



2012

Marcadores genéticos de resposta à terapêutica na infeção crónica pelo vírus da hepatite C

Fernando J. T. Augusto



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Marcadores genéticos de resposta à
terapêutica na infeção crónica pelo vírus
da hepatite C

Fernando José Teles Augusto

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Marcadores genéticos de resposta à terapêutica na infeção crónica pelo vírus da hepatite C

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Henriqueta Silva e do Professor Doutor António Portugal (Universidade de Coimbra)

Fernando José Teles Augusto

2012

Aos meus Pais e Irmã

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Henriqueta Coimbra Silva pela oportunidade que me deu, ao ter aceite orientar esta tese e me ter guiado ao longo deste último ano, pela disponibilidade, pela paciência e pela exigência na realização deste trabalho.

Ao Doutor Luís Mesquita, pela sua disponibilidade no esclarecimento de dúvidas, pela presença assídua no laboratório, pelos momentos de descontração e muitos ensinamentos dados.

À Doutora Cristina Valente e ao Doutor Rui Gradiz, do Serviço de Doenças Infeciosas, Hospital dos Covões, pela disponibilidade mostrada na recolha de informações sobre pacientes bem como pela cedência das amostras de sangue.

À Doutora Célia Ferreira, do Serviço de Imuno-hemoterapia do Centro Hospitalar de Coimbra, pela disponibilidade no estudo das técnicas de diagnóstico.

Ao Professor Doutor João Portugal, por tudo o que me ensinou nestes anos de Faculdade.

Às minhas colegas de laboratório, Patrícia Pedro e Teresa Carvalho, pelos momentos de descontração e diversão, pelos esclarecimentos, pelos almoços e pela ajuda.

A todos os meus amigos, pelos grandes momentos passados, esparecimento, diversão, camaradagem, parvoíce, experiências, partilha e pelo grande apoio que me deram.

A todos, os que de alguma forma me ajudaram a conseguir realizar este projeto, quer pela motivação, pela coragem ou apenas com palavra simples.

Para terminar, um agradecimento muito especial a toda a minha família. Aos meus pais pelo amor, carinho, compreensão, dedicação, por me conseguirem aturar neste último ano. À minha irmã, pela amizade e cumplicidade, ao meu cunhado e à minha sobrinha Lara.

A vós, a minha sincera gratidão!

Índice

Abreviaturas	I
Resumo	IV
Abstract	VI
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. A hepatite C	2
1.2. O VHC..	3
1.3. Ciclo de vida do VHC	7
1.4. Diagnóstico	9
1.4.1. Testes laboratoriais	9
1.4.2. Etapas do diagnóstico	11
1.5. Tratamento	12
1.5.1. Terapia padrão atual	14
1.5.2. Efeitos secundários e complicações da terapêutica	16
1.5.3. Interferões	17
1.5.4. Ribavirina	18
1.6. Fatores de resposta ao tratamento	19
1.7. O marcador da <i>IL28B</i>	21
1.8. Polimorfismos da Bomba Exportadora de Sais Biliares	24
1.9. Outros polimorfismos	26
1.10. Objetivos	28

Capítulo 2 – Materiais e Métodos	29
2.1. Caracterização das populações estudadas	30
2.2. Caracterização Genotípica	31
2.2.1. Extração de DNA genómico.....	31
2.2.2. Quantificação do DNA das amostras	32
2.3. Estudo dos polimorfismos.....	32
2.3.1. Genotipagem do marcador da IL28B	33
2.3.2. Genotipagem do <i>ABCB11</i>	35
2.4. Amplificação e quantificação da carga viral.....	38
2.5. Genotipagem do Vírus da Hepatite C	40
2.6. Estatística	44
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	45
3.1. Caracterização da população.....	47
3.2. Determinação das frequências alélicas e genotípicas	48
3.2.1. Polimorfismo marcador do gene da <i>IL28B</i>	48
3.2.2. Gene <i>ABCB11</i>	50
3.3. Outros fatores de resposta	52
3.4. Associação entre genótipos e outros fatores de resposta	53
Capítulo 4 – Conclusão	56
Referências Bibliográficas	58

Abreviaturas

<i>ABCB11</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily B member II gene</i>
ALT	Aminotransferase
APOE	Apolipoproteína E
ATP	Adenosina trifosfato
AVE	Tampão de eluição
AW	Tampão de lavagem
BSEP	Bomba exportadora de sais biliares
CD81	Cluster of differentiation 81
C	Citosina
CLDN-1	Claudin-1
DAA	Antivirais de ação direta
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ddNTS	Didesoxirribonucleótidos trifosfatados
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIA	Enzyme immunosorbent assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FXR	Recetor X farnesoide
GAG	Glicosaminoglicanos
GWA	Genome-wide association
IL	Interleucina
<i>IL28B</i>	Gene da <i>interleucina 28B</i>
INF	Interferão

