing the study: TG, CMDS, CN, MLRR. Searched the publications, extracted the data: TG, CMDS. Administrative, technical, or material support: KMA, PDP. Acquisition of data and laboratorial work: TG, NNF, CC. Statistical analysis and interpretation of data: TG, MF. Drafting of the manuscript: TG, CMDS. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: MF, CN, MLRR. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

None of the authors has any potential financial conflict of interest related to this manuscript.

References

- 1 Thio CL: **Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus.** *Clin Liver Dis* 2008, **12**: 713-726.
- 2 Swiatek BJ: **Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection?** *Cytokine Growth Factor Rev* 2012, **23**:47-59.
- 3 Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Gonçalves FL Jr, Häussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J: **Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection.** *N Engl J Med* 2002, **347**: 975-982.
- 4 Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM: **Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose.** *Ann Intern Med* 2004, **140**: 346-355.
- 5 Dogra G, Chakravarti A, Kar P, Chawla YK: **Polymorphism of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon- α therapy response.** *Hum Immunol* 2011, **72**: 935-939.
- 6 Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A, Maraver M: **Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment.** *Liver Int* 2011, **31**: 443-460.

- 7 Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA: **Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection.** *Hepatology* 2001, **33**: 708-712.
- 8 Persico M, Capasso M, Persico E, Masarone M, Renzo A, Spano D, Bruno S, Iolascon A: **Interleukin-10 - 1082 GG polymorphism influences the occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection.** *J Hepatol* 2006, **45**: 779-785.
- 9 Cheong JY, Cho SW, Hwang IL, Yoon SK, Lee JH, Park CS, Lee JE, Hahm KB, Kim JH: Association between chronic hepatitis B virus infection and interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha gene promoter polymorphisms. *J Gastroenterol Hepatol* 2006, **21**: 1163-1169.
- 10 Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY, Hou NJ, Lin ZY, Huang JF, Hsieh MY, Wang LY, Yu ML: **Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection.** *J Infect Dis* 2006, **193**: 98-101.
- 11 Hijikata J, Ohta Y, Mishiro S: **Identification of a single nucleotide polymorphism in the MXA gene promoter (G/T at nt -88) correlated with response of hepatitis C patients interferon.** *Intervirology* 2000, **43**: 124-127.
- 12 Hijikata M, Ohta Y, Mishiro S: **Genetic polymorphism of the MXA gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro.** *Intervirology* 2001, **44**: 379-382.
- 13 Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiaramonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR: **Polymorphisms in interferon induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MXA, OAS-1 and PKR.** *Genes Immun* 2003, **4**: 411-419.
- 14 Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB: **Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C.** *Hepatology* 2004, **39**: 1147-71.
- 15 Schneider S, Roessli D, Excoffier L: **Arlequin: A software for population genetics data analysis.** Genetics and Biometry Lab, University of Geneva, Geneva, 2000.
- 16 Lewontin RC: **On measures of gametic disequilibrium.** *Genetics* 1998, **120**: 849-852.

- 17 Grandi T, Silva CMD, Amaral KM, Picon PD, Costi C, da Fré NN, Fiegenbaum M, Niel C, Rossetti MLR: **Response to treatment of Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated to a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012 (in press).
- 18 Amini M, Poustchi H: **Hepatitis C virus spontaneous clearance: immunology and genetic variance.** *Viral Immunol* 2012, **25**: 241-248.
- 19 Ollier WE: **Cytokine genes and disease susceptibility.** *Cytokine* 2004, **28**: 174-178.
- 20 Hohler T, Kruger A, Gerken G, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C: **Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position-238 is associated with chronic active hepatitis C.** *J Med Virol* 1998, **54**: 173-177.
- 21 Rosen HR, McHutchison JG, Conrad AJ, Lentz JJ, Marousek G, Rose SL, Zaman A, Taylor K, Chou S: **Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C.** *Am J Gastroenterol* 2002, **97**: 714-720.
- 22 Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J: **Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma and outcome of hepatitis C virus infection.** *J Med Virol* 2003, **71**: 212-218.
- 23 Kusumoto K, Uto H, Hayashi K, Takahama Y, Nakao H, Suruki R, Stuver SO, Ido A, Tsubouchi H: **Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan.** *Cytokine* 2006, **34**: 24-31.
- 24 Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN: **Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin.** *J Hepatol* 2002, **36**: 271-277.
- 25 Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AV, Thomas HC, Thursz MR: **Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection.** *Immunogenetics* 2003, **55**: 362-369.
- 26 Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Paziienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A: **IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection.** *Cytokines* 2004, **25**: 103-109.

- 27 Chuang JY, Yang SS, Lu YT, Hsieh YY, Chen CY, Chang SC, Chang CS, Yeh HZ, Kao JH: **IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients.** *Dig Liver Dis* 2009, **41**: 424-430.
- 28 Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H: **Single nucleotide polymorphism of the *MXA* gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection.** *J Viral Hepat* 2004, **11**: 271-276.
- 29 Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF: **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages.** *Am J Hum Genet* 2000, **67**: 444-461.
- 30 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica VA, Suarez-Kurtz G: **The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected.** *PloS One* 2011, **6**: e17063.
- 31 Wu MS, Huang SP, Chang YT, Shun CT, Chang MC, Lin MT, Wang HP, Lin JT: **Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter polymorphisms in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma.** *J Infect Dis* 2002, **185**: 106-109.
- 32 Spriewald BM, Witzke O, Wassmuth R, Wenzel RR, Arnold ML, Philipp T, Kalden JR: **Distinct tumour necrosis factor alpha, interferon gamma, interleukin 10, and cytotoxic T cell antigen 4 gene polymorphisms in disease occurrence and end stage renal disease in Wegener's granulomatosis.** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**: 457-461.

Capítulo 4

Discussão Geral e Perspectivas

Discussão Geral e Perspectivas

A infecção pelo vírus da hepatite C leva a doença crônica do fígado e afeta milhões de indivíduos em todo o mundo. No entanto, embora o tratamento da infecção crônica causada pelo HCV tem sido extensivamente estudado, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e celulares responsáveis pela heterogeneidade interindividual na resposta virológica ao tratamento em pacientes infectados com HCV genótipo 1.

A resistência ao tratamento com PEG-IFN/RBV é superior a 50% em pacientes infectados com HCV genótipo 1 e tem sido atribuída a vários fatores virais e a fatores inerentes ao hospedeiro. A carga viral, o estágio de fibrose e a idade do paciente são fatores que podem influenciar a resposta ao tratamento da hepatite C. Além destes, a etnia tem se mostrado importante na resposta ao tratamento da hepatite C (LISKER-MELMAN & SAYUK, 2007; MCHUTCHISON *et al.*, 2009).

Na população analisada neste estudo, 43% dos pacientes tiveram SVR, um número superior aos pacientes Hispânicos e Latinos com HCV genótipo 1, que são considerados como uma população difícil de tratar, com taxas de SVR variando entre 14 e 34% (YU *et al.*, 2009; FEUERSTADT *et al.*, 2010). Em relação à carga viral pré-tratamento, pacientes respondedores ao tratamento com PEG-IFN/RBV apresentaram carga viral significativamente inferior aos não respondedores. As diferenças nas taxas de resposta ao tratamento sustentam o importante papel da genética do hospedeiro na resposta imune induzida durante a terapia antiviral.

Já está comprovado que a resposta ao tratamento é dependente da atuação do sistema imunológico do hospedeiro e este é geneticamente controlado por diversos genes independentes que atuam de forma coordenada. O equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 é um dos mecanismos críticos para o controle da resposta imune efetora nas doenças infecciosas virais ou não virais (CHEN *et al.*, 2007). Uma série de estudos tem examinado a importância dos polimorfismos em genes envolvidos no controle da infecção por HCV (BARRETT *et al.*, 2003; KNAPP *et al.*, 2003; SUZUKI *et al.*, 2004; DAÍ *et al.*, 2006; GE *et al.*, 2009).