IRF9	Interferon regulatory factor 9
IRES	Internal ribosome entry site
ISG	Interferon-stimulated genes
ISRE	Interferon-stimulated response element
Jak	Janus cinase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLR	Recetor de lipoproteínas de baixa densidade
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NCR	Região não codificante
NR	Não resposta
NVR	Respondedores virológicos nulos
OR	Odd ratio
ORF	Open reading frame
PQ	Padrão de quantificação
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Reação da cadeia em polimerase
PEG-IFN	Interferão peguilado
RBV	Ribavirina
DdRP	RNA polimerase RNA dependente
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphism
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da cadeia em polimerase com transcrição reversa
RV	Respondedores virológicos
RVP	Resposta virológica precoce

RVS	Resposta virológica sustentada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNP	Polimorfismos de nucleótido único
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
STAT	Signal transducers and activators of transcription
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
Tyr	Tirosina cinase
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
X^2	Teste do Chi-quadrado

Resumo

O vírus da hepatite C (VHC) é a causa mais frequente de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular em todo o mundo. A terapia atual combinada, com interferão peguilado e ribavirina, apenas é eficaz em 50-60% dos pacientes infetados. A identificação de marcadores de previsão da resposta virológica sustentada (RVS, correspondendo a ausência de RNA viral no soro do doente, 24 semanas após o fim do tratamento), relacionados com o hospedeiro ou com o vírus, tem permitido a individualização do protocolo terapêutico e melhorar as taxas de sucesso. Relativamente ao hospedeiro, vários polimorfismos em genes chaves do processo viral e imunológico, têm sido investigados, embora nenhum deles tenha ainda entrado na prática clínica. Neste trabalho pretendemos avaliar a correlação de dois polimorfismos do hospedeiro com a resposta viral à terapia combinada com IFN. Os polimorfismos selecionados foram o rs12979860, situado a montante do gene da *IL28B*, o polimorfismo que até hoje mostrou uma maior correlação com a resposta à terapêutica, e o rs2287622 (habitualmente denominado por V444A), localizado no gene *ABCB11*, que codifica uma proteína transportadora de sais biliares (BSEP), tendo este SNP sido anteriormente correlacionado com um défice funcional da proteína e com o desenvolvimento de cirrose em doentes infetados pelo VHC.

A amostra de população estudada era constituída por 117 doentes, seguidos no Serviço de Doenças Infecciosas dos CHC/CHUC, 67% dos quais era do sexo masculino. Para a genotipagem utilizou-se o método de sequenciação automática para o polimorfismo rs12979860, e a técnica de RFLPs para o polimorfismo V444A. A quantificação da carga viral no soro dos doentes foi realizada pelo teste *COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HCV* (Roche), um teste de RT-PCR em tempo real, e a genotipagem do vírus pelo teste *VERSANT HCV Amplification 2.0* (LiPA), uma tecnologia baseada na RT-PCR e na hibridização reversa com sondas específicas para os vários genótipos virais. Para a correlação com a resposta à terapêutica apenas se incluíram os doentes que tinham terminado o tratamento há mais de 24 semanas, correspondendo a 91 doentes.

Para os dois polimorfismos, as frequências alélicas e genotípicas encontradas foram semelhantes às descritas para populações caucasianas e respeitavam o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Relativamente ao marcador da *IL28B*, o rs12979860 (uma

transição C > T), 12,8% dos pacientes apresentaram o genótipo de risco, TT. Os pacientes homocigóticos para o alelo C apresentam uma probabilidade de atingir a RVS cerca de 5 vezes superior à dos doentes homocigóticos para o alelo T ($P = 0,0069$; OR = 5.1; IC95%: 1.56 - 16.64). Para o polimorfismo V444A, (uma transição T > C), verificou-se um aumento da frequência do genótipo TT, correspondente a uma maior capacidade funcional do transporte de sais biliares, nos doentes que alcançaram a RVS (20.9% versus 4.2%), embora sem significado estatístico.

No que diz respeito aos outros marcadores de resposta já estabelecidos, os genótipos virais 2 e 3 associaram-se a maior probabilidade de RVS ($P = 0.008$; OR = 7.89; IC95%: 1.71 - 36.55), reforçando a necessidade de uma abordagem terapêutica específica para os pacientes infetados com os genótipos 1 e 4; e a presença de resposta virológica precoce (RVP, definida por, redução superior a $2 \log_{10}$ dos níveis iniciais de RNA do VHC no soro do paciente às 12 semanas de terapia), surgiu com marcador essencial para a decisão terapêutica, visto só os doentes com RVP alcançaram a RVS. Neste estudo, a carga viral inicial não mostrou estar associada com a resposta à terapêutica. Na análise da associação dos polimorfismos estudados com o genótipo viral, carga viral, idade e RVP não se obteve também significância estatística.

Estes resultados confirmam a relevância do marcador da *IL28B* na previsão da resposta à terapêutica na população portuguesa. Relativamente ao polimorfismo do gene *ABCB11*, os resultados sugerem uma possível associação, mas é necessário prosseguir os estudos com uma amostra de doentes de maior dimensão.

A identificação de fatores genéticos e não genéticos que influenciem a resposta à terapêutica é essencial para que se criem modelos integrados de risco clinicamente úteis. Com a introdução de novos fármacos, estes modelos podem permitir selecionar quais os doentes que poderão continuar a fazer a terapêutica baseada no INF, e qual o esquema terapêutico mais adequado, e quais os que beneficiarão de outras abordagens.