O presente estudo avaliou a possível influência dos polimorfismos na região promotora dos genes da Interleucina-28B, Interleucina-10, Fator de Necrose Tumoral alfa e proteína de resistência ao Myxovirus-1 na resposta à terapia antiviral para o HCV.

O gene *IL28B* codifica a interleucina-28 que apresenta atividade antiviral suprimindo a replicação de vírus como o HCV. O polimorfismo, rs12979860, localizado na proximidade deste gene foi relacionado com resposta ao tratamento.

O conhecimento mais detalhado das variações genéticas humanas relacionadas com diferenças na progressão de doenças permitiu que os estudos de associação genômica ampla (GWAS) apontassem polimorfismos de base única próximos ao gene da *IL28B* como preditores de resposta ao tratamento com PEG-IFN/RBV (GE *et al.*, 2009; SUPPIAH *et al.*, 2009; TANAKA *et al.*, 2009). No estudo de GE e colaboradores (2009), que avaliou 1137 pacientes portadores de HCV genótipo 1 em indivíduos Europeu-Americanos, Africano-Americanos e Hispânicos, o rs12979860 foi fortemente associado com SVR. O alelo T foi associado a uma menor taxa de resposta virológica sustentada (26% nos indivíduos genótipo TT e 79% naqueles com genótipo CC) (GE *et al.*, 2009). Os resultados de GE *et al.* (2009) foram independentemente confirmados por dois outros estudos, desenvolvidos por SUPPIAH *et al.* (2009) e por TANAKA *et al.* (2009), que trabalharam com pacientes infectados por HCV de origem européia, e de origem asiática, respectivamente.

O primeiro estudo deste trabalho (Capítulo 2) confirmou que o polimorfismo, rs 12979860, próximo ao gene *IL28B* é um bom preditor da SVR, independente de outros fatores. Com relação à frequência dos genótipos, observou-se que a distribuição foi diferente entre os desfechos do tratamento. O genótipo CC foi fortemente associado com a resposta à terapia padrão com PEG-IFN/RBV como demonstrado pelo aumento das taxas de resposta virológica nas semanas 12, 48 e 72, além de menores taxas de recidiva pós-tratamento (CC vs CT e TT: 84% vs 58% EVR, 92% vs EOTR 63%, e 76% vs 38% SVR, taxa de recidiva (17% vs 40%).

A frequência do alelo C pode variar dependendo da região geográfica e do grupo étnico estudado. De fato, a observação de que o alelo C é menos frequente

entre os indivíduos de ascendência africana (entre 23.1% e 54.8%) quando comparado aos europeus (entre 52.9% e 85.7%) (THOMAS *et al.*, 2009), poderia explicar, em parte, a frequência do alelo C encontrada em nosso estudo, de 39%. A estrutura genética brasileira é considerada bastante complexa e é uma das mais heterogêneas do mundo, devido à mistura étnica da população e também devido à grande proporção de descendentes Africanos.

O capítulo 3 deste estudo examinou se polimorfismos nos genes da interleucina 10 (*IL10*), proteína de resistência ao Myxovirus 1 (*MxA*) e fator de necrose tumoral alfa (*TNF α*) poderiam prever a probabilidade de resposta virológica à terapia antiviral em pacientes com infecção crônica pelo genótipo 1 do HCV.

Tem sido demonstrado que o desenvolvimento e a resolução de um processo inflamatório é regulado por uma complexa interação entre citocinas que possuem efeitos pró e anti-inflamatórios. O equilíbrio entre estas citocinas pode modular os benefícios da terapia antiviral e influenciar na evolução da doença (DOGRA *et al.*, 2011).

O *TNF α* é uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel crítico na resposta imune do hospedeiro na infecção por HCV (HOHLER *et al.*, 1998; DAI *et al.*, 2006). Na região promotora do gene *TNF α* , nas posições -308 e -238, foram descritas, substituições de guanina (alelo *TNF* -308G) por adenina (alelo *TNF* -308A). O alelo A, menos frequente, tem sido associado com alta produção da citocina *TNF α* . A região promotora do gene *TNF α* contém vários sítios de ligação para fatores de transcrição, sugerindo que a presença de polimorfismos nesta região poderia influenciar diretamente a regulação da transcrição do gene *TNF α* . Os polimorfismos G/A da região promotora do gene *TNF α* , localizados nas posições -308 e -238, são bem caracterizados e alguns estudos tem correlacionado estas variantes genéticas com susceptibilidade à infecção pelo HCV e à resposta ao tratamento com IFN α . No entanto, há dados conflitantes na literatura com relação aos polimorfismos no gene, enquanto alguns estudos mostram associação significativa, outros não a evidenciam (ROSEN *et al.*, 2002; BARRETT *et al.*, 2003; DAI *et al.*, 2006; KUSUMOTO *et al.*, 2006).

HOHLER e colaboradores (1998) relataram uma associação entre esses dois polimorfismos e a susceptibilidade à infecção pelo HCV. No estudo, eles investigaram o papel dos polimorfismos, nas posições -308 e -238, e os resultados mostraram uma associação entre o alelo A, na posição -238, e a hepatite C crônica. Com isso, sugeriram que este polimorfismo pode ser um fator genético do hospedeiro contribuinte para a persistência viral. Algum tempo depois, DAI *et al.* (2006) revelaram que o polimorfismo da região promotora do gene, na posição -308, pode ser associado, pelo menos em parte, com fatores genéticos do hospedeiro, como um preditor independente de falha ao tratamento em pacientes tratados com a combinação de IFN α e RBV.

No presente estudo, que investigou o significado dos polimorfismos dos genes envolvidos na resposta imune da infecção pelo HCV com a resposta virológica à terapia com PEG-IFN/RBV na população brasileira, foi encontrada uma associação significativa dos polimorfismos da região promotora, -308 e -238, do gene *TNF α* . Após o tratamento com PEG-IFN/RBV, o alelo A dos dois polimorfismos estudados do gene *TNF α* foi significativamente associado à ausência de resposta virológica. Além disso, este estudo demonstrou que ambos a carga viral de RNA de HCV e a presença do alelo A foram preditores independentes de SVR em pacientes com infecção por HCV genótipo 1. Neste estudo, a desvantagem de ter o alelo A tornou-se mais evidente quando as frequências dos haplótipos para os dois polimorfismos do gene *TNF α* foram estimadas. A análise de regressão logística múltipla dos haplótipos do *TNF α* apresentou um aumento mais significativo do risco de ausência de resposta virológica e de ter recidiva nos portadores de duas ou mais cópias do alelo A (-308 GA/AA e/ou -238 GA/AA). Os resultados indicam que a resposta ao tratamento com PEG-IFN/RBV pode ser associada, pelo menos em parte, com fatores genéticos do hospedeiro, particularmente, em pacientes que herdaram duas ou mais cópias do alelo A nos polimorfismos analisados do promotor do gene *TNF α* .

Uma das possíveis causas de resistência à terapia está associada com a habilidade das proteínas do HCV em modular a resposta imunológica através de diferentes mecanismos, incluindo alterações na produção da citocina

antiinflamatória *IL10* (MANGIA *et al.*, 2004; ABORSANGAYA *et al.*, 2007). A expressão de *IL10* está associada à presença de polimorfismos no promotor do gene da *IL10* que têm sido associados com a resposta ao tratamento e, mais fracamente, com resolução espontânea do vírus (YEE *et al.*, 2001; VIDIGAL *et al.*, 2002; KNAPP *et al.*, 2003).