Palavras-chave: VHC, RVS, *IL28B*, *ABCB11*, fatores de resposta.

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) is the most frequent cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma worldwide. Current combined therapy with pegylated interferon and ribavirin is only effective in 50-60% of infected patients. The identification of predicting markers for the sustained virologic response (SVR, corresponding to absence of viral RNA in patient serum, 24 weeks after the treatment), related to the host or the virus, has allowed the individualization of treatment protocol and improvement of success rates. As far as the host is concerned, several polymorphisms in key genes of viral and immune process have been investigated, although, until the moment, none have entered in clinical practice. In this work we intended to evaluate the correlation of two polymorphisms of the host with the viral response to combination therapy with IFN. The selected polymorphisms were rs12979860, upstream of the *IL28B* gene, which is the polymorphism with the highest correlation with response to therapy until these days, and rs2287622 (commonly referred to as V444A), located in the *ABCB11* gene, which encodes a bile salt transporter protein (BSEP). This SNP has been previously correlated with a functional impairment of the protein encoded by the mentioned gene and the development of cirrhosis in patients infected with HCV.

The sample population consisted of 117 patients followed at the Department of Infectious Diseases of the CHC/CHUC, 67% of which were male. Patient genotyping was performed by the automated sequencing method for the rs12979860 polymorphism, and by the RFLP technique for V444A polymorphism. The quantification of viral load in patient's serum was performed by the COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HCV (Roche), which is a real time RT-PCR and the genotyping was performed by the VERSANT HCV Amplification 2.0 test (LiPA), a technology based on RT-PCR and reverse hybridization with probes specific for various viral genotypes. The correlation with therapy response only included patients who had completed the treatment for more than 24 weeks. As it is, this study comprised 91 patients.

For both polymorphisms, the allelic and genotypic frequencies found were similar to those described for Caucasian populations and respected the Hardy-Weinberg equilibrium. For the marker of *IL28B*, the rs12979860 (a transition C> T), 12.8% of patients had the risk genotype, TT. The patients homozygous for the C allele have a

probability of achieving SVR about 5 times higher than patients homozygous for the T allele ($P = 0.0069$; OR = 5.1; 95%CI: 1.56 - 16.64). Concerning V444A polymorphism (transition T> C), there was an increase of frequency of TT genotype corresponding to a greater functional ability to transport bile salts in patients who achieved SVR (20.9% versus 4.2%) although it is not statistically significant.

Regarding other already established response markers, viral genotypes 2/3 were associated with a higher probability of SVR ($P = 0.008$; OR = 7.89; 95%CI: 1.71 - 36.55), reinforcing the need of a specific therapeutic approach for infected patients with genotype 1/4 and the presence of early virologic response (EVR, defined by a reduction of more than 2 \log_{10} of the baseline HCV RNA levels in the patient serum at 12 weeks of therapy), emerged as an essential marker for therapeutic decision, as only patients with EVR achieved SVR. In this study, we were not able to associate initial viral load with response to therapy. There was also no statistical significance when studied polymorphisms mentioned above were compared with viral genotype, viral load, age and EVR.

These results confirm the relevance of the marker of *IL28B* in predicting response to therapy in the Portuguese population. For the *ABCB11* gene polymorphism, the results suggest a possible association, but it is necessary further studies with a larger sample of patients.

The identification of genetic and nongenetic factors that influence response to therapy is essential in order to create integrated clinically useful models of risk. With the introduction of new drugs, these models may allow to select the patients which may continue doing therapy based on the INF and which is the most appropriated therapeutic regimen as well as which ones will benefit from other approaches.

Keywords: HCV, SVR, *IL28B*, *ABCB11*, response factors.

Capítulo 1 - Introdução

1.1. A hepatite C

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) constitui uma pandemia viral, com cerca de 170 milhões de pessoas infetadas, 3% da população mundial, com a China, o Egito e o Paquistão a apresentarem os índices mais elevados. Todos os anos, 3 a 4 milhões de pessoas são infetadas por este vírus (World Health Organization, 2011).

O VHC provoca uma doença hepática contagiosa, a hepatite C, que pode manifestar-se de forma aguda ou evoluir para a cronicidade, expondo o paciente ao risco de fibrose hepática e subsequentemente cirrose (15 a 20%) ou carcinoma hepatocelular (2 a 3%) (Lauer & Walker, 2001) (figura 1). O transplante hepático, a derradeira alternativa terapêutica, é uma necessidade cada vez mais frequente no mundo ocidental (Burra, 2009; Hoofnagle, 2002). Apenas 20% a 30% dos indivíduos infetados com o VHC eliminam espontaneamente o vírus, os restantes 80 a 70%, desenvolvem infecção crónica (Micallef, et al., 2006) .

Depois da identificação da Hepatite A e B, esta doença foi categorizada como “hepatite non-A, non-B”. Mais tarde, em 1989, denominaram-na de hepatite C (Kuo, et al., 1989). Nos dias de hoje existem outras hepatites como a Delta (D), a E, encontrada em macacos *Rhesus sp* mas ainda não confirmada em humanos e mais recentemente foi descoberta a hepatite G.