Neste estudo, foi analisada a possível influência do polimorfismo (rs1800896, posição -1082) na região promotora do gene da *IL10* na resposta à terapia antiviral para o HCV. Nos pacientes participantes deste estudo, em concordância com os resultados de BARRETT *et al* (2003) e CHUANG *et al.* (2009), não houve influência dos genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) na resposta terapêutica, embora o genótipo GG esteve mais prevalente nos pacientes que responderam à terapia com PEG-IFN/RBV (52,3%) do que naqueles não-respondedores (29,5%) e recidivantes (18,2%). No entanto, também existem estudos que confirmaram a associação do polimorfismo com a depuração viral ou resposta à terapia (YEE *et al.*, 2001; KNAPP *et al.*, 2003; MANGIA *et al.*, 2004).

Na literatura é possível encontrar estudos avaliando a presença dos polimorfismos da região promotora da *IL10* na população brasileira associados a doenças infecciosas. Entretanto, apesar da *IL10* estar envolvida na resposta a infecção crônica pelo HCV, não há estudos avaliando a influência dos polimorfismos da região promotora desse gene na resposta ao tratamento com IFN-PEG/RBV na população de nosso estado, que possivelmente apresenta características genéticas distintas das encontradas em populações européias ou norte-americanas.

A infecção pelo HCV conduz a uma rápida resposta de IFN tipo I, que tem como efeito principal a indução de genes com atividade antiviral. Proteínas antivirais envolvidos na via do IFN tipo I, tais como a proteína MxA, juntamente com citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas com a resposta ao tratamento em pacientes com infecção crônica por HCV genótipo 1 (HIJIKATA *et al.*, 2000; 2001).

Pelo fato do HCV ser um vírus de RNA fita simples e também porque o gene *MxA* tem um promotor que é ativado por IFN, este estudo avaliou se a

presença de dois polimorfismos no promotor do gene *MxA*, nas posições -123 C/A e -88 G/T, são relacionados com a resposta à terapia com PEG-IFN/RBV. O presente estudo não encontrou associações entre a resposta do tratamento e os genótipos do gene *MxA* que foram analisados. No entanto, estudos prévios relataram que os polimorfismos do gene *MxA* são importantes para auxiliar na previsão da resposta à terapia com IFN em pacientes com infecção por HCV. Nos estudos de KNAPP *et al.* (2003) e HIGIKATA *et al.* (2001), os polimorfismos genéticos foram associados à resposta ao tratamento em pacientes portadores de HCV genótipo 1: o genótipo GG (posição -88) e CC (posição -123) da região promotora do gene *MxA* esteve mais frequente nos pacientes não respondedores, respectivamente. Noutro estudo, o polimorfismo da posição -88 (G/T) da região promotora do gene *MxA* foi um fator independente de resposta a terapia, principalmente naqueles pacientes com baixa carga viral, onde a presença do alelo T esteve associada com maior probabilidade de SVR (SUZUKI *et al.*, 2004).

As possíveis razões para as diferenças nos resultados entre os estudos sobre as relações entre estes polimorfismos e a resposta ao tratamento pode ser a existência de diversidade genética humana, além do tipo de terapia fornecido aos pacientes (monoterapia de IFN α ou terapia em combinação com ribavirina, além do uso de PEG-IFN). Estudos adicionais com pacientes de vários grupos étnicos, bem como com pacientes com vários graus de insuficiência hepática, são necessários para confirmar estas associações.

Em função do importante papel biológico dos genes que codificam moléculas imunomoduladoras da resposta imune, incluindo as citocinas e proteínas antivirais, o papel desempenhado por essas moléculas necessita de maiores elucidações e estudos multicêntricos de associação genômica ampla, envolvendo um número maior de indivíduos, poderão contribuir para elucidar a participação desses genes no clareamento viral e na resposta à terapia antiviral na infecção pelo HCV.

Além disso, embora os efeitos dos polimorfismos de genes de citocinas identificados em vários estudos têm provado serem importantes na determinação dos desfechos virais, estudos sobre os efeitos de outros genes, quer isoladamente ou interagindo com outros determinantes genéticos e fatores

ambientais, irão corroborar para confirmar estas associações. Novos estudos também irão fornecer uma melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro para o HCV e auxiliar no desenvolvimento de melhores estratégias terapêuticas.

Com a entrada dos inibidores de proteases, Boceprevir e Telaprevir, no ano de 2011, no Brasil, espera-se uma nova era de tratamento para os pacientes portadores do genótipo 1 do HCV, com taxas de cura significativamente maiores e uma opção de cura para aqueles que não responderam a um tratamento anterior. Novos medicamentos estarão disponíveis nos próximos anos, mas o uso criterioso do Boceprevir e do Telaprevir no tratamento atual é de um valor inestimável para os infectados cronicamente com hepatite C, principalmente pela segurança no controle dos efeitos adversos.

Recentemente, foi publicado na revista “Alimentary Pharmacology and Therapeutics” mais um consenso para auxiliar no tratamento da hepatite C. A descoberta da associação de variantes alélicas próximas ao gene *IL28B* associadas à resposta à terapia em pacientes infectados por HCV trouxe uma série de novas possibilidades de estudo e conduta clínica de pacientes com hepatite C. No caso do Telaprevir, onde o paciente começa a utilizar o medicamento logo na primeira semana, a recomendação é que deveria ser realizada a genotipagem do rs12979860, e caso o paciente obtivesse um resultado de genótipo CC poderia realizar o tratamento somente com interferon peguilado e ribavirina, com o qual teria a mesma possibilidade de cura que se utilizasse o Telaprevir (RAMACHANDRAN *et al.*, 2012).

Os estudos acerca dos polimorfismos genéticos relacionados à resposta ao tratamento da hepatite C são recentes, mas se mostram extremamente promissores no auxílio da condução dos pacientes cronicamente infectados pelo HCV, principalmente no que se refere a uma questão primordial: a opção pelo início do tratamento. Há consenso entre cientistas e médicos de que estudos genéticos poderão ser incorporados, muito em breve, às diretrizes de manejo da infecção crônica pelo HCV, na decisão sobre início do tratamento principalmente frente aos novos medicamentos que vem sendo desenvolvidos e testados.

Os resultados obtidos no presente estudo fornecem evidências na correlação dos polimorfismos genéticos humanos e o impacto significativo sobre a resposta ao tratamento da hepatite C crônica com PEG-IFN/RBV.

Este estudo levantou algumas perspectivas para continuação deste trabalho, principalmente em relação ao gene *IL28B* e a resposta ao tratamento. Serão analisados outros SNPs, tais como rs8099917 do gene *IL28B* e rs1127354 do gene *ITPA*, que tem sido associado ao uso de Ribavirina e o aparecimento de anemia, um dos eventos adversos de maior intensidade nos pacientes em tratamento com IFN-PEG/RBV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, A. & BENVENIGNU, L. Management of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 38:104-118, 2003.

ALTER, M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal Gastroenterology*, 13: 2436-2441, 2007.

ANTONELLI, G.; SIMEONI, E.; TURRIZIANI, O.; TESORO, R.; REDAELLI, A.; ROFFI, L.; ANTONELLI, L.; PISTELLO, M. & DIANZANI, F. Correlation of interferon-induced expression of *MxA* mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the response of patients with chronic active hepatitis C patient to IFN-alpha therapy. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 19: 243-251, 1999.

ANZOLA, M. & BURGOS, J. J. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5: 1-16, 2003.

ARONSON, J.K. Meyler's side effects of drugs. *Elsevier Science*, 14: 1912, 2000.

BARRETT, S.; COLLINS, M.; KENNY, C.; RYAN, E.; KEANE, C.O. & CROWE, J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma and outcome of hepatitis C virus infection. *Journal of Medical Virology*, 71: 212-218, 2003.

BERTOLETTI, A. & FERRARI, C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Journal of Hepatology*, 38: 4-13, 2003.

BERTOLOTTO, A.; GILLI F.; SALA, A.; AUDANO, L.; CASTELLO, A.; MAGLIOLA, U.; MELIS, F. & GIORDANA, M.T. Evaluation of bioavailability of three types of IFNbeta in multiple sclerosis patients by a new quantitative competitive-PCR method for *MxA* quantification. *Journal of Immunological Methods*, 256: 141-152, 2001.

BOSTAN, N. & MAHMOOD, T. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Critical Reviews in Microbiology*, 36: 91-133, 2010.

BURGNER, D.; JAMIESON, S.E. & BLACKWELL, J.M. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? *Lancet Infectious Diseases*, 6(10): 653-663, 2006.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L.M.; COELHO, H.S.; SILVA, A.O.; FONSECA, J.C.; ROSA, H.; LACET, C.M. & BERNARDINI, A.P. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38: 41-48, 2005.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N. & WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72: 3666-3670, 1975.

CARUNTU, F.A. & BENEÀ, L. Acute hepatitis C virus infection: diagnosis, pathogenesis, treatment. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 15: 249-256, 2006.

CHAMBERS, T.J.; FAN, X.; DROLL, D.A.; HEMBRADOR, E.; SLATER, T.; NICKELLS, M.W.; DUSTIN, L.B. & DIBISCEGLIE, A.M. Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, 79: 3071-3083, 2005.

CHEN, T.Y.; HSIEH, Y.S.; WU, T.T.; YANG, S.F.; WU, C.J.; TSAY, G.J. & CHIOU, H.L. Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection. *Translation Research*, 150: 116-121, 2007.

CHOO, Q.L.; KUO, G. & WEINER, A.J. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244: 359-362, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C.; GALLEGOS, C.; COIT, D.; MEDINA-SELBY, R.; BARR, P.J. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88: 2451-2455, 1991.

CLEMENTI, M. & DI GIANANTONIO, E. Genetic susceptibility to infectious diseases. *Reproductive Toxicology*, 21: 345-349, 2006.

COLIN, C.; LANOIR, D.; TOUZET, S.; MEYAUD-KRAEMER, L.; BAILLY, F. & TREPO, C. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *Journal of Viral Hepatitis*, 8: 87-95, 2001.

CZEPIEL, J.; BIESIADA, G. & MACH, T. Viral hepatitis C. *Polskie Archiwum Medycyny Wewndtrzonej*, 118: 734-740, 2008.

DAI, C.Y.; CHUANG, W.L.; CHANG, W.Y.; CHEN, S.C.; LEE, L.P.; HSIEH, M.Y.; HOU, N.J.; LIN, Z.Y.; HUANG, J.F.; HSIEH, M.Y.; WANG, L.Y. & YU, M.L. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism at position -308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Diseases*, 193: 98-101, 2006.

DOGRA G., CHAKRAVARTI A., KAR P., CHAWLA Y.K. Polymorphism of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon- α therapy response. *Human Immunology*, 72: 935-9, 2011.

DUARTE, E.A.; NOVELLA, I.S.; WEAVER, S.C.; DOMINGO, E.; WAIN, H.S.; CLARKE, D.K.; MOYA, A.; ELENA, F.S.; TORRE, J.C. & HOLLAND, J.J. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. *Infectious Agents and Disease*, 3: 201-214, 1994.

EASL - European Association for Study of Liver - International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus Statement. *Journal of Hepatology*, 30: 956-961, 1999.

ESKDALE, J.; KEIJSERS, V.; HUIZINGA, T. & GALLAGHER, G. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes and Immunity*, 1(2): 151-155, 1999.

FEUERSTADT, P.; BUNIM, A.L.; GARCIA, H.; KARLITZ, J.J.; MASSOUMI, H.; THOSANI, A.J.; PELLECCCHIA, A.; WOLKOFF, A.W.; GAGLIO, P.J. & REINUS, J.F. Effectiveness of hepatitis C treatment with pegylated interferon and ribavirin in urban minority patients. *Hepatology*, 51: 1137-1143, 2010.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W. & MOSSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cells. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 170: 2081-2095, 1989.

FLAJNIK, M.F. & DU PASQUIER, L. Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in Immunology*, 25: 640-644, 2004.

GALE, M. Jr. & FOY, E.M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, 436(7053): 939-945, 2005.

GE, D.; FELLAY, J.; THOMPSON, A.J.; SIMON, J.S.; SHIANN, K.V.; URBAN, T.J.; HEINZEN, E.L.; QIU, P.; BERTELSEN, A.H.; MUIR, A.J.; SULKOWSKI, M.; MCHUTCHISON, J.G. & GOLDSTEIN, D.B. Genetic variation in *IL28B* predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, 461: 399-401, 2009.

GHANY, M.G.; STRADER, D.B.; THOMAS, D.L. & SEEFF, L.B. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Journal of Hepatology*, 49: 1335-1374, 2009.

GHAVAMI, S.; HASHEMI, M.; KADKHODA, K.; ALAVIAN, S.M.; BAY, G.H. & LOS, M. Apoptosis in liver diseases - detection and therapeutic applications. *Medical Science Monitor*, 11(11): 337-345, 2005.

GOODMAN, Z.D.; STODDARD, A.M.; BONKOVSKY, H.L.; FONTANA, R.J.; GHANY, M.G.; MORGAN, T.R.; WRIGHT, E.C.; BRUNT, E.M.; KLEINER, D.E.; SHIFFMAN, M.L.; EVERSON, G.T.; LINDSAY, K.L.; DIENSTAG, J.L.; MORISHIMA, C. & HALT-C Trial Group. Fibrosis progression in chronic hepatitis C: morphometric image analysis in the HALT-C trial. *Journal of Hepatology*, 50(6): 1738-1749, 2009.

HADZIYANNIS, S.J.; SETTE, H.JR.; MORGAN, T.R.; BALAN, V.; DIAGO, M.; MARCELLIN, P.; RAMADORI, G.; BODENHEIMER, H.JR.; BERNSTEIN, D.; RIZZETTO, M.; ZEUZEM, S.; POCKROS, P.J.; LIN, A. & ACKRILL, A.M. Peginterferon- α_{2a} and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine*, 140: 346-355, 2004.

HALLER, O. & KOCHS, G. Human *MxA* protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 31: 79-87, 2011.

HIJIKATA, J.; OHTA, Y. & MISHIRO, S. Genetic polymorphism of the *MxA* gene promoter and interferon responsiveness of hepatitis C patients revisited by analyzing two SNP sites (-123 and -88) in vivo and in vitro. *Intervirology*, 44: 379-82, 2001.

HIJIKATA, J.; OHTA, Y. & MISHIRO, S. Identification of a single nucleotide polymorphism in the *MxA* gene promoter (G/T at nt -88) correlated with response of hepatitis C patients interferon. *Intervirology*, 43: 124-127, 2000.

HILL, A.V. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2: 373-400, 2001.

HOFER, H.; NEUFELD, J.B.; OESTERREICHER, C.; GRUNDTNER, P.; WRBA, F.; GANGL, A.; FERENCI, P. & GASCHÉ, C. Bi-allelic presence of the interleukin-10 receptor 1 G330R allele is associated with cirrhosis in chronic HCV-1 infection. *Genes and Immunity*, 6: 242-247, 2005.