A transmissão deste vírus ocorre, principalmente, através da exposição a sangue contaminado. Esta exposição existe no contexto do consumo de drogas, anteriormente a 1992 por transfusão de sangue, por transplantes de órgãos de dadores infetados, práticas médicas inseguras, nascimento de crianças quando a mãe é portadora do vírus, relações sexuais não protegidas ou ainda por recurso a tatuagens e colocação de piercings (National Institutes of Health, 2002).

Os pacientes com hepatite C crónica podem apresentar manifestações extra-hepáticas ou síndromes considerados de origem imunológica, com formação de auto-anticorpos, tais como sintomas reumatóides, queratoconjuntivite seca, líquen plano, glomerulonefrite, linfoma ou crioglobulinémia mista essencial.

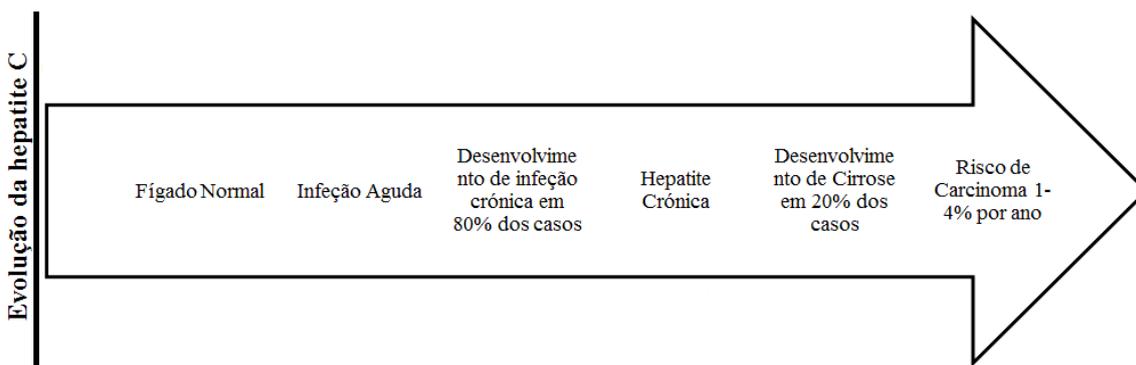


Figura 1: Evolução natural do vírus da hepatite C e a sua variabilidade de pessoa para pessoa. A infecção aguda é assintomática em cerca de 70% dos indivíduos, onde, aproximadamente de 80% dos pacientes acabam por desenvolver infecção crónica. Muitos dos pacientes com infecção continuada acabam por desenvolver cirrose que em alguns casos evolui para carcinoma hepatocelular. (Adaptado de: Lauer & Walker, 2001).

1.2. O VHC

O VHC é um pequeno vírus de RNA que pertence ao género *Hepacivirus*, da família Flaviviridae (Lindenbach, et al., 2007) (figura 2). A sua replicação ocorre no citoplasma e retículo endoplasmático (RE). As partículas do VHC estão descritas como tendo um diâmetro entre os 55 e 65 nanómetros (nm) (Kaito, et al., 1994; Shimizu, et al., 1996) e uma estrutura icosaédrica com um envelope bilipídico derivado da célula hospedeira, onde estão ancoradas as duas glicoproteínas virais E1 e E2. Sob o envelope encontra-se o nucleocapsídeo, composto por múltiplas cópias da proteína C, que forma um revestimento no qual se encontra o RNA genómico. O VHC torna-se instável e

mesmo inativo em ambientes secos ou quando submetido a temperaturas elevadas, ou exposto a solventes lipídicos (Purcell, 1994). Caracteriza-se por um elevado tropismo para os hepatócitos.

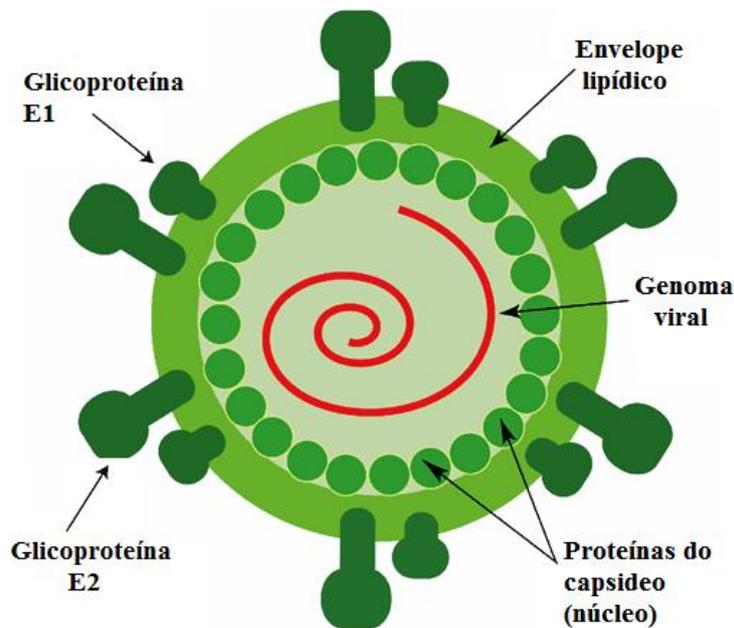


Figura 2: Estrutura da partícula do vírus da hepatite C. A proteína do núcleo interage com o RNA viral para formar o nucleocapsídeo. As glicoproteínas do envelope estão ancoradas ao envelope lipídico. (adaptado de Sharma, 2010).

O genoma do VHC possui uma cadeia simples de RNA com aproximadamente 9.6 kilobases (kb), de sentido positivo, pelo que pode ser diretamente usado na síntese proteica. É formado por duas regiões não codificantes (NCR), a 5'-NCR e a 3'-NCR, separadas por uma *Open Reading Frame* (ORF) que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos (Choo, et al., 1989). Esta poliproteína dá origem a dez proteínas maduras que vão constituir o virião: no terminal amínico, as proteínas estruturais C, E1 e E2, e no terminal carboxílico, as proteínas não-

estruturais, componentes do complexo de replicação, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (figura 3).

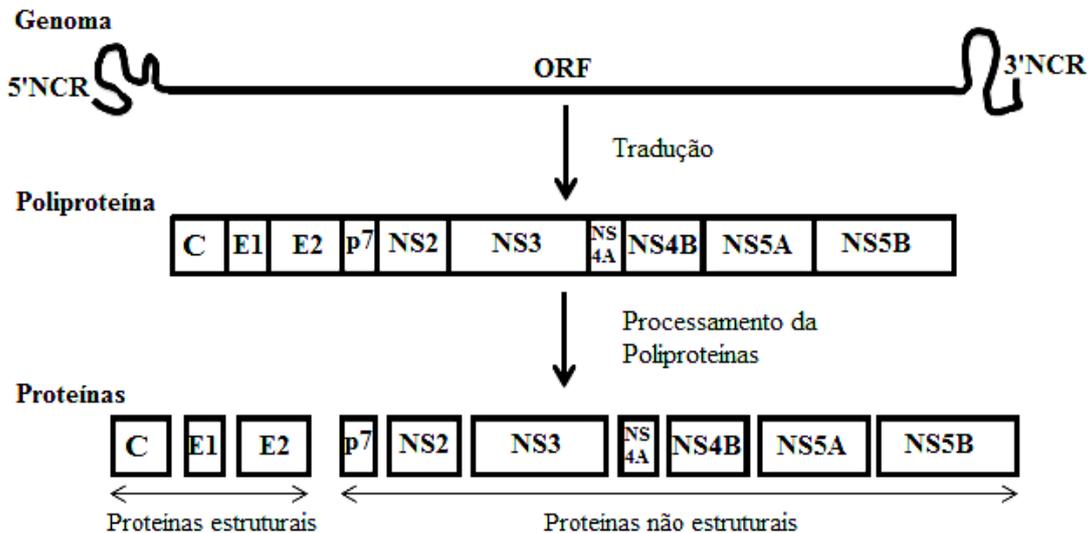


Figura 3: Organização do genoma do HCV. O genoma do VHC é constituído por uma cadeia RNA simples de sentido positivo. Possui duas NCR, 5'e 3' e uma única *Open Reading Frame* (ORF) que codifica uma poliproteína com cerca de 3000 aminoácidos. Esta poliproteína é processada co e pos-tradução, por peptidases celulares e protéases virais, NS2 e NS3, originando dez proteínas maduras. As proteínas estruturais, C e E1 e E2, componentes do virião e as proteínas não-estruturais, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4b, NS5A e NS5B componentes do complexo de replicação. A NS3 e NS5B têm um papel chave na replicação viral, a p7 e a NS2 atuam na montagem da partícula viral. (adaptado de Moradpour, et al., 2007).

A proteína C é a primeira proteína a ser codificada pela ORF do vírus e forma o nucleocapsídeo viral. Esta proteína liga-se à membrana do RE, a moléculas membranares e à superfície de gotículas lipídicas. Tem sido referido que a interação da proteína C com gotículas lipídicas poderá afetar o metabolismo dos lípidos, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática, vista frequentemente na

Hepatite C (Asselah, et al., 2006). As proteínas do envelope, E1 e E2, são glicosiladas e formam um complexo não-covalente. Estas medeiam a ligação do vírus a recetores do hepatócito, bem como o processo de fusão do vírus.

As proteínas não-estruturais atuam na replicação, maturação e libertação das partículas virais. A proteína p7 tem sido referida como um elemento importante na libertação e maturação da partícula viral, por possuir uma atividade de canal catiónico (Griffin, et al., 2003). A NS2 é uma cisteína protease, ao passo que, a NS3 é uma proteína multifuncional, possuindo quer atividade de serina protease quer de helicase (Lindenbach, et al., 2007). Estas duas enzimas são de grande importância no processo de tradução e replicação do vírus. O polipeptídeo NS4A funciona como um cofator para a NS3. A proteína NS4B induz a formação de uma cadeia membranar, que serve de suporte para o complexo de replicação do VHC (Egger, et al., 2002). A NS5B é a principal enzima de replicação do RNA do vírus, emergindo atualmente como o principal alvo no desenvolvimento de antivirais específicos para contra a hepatite C (Bressanelli, et al., 2002).