JACOBSON, I.M.; MCHUTCHISON, J.G.; DUSHEIKO, G.; DI BISCEGLIE, A.M.; REDDY, K.R.; BZOWEJ, N.H.; MARCELLIN, P.; MUIR, A.J.; FERENCI, P.; FLISIAK, R.; GEORGE, J.; RIZZETTO, M.; SHOUVAL, D.; SOLA, R.; TERG, R.A.; YOSHIDA, E.M.; ADDA, N.; BENGTSSON, L.; SANKOH, A.J.; KIEFFER, T.L.; GEORGE, S.; KAUFFMAN, R.S. & ZEUZEM, S. Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus. *The New England Journal of Medicine*, 364: 2405-2016, 2011.

KATSOUNAS, A.; TRIPPLER, M.; KOTTILIL, S.; LEMPICKI, R.A.; GERKEN, G. & SCHLAAK, J.F. Cytokine/chemokine patterns connect host and viral characteristics with clinics during chronic hepatitis C. *European Journal of Medical Research*, 17: (in print), 2012.

KHAKOO, S.I. From human genes to disease phenotype: an overview. *Hot Topics in Viral Hepatitis*, 7(20): 11-15, 2011.

KNAPP, S.; YEE, L.J.; FRODSHAM, A.J.; HENNIG, B.J.; HELLIER, S.; ZHANG, L.; WRIGHT, M.; CHIARAMONTE, M.; GRAVES, M.; THOMAS, H.C.; HILL, A.V. & THURSZ, M.R. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of *MxA*, *OAS-1* and *PKR*. *Genes and Immunity*, 4: 411-419, 2003.

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, 436: 933-938, 2005.

LINDENMANN, J. Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. *Virology*, 16: 203-204, 1962.

LISKER-MELMAN, J. & SAYUK, G.S. Defining Optimal therapeutic outcomes in chronic hepatitis. *Archives of Medical Research*, 38: 652-660, 2007.

MCHUTCHISON J.G.; LAWITZ E.J.; SHIFFMAN M.L.; MUIR A.J.; GALLER G.W.; MCCONE J.; NYBERG L.M.; LEE W.M.; GHALIB R.H.; SCHIFF E.R.; GALATI J.S.; BACON B.R.; DAVIS M.N.; MUKHOPADHYAY P.; KOURY K.; NOVIELLO S.; PEDICONE L.D.; BRASS C.A.; ALBRECHT J.K. & SULKOWSKI M.S. Peginterferon alfa-2b or alfa-2a with ribavirin for treatment of hepatitis C infection. *The New England Journal of Medicine*, 361: 580–593, 2009.

MCHUTCHISON, J.G.; GORDON, S.C.; SCHIFF, E.R.; SHIFFMAN, M.L.; LEE, W.M.; RUSTGI, V.K.; GOODMAN, Z.D.; LING, M.H.; CORT, S. & ALBRECHT, J.K. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *The New England Journal of Medicine*, 339: 1485-1492, 1998.

MCOMISH, F.; YAP, P.L.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.; SEED, C.; KELLER, A.J.; COBAIN, T.J.; KRUSIUS, T.; KOLHO, E. & NAUKKARINEN, R. Geographical distribution of Hepatitis C virus genotypes in blood donors: an International collaborative survey. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 884-892, 1994.

MELLOR, J.; HOLMES, E.C.; JARVIS, L.M.; YAP, P.L. & SIMMONDS, P. The International HCV Collaborative Study Group. Investigation of the pattern of hepatitis C virus sequence diversity in different geographical regions: implications for virus classification. *Journal of General Virology*, 76: 2493-2507, 1995.

MILLER, R.H. & PURCELL, R.H. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestivirus infection in chronic hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Disease*, 31: 224-226, 1990.

MURPHY, D.; CHAMBERLAND, J.; DANDAVINO, R. & SABLON, E. A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa. *Journal of Hepatology*, 46: 623A, 2007.

NAINAN, O.V.; ALTER, M.J.; KRUSZON-MORAN, D.; GAO, F.X.; XIA, G.; MCQUILLAN, G. & MARGOLIS, H.S. Hepatitis C virus genotypes and viral concentrations in participants of a general population survey in the United States. *Gastroenterology*, 131: 478-484, 2006.

NATIONAL Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Management of hepatitis C 2002 (June 10-12, 2002). *Gastroenterology*, 123: 2082-2099, 2002.

NGUYEN, M.H. & KEEFE, E.B. Prevalence and treatment of hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3: 97-101, 2005.

NIH - National Institute of Health, Consensus Development Conference Statement: management of hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 36: S3-20, 2002.

O'BRIEN, T.R.; EVERHART, J.E.; MORGAN, T.R.; LOK, A.S.; CHUNG, R.T.; SHAO, Y.; SHIFFMAN, M.L.; DOTRANG, M.; SNINSKY, J.J.; BONKOVSKY, H.L. & PFEIFFER, R.M. An *IL28B* genotype-based clinical prediction model for treatment of chronic hepatitis C. *PLoS One*, 6: e20904, 2011.

PANG, T. Impact of pharmacogenomics on neglected diseases of the developing world. *American Journal of Pharmacogenomics*, 3: 393-398, 2003.

PAWLITSKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology*, 12(2): 96-102, 2004.

PAWLITSKY, J.M.; CHEVALEZ, S. & MUCHUTCHISON, J.G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, 132: 1979-1998, 2007.

POORDAD, F.; MCCONE, J.JR.; BACON, B.R.; BRUNO, S.; MANNS, M.P.; SULKOWSKI, M.S.; JACOBSON, I.M.; REDDY, K.R.; GOODMAN, Z.D.; BOPARAI, N.; DINUBILE, M.J.; SNIUKIENE, V.; BRASS, C.A.; ALBRECHT, J.K. & BRONOWICKI, J.P. Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection. *The New England Journal of Medicine*, 364: 1195-1206, 2011.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S.; NIEDERAU, C.; MINUK, G.S.; IDEO, G.; BAIN, V.; HEATHCOTE, J.; ZEUZEM, S.; TREPO, C. & ALBRECHT, J. 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. *Lancet*, 352: 1426-1432, 1998.

POYNARD, T.; YUEN, M.F.; RATZIU, V. & LAI, C.L. Viral hepatitis C. *Lancet*, 362: 2095-2100, 2003.

RAMACHANDRAN P.; FRASER A.; AGARWAL K.; AUSTIN A.; BROWN A.; FOSTER G.R.; FOX R.; HAYES P.C.; LEEN C.; MILLS P.R.; MUTIMER D.J.; RYDER S.D. & DILLON J.F. UK consensus guidelines for the use of the protease inhibitors boceprevir and telaprevir in genotype 1 chronic hepatitis C infected patients. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 35: 647-62, 2012.

REGO-PÉREZ, I.; FERNÁNDEZ-MORENO, M. & BLANCO, F.J. Gene polymorphisms and pharmacogenetics in rheumatoid arthritis. *Current Genomics*, 9: 381-393, 2008.

ROE, B. & HALL, W.W. Cellular and molecular interactions in coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10: 1-18, 2008.

ROMERO-GOMEZ, M.; ESLAM, M.; RUIZ, A. & MARAVER, M. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. *Liver International*, 31: 443-460, 2011.

ROSEN, H.R. Hepatitis C pathogenesis: mechanisms of viral clearance and liver injury. *Liver Transplantation*, 9: S35-43, 2003.

ROSEN, H.R. Clinical practice. Chronic hepatitis C infection. *The New England Journal of Medicine*, 364: 2429-2438, 2011.