O VHC pode ser classificado em seis grupos, com mais de 80 subtipos, com base na variação de nucleótidos do seu genoma. Os seis genótipos principais (1 a 6) diferem em 30% a 50% na sequência de nucleótidos, enquanto os subtipos (a, b, c, d e assim por diante) diferem em 20% a 25% (Bukh, et al., 1995; Simmonds, et al., 1993; Simmonds, 1999). Os genótipos mais frequentes nos doentes com hepatite C nos Estados Unidos e Europa são o 1a e 1b, seguidos do 2 e 3; o 4 é frequente no Egito, o 5 na África do Sul e o 6 no Sudoeste Asiático (Zein, 2000).

1.3. Ciclo de vida do VHC

O ciclo de vida do VHC é constituído por uma série de etapas: ligação do vírus e internalização, libertação do genoma viral para o citoplasma, tradução e processamento da poliproteína, replicação do RNA, montagem, maturação e libertação da partícula viral.

O VHC circula na corrente sanguínea do hospedeiro sob variadas formas. Pode associar-se a lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), pode ainda circular como viriões ligados a imunoglobulinas ou mesmo viriões livres (André, et al., 2005). Os hepatócitos são as principais células-alvo do vírus, mas a infeção de células B, células dendríticas e outros tipos de células também têm sido referidas como possíveis (Moradpour, et al., 2007).

Estudos realizados até ao momento apontam para a existência de vários recetores hepatocitários candidatos para o processo de ligação e internalização do vírus, tais como a proteína tetraspanina CD81, o recetor para as LDLs (LDLR), *scavenger receptor class B type I* (SR-BI), claudina-1 (CLDN-1) ou os glicosaminoglicanos (GAGs) (figura 4) (Bartosch & Cosset, 2006; Cocquerel, et al., 2006).

A inclusão do LDLR como recetor candidato na ligação do vírus aos hepatócitos, baseia-se na interação existente entre o vírus e as partículas de lipoproteínas circulantes. Porém, mais estudos serão necessários para determinar corretamente a sua função. Em conjunto com o LDLR é proposto que os glicosaminoglicanos e outras proteínas da superfície celular envolvidas na ligação de lipoproteínas circulantes possam atuar como principais coletores das partículas virais e posterior ligação ao CD81 bem como a outros recetores (Moradpour, et al., 2007).

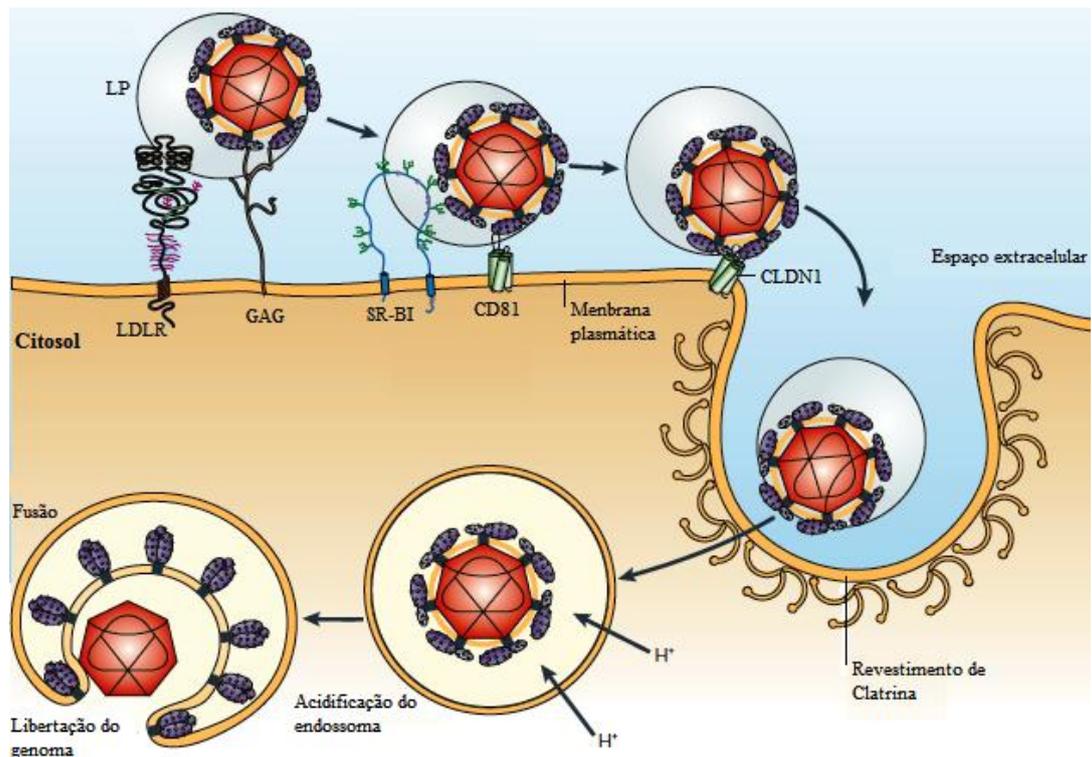


Figura 4: Modelo atual da entrada do HCV no hepatócito. As partículas do VHC em circulação podem se associar a lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL). As glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2, interagem com receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), glicosaminoglicanos (GAG), *scavenger receptor class B type I* (SR-BI), a proteína tetraspanina CD81 e claudina-1 (CLDN1). A internalização depende de endocitose mediada por clatrina. A acidificação do endossoma induz a fusão da membrana do endossoma com as glicoproteínas virais e posterior liberação do genoma para o citosol. (adaptado de Moradpour, et al., 2007).

A ligação do CD81 às glicoproteínas estruturais de tipo E2 do VHC ocorre numa fase tardia. Há evidências de que a CD81 dirija as glicoproteínas do VHC para vesículas exossomais (Masciopinto, et al., 2004). O SR-BI é abundantemente expresso nos hepatócitos, onde exerce funções fisiológicas na captação seletiva de colesterol e ésteres de colesterol de lipoproteínas. O SR-BI pode mediar a ligação da proteína, E2, do VHC a culturas de hepatomas, sugerindo um papel no processo de ligação e internalização do

vírus (Scarselli, et al., 2002). A claudina-1 atua após a ligação do vírus à célula, mas quando e como ainda não está esclarecido.

O VHC é internalizado por endocitose mediada por clatrina. Esta entrada depende da acidificação do compartimento endossomal que desencadeia um rearranjo das glicoproteínas do vírus (Hsu, et al., 2003). O genoma viral é depois libertado para o citosol, após a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma. De seguida ocorre a tradução do RNA no RE e o processamento da poliproteína por proteases virais e celulares, originando então as proteínas estruturais e não estruturais. O início da tradução ocorre com a formação do *internal ribosome entry site* (IRES), constituído pela região 5'-NCR e pela região que codifica a proteína C formando um complexo binário com a subunidade ribossomal 40S (Otto & Puglisi, 2004). A partícula viral é constituída apenas pela proteína C e pelas glicoproteínas E1 e E2.

Após a replicação, que se processa com a síntese de uma cadeia complementar de RNA, a partícula viral é então montada e libertada para fora da célula (Bressanelli, et al., 2002). Pouco se sabe sobre este processo, mas há evidências de que os viriões se formem no RE ou em compartimentos derivados do RE e saiam da célula pela via secretora. É possível que haja uma relação entre o metabolismo das lipoproteínas e a montagem e libertação das partículas virais (André, et al., 2005).

1.4. Diagnóstico

1.4.1. Testes laboratoriais

O diagnóstico de infeção pelo VHC é baseado na realização de técnicas virológicas que têm um papel importante no diagnóstico, decisão terapêutica e avaliação da resposta ao tratamento (Pawlotsky, 2002). Estas técnicas podem ser indiretas como ensaios serológicos de deteção de anticorpos específicos contra o VHC (anti-VHC)

através de técnicas imunológicas, ou podem ser diretas, e permitir a quantificação e caracterização de componentes da partícula viral do vírus, como RNA e antígenos do núcleo do VHC (Booth, et al., 2001; Lauer & Walker, 2001). Habitualmente, para o diagnóstico e acompanhamento da doença, para além dos testes de função hepática, como os doseamentos das transaminases, recorre-se a quatro marcadores virais: o genótipo e o RNA do VHC, antígenos para o núcleo viral e anticorpos anti-VHC (figura 5).

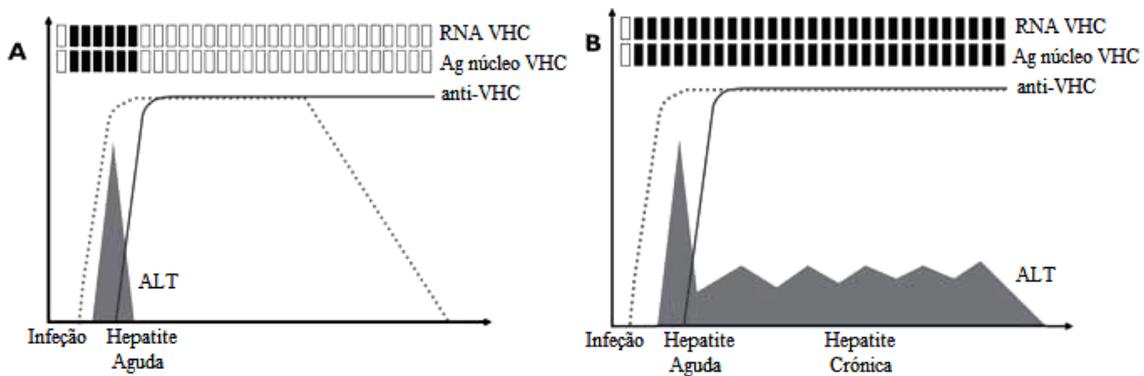


Figura 5: Comportamento durante o tempo do RNA do VHC, antígeno para o núcleo do VHC e anticorpos anti-VHC em pacientes com diagnóstico de infecção pelo VHC. (A) hepatite C aguda, com resolução espontânea; (B) hepatite C crônica. Quadrados brancos, ausência de marcador; quadrados pretos, presença de marcador. Alanina aminotransferase (ALT) a cinzento. (adaptado de Pawlotsky, 2002).