SALLOUM, S. & TAI, A.W. Treating hepatitis C infection by targeting the host. *Translational Research*, 159: 421-429, 2012.

SANDER, G.B.; KUCHENBECKER, R.S.; AMARAL, K.M. & KRUG, B.C. Hepatite Viral Crônica C. In: BELTRAME, A. *Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas – Medicamentos Excepcionais*. Porto Alegre, Gráfica Pallotti, p. 431-454, 2002.

SANDRIM, V.C.; REZENDE, V.B. & TANUS-SANTOS, J.E. Farmacogenética cardiovascular. *Medicina, Ribeirão Preto*, 39: 535-542, 2006.

SARAIVA, M. & O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10: 170-181, 2010.

SCOTT, J.D & GRETCH, D.R. Molecular Diagnostic of Hepatitis C virus infection. *Journal of the American Medical Association*, 297: 724-732, 2007.

SEEFF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 36: S35-46, 2002.

SHEPPARD, P.; KINDSVOGEL, W.; XU, W.; HENDERSON, K.; SCHLUTSMEYER, S.; WHITMORE, T.E.; KUESTNER, R.; GARRIGUES, U.; BIRKS, C.; RORABACK, J.; OSTRANDER, C.; DONG, D.; SHIN, J.; PRESNELL, S.; FOX, B.; HALDEMAN, B.; COOPER, E.; TAFT, D.; GILBERT, T.; GRANT, F.J.; TACKETT, M.; KRIVAN, W.; MCKNIGHT, G.; CLEGG, C.; FOSTER, D. & KLUCHER, K.M. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*, 4(1): 63-68, 2003.

SHIFFMAN, M.L. Hepatitis C therapy. *World Gastroenterology News*, 12: 18-19, 2007.

SILVA, C.M.D.; COSTI, C.; KRUG, L.P.; RAMOS, A.B.; GRANDI, T.; GANDOLFI, V.L.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M.; NIEL, C., ROSSETTI, M.L.R. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7): 867-870, 2007.

SIMMONDS, P.; BUKH, J.; COMBET, C.; DELÉAGE, G.; ENOMOTO, N.; FEINSTONE, S.; HALFON, P.; INCHAUSPÉ, G.; KUIKEN, C.; MAERTENS, G.; MIZOKAMI, M.; MURPHY, D.G.; OKAMOTO, H.; PAWLITSKY, J.M.; PENIN, F.; SABLON, E.; SHIN-I, T.; STUYVER, L.J.; THIEL, H.J.; VIAZOV, S.; WEINER, A.J.

& WIDELL, A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Journal of Hepatology*, 42: 962-973, 2005.

SUPPIAH, V.; MOLDOVAN, M.; AHLENSTIEL, G.; BERG, T.; WELTMAN, M.; ABATE, M.L.; BASSENDINE, M.; SPENGLER, U.; DORE, G.J.; POWELL, E.; RIORDAN, S.; SHERIDAN, D.; SMEDILE, A.; FRAGOMELI, V.; MÜLLER, T.; BAHLO, M.; STEWART, G.J.; BOOTH, D.R. & GEORGE, J. *IL28B* is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nature Genetics*, 41: 1100-1104, 2009.

SUZUKI, F.; ARASE, Y.; SUZUKI, Y.; TSUBOTA, A.; AKUTA, N.; HOSAKA, T.; SOMEYA, T.; KOBAYASHI, M.; SAITOH, S.; IKEDA, K.; KOBAYASHI, M.; MATSUDA, M.; TAKAGI, K.; SATOH, J. & KUMADA, H. Single nucleotide polymorphism of the *MxA* gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *Journal of Viral Hepatitis*, 11: 271-276, 2004.

TANAKA, Y.; NISHIDA, N.; SUGIYAMA, M.; KUROSAKI, M.; MATSUURA, K.; SAKAMOTO, N.; NAKAGAWA, M.; KORENAGA, M.; HINO, K.; HIGE, S.; ITO, Y.; MITA, E.; TANAKA, E.; MOCHIDA, S.; MURAWAKI, Y.; HONDA, M.; SAKAI, A.; HIASA, Y.; NISHIGUCHI, S.; KOIKE, A.; SAKAIDA, I.; IMAMURA, M.; ITO, K.; YANO, K.; MASAKI, N.; SUGAUCHI, F.; IZUMI, N.; TOKUNAGA, K. & MIZOKAMI, M. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*, 41: 1105-1109, 2009.

THE FRENCH METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, 20: 15-20, 1994.

THIO C.L. Host genetic factors and antiviral immune responses to hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*, 12: 713-726, 2008.

THIO C.L. & THOMAS D.L. Interleukin-28b: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. *Gastroenterology*, 138: 1240-3, 2010.

THOMAS D.L. & SEEFF L.B. Natural history of hepatitis C. *Clinics in Liver Disease*, 9: 383-398, 2005.

THOMAS D.L.; THIO C.L.; MARTIN M.P.; QI Y.; GE D.; O'HUIGIN C.; KIDD J.; KIDD K.; KHAKOO S.I.; ALEXANDER G.; GOEDERT J.J.; KIRK G.D.; DONFIELD S.M.; ROSEN H.R.; TOBLER L.H.; BUSCH M.P.; MCHUTCHISON J.G.; GOLDSTEIN D.B. & CARRINGTON M. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, 461: 798-801, 2009.

WHO. Global surveillance and control of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 6: 35-47, 1999.

WJST, M. & WERNER, M. Methods of Genotyping. In: Hall, IP & Pirmohamed, M. *Pharmacogenetics*. New York, Informa Health Care, Cap. 2, p. 35-48, 2006.

World Health Organization (WHO). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Accessed June, 2011.

WRIGHT AF. Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. *Genetics Unit in Encyclopedia of Life Sciences* 1-10, 2005.

YEE, L.J.; TANG, J.; GIBSON, A.W.; KIMBERLY, R.; VAN LEEUWEN, D.J. & KASLOW, R.A. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. *Journal of Hepatology*, 33: 708-712, 2001.

YEE, L.J.; TANG, J.; HERRERA, J.; KASLOW, R.A. & VAN LEEUWEN, D.J. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes and Immunity*, 1(6): 389-390, 2000.

YU, S.; DOUGLASS, J.M.; QUALLS, C.; ARORA, S. & DUNKELBERG, J.C. Response to therapy with pegylated interferon and ribavirin for chronic hepatitis C in hispanics compared to non-Hispanic whites. *The American Journal of Gastroenterology*, 104: 1686-1692, 2009.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 223-235, 2000.

Apêndices

APÊNDICE 1. Texto informativo ao paciente sobre a coleta e pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Número do prontuário: _____

Protocolo Nº: _____

Título do projeto: Estudo de polimorfismos genéticos e resposta ao tratamento com interferon-alfa/ribavirina em pacientes com o vírus da hepatite C

Financiamento: CDCT/FEPPS, FAPERGS
Investigador Principal: Msc. Tarciana Grandi

Objetivos e relevância do estudo

O presente estudo visa analisar polimorfismos genéticos presentes nos pacientes portadores do HCV e correlacioná-los com variáveis clínicas, bioquímicas e virológicas, para futuramente traçar diretrizes que auxiliarão nos rumos do tratamento.

A infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV) é considerada um grave problema de saúde pública, podendo levar ao desenvolvimento de hepatite crônica, cirrose e câncer hepático. A terapia padrão para infecção crônica pelo HCV é baseada na combinação de interferon com ribavirina. A resposta sustentada ao tratamento é conseguida quando o paciente alcança níveis indetectáveis de RNA do HCV, seis meses após o término do tratamento. O tratamento da hepatite C é efetivo em aproximadamente 80% dos pacientes com infecção por HCV genótipos 2 ou 3, e em menos de 50% nos pacientes com HCV genótipo 1. Embora o genótipo viral seja o principal determinante da resposta ao tratamento em pacientes infectados pelo HCV, os fatores genéticos do hospedeiro podem influenciar, tanto no curso natural da infecção, como na resposta ao tratamento. O estudo da influência de variações genéticas nas respostas às drogas poderá auxiliar na identificação de quais pacientes se beneficiarão com uma data terapia, com um menor risco de efeitos adversos, possibilitando uma terapia individualizada mais segura.

Procedimentos

Nos colaboradores que decidirem participar da pesquisa serão coletadas três gotas de sangue por punção digital, que será realizada no dedo anelar, sempre com agulhas descartáveis, antecedido por antissepsia local com álcool e algodão. A amostra de sangue será utilizada para realização dos testes genéticos. Será coletada apenas uma amostra de sangue do paciente, independente da fase do tratamento que este se encontre. Os dados do paciente e os fatores de risco que estão associados ao adoecimento por hepatite C serão consultados na Ficha Farmacoterapêutica do banco de dados do CAMMI.

Local do Estudo

Os procedimentos de coleta de sangue e entrevista serão realizados no Centro de Aplicação e Monitorização de Medicamentos Injetáveis (CAMMI) do RS do Hospital Sanatório Partenon, em Porto Alegre. As análises genéticas serão realizadas no CDCT (Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da FEPPS).

Riscos e desconfortos

Os riscos e desconfortos aos participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima. A coleta de sangue é de uma pequena quantidade (três gotas) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral.

Desistência na participação do estudo

A participação de cada indivíduo neste estudo é voluntária, ou seja, quem não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo. Se concordar em participar do estudo e mudar de

idéia no decorrer do mesmo, da mesma forma, não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

Benefícios

Os procedimentos médicos aos quais o participante do estudo será submetido poderão gerar novos conhecimentos científicos com conseqüente melhoria do tratamento de pacientes que estiverem contaminados pelo vírus da hepatite C. O colaborador, caso desejar, poderá tomar conhecimento dos resultados obtidos nesta pesquisa.

Compensação financeira

Não haverá nenhum pagamento aos pacientes que concordarem em participar da pesquisa, bem como os participantes da pesquisa não terão nenhum custo adicional relacionado aos exames realizados.

Confidencialidade das informações

A identidade dos colaboradores do estudo será considerada confidencial e será somente conhecida pela equipe envolvida no estudo, isto é, não será permitido o acesso a terceiros. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código (número) criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo. Este banco será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que está sendo proposto e convida os indivíduos a participar. No entanto, se houver alguma dúvida, estas poderão ser esclarecidas pela equipe do estudo, através da Msc. Tarciana Grandi, em qualquer momento do estudo, ou posteriormente, pelo telefone: 3352-0336.

Autorização para estocagem de material biológico

Permito que minha amostra de sangue seja guardada para ser utilizada em outra pesquisa, mediante protocolo de pesquisa autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPPS, desde que eu seja contatado para conceder ou não a autorização para uso do material em futuros projetos. Quando não for possível o contato com o colaborador, o fato será justificado perante o Comitê de Ética e Pesquisa.

- () Sim, permito.
- () Não permito que minha amostra seja utilizada em novos estudos.
- () Desejo que minha amostra seja destruída, após o fim do presente estudo.

O significado de sua assinatura

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo. Você receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Assinatura do Colaborador

Entrevistadora: Tarciana Grandi (Contato: 3352-0336) Data:

Obs.: O presente documento, baseado no item IV das diretrizes e normas regulamentadoras para pesquisa em Saúde, do Conselho Nacional de Saúde (Resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma via em poder do voluntário ou de seu responsável legal e outra com o pesquisador responsável.

APÊNDICE 2. Carta de aceitação condicional do artigo *Response to treatment in Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated with a single-nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene*

Dear Dr. Rossetti:

We are please to inform you that submission manuscript entitled "**Response to treatment of Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated to a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene**" received favorable comments from the Editorial Board of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

The final acceptance of your manuscript depends on its adequacy to the Memorias format/style and documents. Please check the following:

A) Please find attached the affidavit and copyright forms. The affidavit form must be signed by each author. Authors from different countries or institutions may sign in separate sheets containing the same basic statement (which may be sent by e-mail to memorias@fiocruz.br) The copyright form must be signed and returned by the corresponding author. Please send to memorias@fiocruz.br within 10 days.

B) To maintain high quality of our journal, all images in manuscript sent to Memorias do Instituto Oswaldo Cruz for publication, must follow these characteristics:

1. TIFF file format
2. 300 dpi
3. Size up to 4Mb

We kindly ask the author to check if your figures are according to these instructions. Please inform if any of the images have been previous published in a Journal.

If you have a colour photograph (10 cm x 10 cm) that illustrates as aspect of the present manuscript and would like to submit it for consideration to illustrate the cover, please include it when you send the final version of the manuscript.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Prof. Ricardo Lourenço
Handling Editor
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br

* AFFIDAVIT.doc (30.5 Kb) attached 28-Jul-2012

APÊNDICE 3. Carta de confirmação de submissão do artigo *Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms as predictors of null virological response in therapy for chronic hepatitis C virus infection among Brazilian patients*

Article title: **Tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphisms as predictors of null virological response in therapy for chronic hepatitis C virus infection among Brazilian patients**

MS ID : 6389040177935868

Authors : Tarciana Grandi Mrs, Cláudia MD Silva Mrs, Karine M Amaral Miss, Paulo D Picon Mr, Cintia Costi Miss, Nicole N Fré Miss, Marilu Fiegenbaum Mrs, Christian Niel Mr and Maria LR Rossetti Mrs

Journal : BMC Medical Genetics

Dear Mrs Grandi

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

http://www.biomedcentral.com/imedia/6389040177935868_article.pdf (192K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

http://www.biomedcentral.com/imedia/1148171922793875_comment.pdf

If the PDF does not contain the comments which you uploaded, please upload the cover letter again, click "Continue" at the bottom of the page, and then proceed with the manuscript submission again. If the letter will not upload, please send a copy to editorial@biomedcentral.com.

The submitting author can check on the status of the manuscript at any time by logging into 'My BioMed Central' (<http://www.biomedcentral.com/my>).

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on editorial@biomedcentral.com. We would also welcome feedback about the online submission process.

Best wishes,
The BioMed Central Editorial Team
Tel: +44 (0) 20 3192 2013
e-mail: editorial@biomedcentral.com
Web: <http://www.biomedcentral.com/>

Curriculum Vitae Resumido

Tarciana Grandi

CURRICULUM VITAE resumido

GRANDI, T.

Dados pessoais

Nome: Tarciana Grandi

Nascimento: Ronda Alta/RS - 21/07/1978

Endereço profissional: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, CDCT Avenida Ipiranga, 5400. CEP: 90610-000 - Porto Alegre - RS - Brasil

Telefone profissional: 51- 33520336

E-mail: tarcianagrandi@gmail.com

Formação

- 2007- atual** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estudo de Polimorfismos Genéticos e Resposta ao Tratamento com Interferon-Alfa/Ribavirina em Pacientes com o Vírus da Hepatite C
Orientador: Maria Lúcia Rosa Rossetti
- 2002 - 2005** Mestrado em Gerontologia Biomédica.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil
Título: Identificação de tipos e variantes de Papilomavírus Humano relacionados com o desenvolvimento de câncer cervical
Orientador: Virginia Minghelli Schimtt
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1996 - 2000** Graduação em Farmácia.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brasil

Título: Hepatite A no RS

Estágios

- 2003 - 2003** Estágio de Docência em Biotecnologia.
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, PUCRS,
Porto Alegre, Brasil
- 1998 - 2000** Estágio em Análises Clínicas, Laboratório de Virologia, LACEN,
Porto Alegre, Brasil
Bolsa Fundação para o Desenvolvimento de Recursos Humanos

Experiência profissional

- 2007 - Atual** Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Centro de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Porto Alegre, RS, Brasil
- 2005 - 2006** Centro de Diagnósticos Médicos - METANALISYS, Porto Alegre, RS,
Brasil
- 2001 - 2003** Farmácia Ronda Alta, Ronda Alta, RS, Brasil
- 2001 - 2001** Laboratório de Análises Clínicas – LABORCLINICA, Ronda Alta, RS,
Brasil

Artigos completos publicados em periódicos

COSTI, C.; DA SILVA, C.M.D.; DA FRÉ, N.N; GRANDI, T.; HAMESTER, F.I.; ZAHA, A.; NIEL, C.; ROSSETTI, M.L.R. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for detection and genotyping of hepatitis C virus. *Journal of Virological Methods*, 162: 75-80, 2009.

RODENBUSCH, R.; SCHUMACHER, S.; GASTALDO, A.Z.; CHULA, F.G.L.; MACIEL, L.P.; GRANDI, T.; MICHELON, C.T.; COSTI, C.; DA SILVA, C.M.D. Population genetic data for 11 STR loci, including SE33, in Southern Brazil. *Legal Medicine*, 11: 200-202, 2009.

CHULA, F.; RODENBUSCH, R.; SCHUMACHER, S.; GRANDI, T.; MICHELON, C.; GASTALDO, A.; COSTI, C.; CARVALHO, B.; DA SILVA, C.M.D. 15 STR loci

frequencies with mutation rates in the population from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Forensic Science International: Genetics*, 3: 35-38, 2009.

SILVA, C.M.D.; COSTI C.; KRUG, L.P.; RAMOS, A.B.; GRANDI, T.; GANDOLFI, V. L.; MENEZES, M. E., OCAMPOS, M., NIEL, C.M.; ROSSETTI, M.L.R. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 867-870, 2007.

Trabalhos publicados em anais de eventos

1. Gusatti, CS, COSTI, C, GRANDI, T, SILVA, M. S. N., Rossetti, Maria Lucia
Hepatite B: caracterização genética e análise dos genes envolvidos na resposta imune. In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre - RS.

2. GRANDI, T, Silva, CMD, Costi, Cintia, Da Fré, Nicole Nascimento, Niel, Christian, PICON, P. D., Rossetti, Maria Lucia Rosa
Associação dos Polimorfismos Genéticos *MxA-88G/T*, *MxA-123C/A*, *TNF-238G/A* e *TNF-308G/A* na Resposta Viroológica ao Tratamento da Hepatite C Crônica In: XX Congresso Pan Americano de Farmácia e XIV Congresso da Federação Farmacêutica Sul-Americana, 2010, Porto Alegre-RS.

3. GRANDI, T, Silva, CMD, Costi C, FRE, N. N., LUNARDI, Fernanda Nicolao, Niel, CM, PICON, P. D., Rossetti, MLR
TNF and *MxA* gene polymorphisms and response to peginterferon alpha and ribavirin treatment in patients infected with hepatitis C virus genotype 1 In: XXXV CONGRESS OF THE BRASILIAN SOCIETY FOR IMMUNOLOGY, 2010, Porto Alegre - RS.

4. Da Fré, Nicole Nascimento, GRANDI, T, Costi, Cintia, da Silva, Cláudia Maria Dornelles, Zaha, A, Rossetti, Maria Lucia Rosa
Avaliação da influência dos polimorfismos genéticos *MxA-88G/T* e *TNF-alfa - 308G/A* na resposta virológica sustentada ao tratamento da infecção pelo HCV In: Salão de Iniciação Científica - UFRGS, 2009, Porto Alegre.

5. Costi, Cíntia, Silva, CMD, Da Fré, Nicole Nascimento, GRANDI, T, Zaha, A, Niel, CM, Rossetti, MLR
Determinação da frequência dos genótipos do vírus da hepatite C no Rio Grande do Sul utilizando um método molecular colorimétrico In: 25 Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas.

6. Da Fré, Nicole Nascimento, Costi, Cíntia, GRANDI, T, da Silva, Cláudia Maria Dornelles, Zaha, A, Rossetti, Maria Lucia Rosa
Ensaio Molecular de Hibridização em Microplacas para Detecção e Genotipagem do Vírus da Hepatite C (HCV) In: II Congresso Internacional de Bioanálises, V Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, IX Semana Gaúcha de Biomedicina, 2009, Novo Hamburgo.

7. Da Fré, Nicole Nascimento, GRANDI, T, Costi, Cíntia, da Silva, Cláudia Maria Dornelles, Zaha, A, Rossetti, Maria Lucia Rosa
Relação entre Polimorfismos Genéticos e Resposta ao Tratamento em Pacientes Infectados com Genótipo 1 do Vírus da Hepatite C In: II Congresso Internacional de Bioanálises, V Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, IX Semana Gaúcha de Biomedicina, 2009, Novo Hamburgo.
8. FRE, N. N., Costi C, GRANDI, T, GRANDI, T., Silva, CMD, Zaha, A, Rossetti, MLR
Desenvolvimento de uma Metodologia para Detecção e Genotipagem do Vírus da Hepatite C (HCV) através de Hibridização em Microplacas In: XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2008, Porto Alegre.
9. COSTI, C, GRANDI, T, HAMESTER, F. I., Silva, CMD, Zaha, A, Rossetti, MLR
Desenvolvimento de uma Metodologia Colorimétrica para Detecção e Genotipagem do Vírus da Hepatite C In: IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007, Porto Alegre.
10. Rossetti, MLR, COSTI, C, GRANDI, T, Silva, CMD, Possuelo, LG, Zaha, A
Avaliação da Co-infecção pelo Virus da Hepatite C em Pacientes Infectados por Mycobacterium tuberculosis In: 3 Jornada Científica da FEPPS, 2006, Porto Alegre.
11. GRANDI, T, COSTI, C, Silva, CMD, Rossetti, MLR, Andrade, AB
Determinação da carga viral do Vírus da Hepatite C em pacientes coinfectados pelo Vírus da imunodeficiência Humana In: 3 Jornada Científica da FEPPS, 2006, Porto Alegre.
12. GRANDI, T, Costi C, Krug, LP, Niel, CM, Ramos, AB, Rossetti, MLR, Silva, CMD, Zaha, A
DISTRIBUTION OF HCV GENOTYPES IN SOUTHERN BRAZIL In: Congresso Mundial de Farmácia e Ciências Farmacêuticas da FIP, 2006, Salvador.
13. COSTI, C, Silva, CMD, GRANDI, T, Rossetti, MLR
Aplicação da Técnica de PCR em Tempo Real para Determinação da Carga Viral em Pacientes Infectados com o Vírus da Hepatite C In: 3 Jornada Científica da FEPPS, 2006, Porto Alegre.
14. Silva, CMD, Costi C, GRANDI, T, Krug, LP, Niel, CM, Medeiros, RM, Zaha, A, Rossetti, MLR
Estudo da Prevalência dos Genótipos do HCV no Rio Grande do Sul In: 52 Congresso Brasileiro de Genética, 2006, Foz do Iguaçu.
15. GRANDI, T, Schmitt VM, Anchau F
HPV Types and Variants Associated to Malignant and Premalignant Cervical Lesions In: XVI Encontro Nacional de Virologia e do III Simpósio Internacional de Oncovirologia, 2005, Salvador.