As técnicas imunológicas permitem ensaios de diagnósticos baseados na detecção de anticorpos contra peptídeos virais, NS3, NS4, NS5 e núcleo. Estes anticorpos persistem indefinidamente em pacientes que desenvolvem infecção crônica. O método mais usado são ensaios enzimáticos imunoabsorventes (EIA ou ELISA), com uma sensibilidade e especificidade a rondar os 99%, reprodutíveis e baratos (Pawlotsky, et

al., 2007). Nos primeiros 3 meses após o contacto, o resultado pode ser negativo por produção incipiente de anticorpos.

As técnicas de biologia molecular são utilizadas para detecção e quantificação do genoma viral (virémia) em soro ou plasma. O genoma viral só é detetado 1 a 2 semanas após a infeção. Os métodos mais usados são a reação de polimerização em cadeia (PCR) com transcrição reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real (Booth, et al., 2001; Méndez & Uribe, 2005). Estes métodos tanto são válidos para uma análise quantitativa (quantificação da carga viral) como para uma análise qualitativa (presença de RNA viral e genotipagem do VHC). A quantificação do RNA do VHC é expressa em unidades internacionais (UI)/ mililitro (mL). O método de PCR em tempo real é bastante sensível, permitindo quantificar a virémia entre 10-100 milhões UI/mL (Barbeau, et al., 2004). Ambas as técnicas possuem especificidades na ordem dos 99%.

Os testes laboratoriais de rotina, como o hemograma e a bioquímica completa, são úteis na monitorização da infeção bem como no pré e pós-tratamento. No entanto para a decisão da realização de um tratamento é sempre necessário avaliar a existência de fibrose hepática, pela realização de uma ecografia (fibroscanner) ou de uma biópsia, que aliados aos testes bioquímicos relativos à função hepática permitem ao médico avaliar a presença ou ausência de doença hepática progressiva, como cirrose ou detetar a evolução para carcinoma hepatocelular. A avaliação histológica hepática permite classificar a doença em leve, moderada e cirrose (National Institutes of Health, 2002).

1.4.2. Etapas do diagnóstico

O diagnóstico de hepatite C raramente é feito na fase aguda da infeção porque os sintomas clínicos habitualmente surgem apenas após 7 a 8 semanas (entre as 2 e as 26 semanas) do contágio. A infeção aguda pode ser severa mas raramente fulminante,

sendo na maior parte dos casos assintomática, podendo contudo incluir indisposição, fraqueza, anorexia e icterícia.

O diagnóstico de infeção aguda deve ser baseado na realização de técnicas virológicas quer para deteção de anticorpos anti-VHC pelo ensaio EIAs, quer pela deteção do RNA viral, através de uma técnica sensível, isto é, com um limite de deteção ≤ 50 UI/mL (Pawlotsky, et al., 1998; Pawlotsky, 2002). A presença de RNA e a ausência de anticorpos anti-VHC é indicativa de infeção aguda, a qual pode ser confirmada umas semanas mais tarde por seroconversão.

A presença de anticorpos anti-VHC e de RNA viral na altura do diagnóstico não significa infeção aguda, podendo corresponder a infeção crónica (Pawlotsky, et al., 1997). Esta é definida pela deteção de RNA do VHC por mais de 6 meses. A principal consequência da hepatite C crónica é, como já anteriormente referido, a possibilidade de desenvolver doença hepática progressiva.

Se, num doente com clínica sugestiva, os marcadores virais, anticorpos anti-VHC e RNA não forem detetados na realização dos testes virológicos, estes devem ser novamente realizados semanas mais tarde (Lavillette, et al., 2005). No caso de serem detetados anticorpos anti-VHC e não ser detetado RNA do VHC, poderá significar que o paciente recuperou de uma infeção anterior pelo vírus da hepatite C.

1.5. Tratamento

O objetivo do tratamento da infeção pelo VHC passa pela sua erradicação, prevenção da evolução para doença hepática progressiva, desaparecimento das manifestações extra-hepáticas e diminuição do risco de contágio a outras pessoas. Por este motivo todos os pacientes a quem for diagnosticada hepatite C crónica devem ser considerados como potenciais candidatos ao tratamento. Em contrapartida, se o paciente

apresentar sinais de doença hepática descompensada, problemas neuropsiquiátricos graves e consumir ativamente drogas, a tomada de decisão para a realização do tratamento tem de ser repensada.

O tratamento para a hepatite C foi dramaticamente melhorado durante a última década. Ao contrário de outras infecções virais crónicas, um significativo número de pacientes com infeção crónica pelo VHC consegue uma total erradicação do vírus. As manifestações extra-hepáticas podem ser problemáticas e não reverter com a eliminação do vírus (Manns & Rambusch, 1999). Infelizmente, ainda não há uma vacina eficaz.

A identificação precoce de pacientes com infeção aguda é muito importante. Uma monoterapia com interferão (INF) recombinante ou interferão peguilado (PEG-INFN) pode prevenir a evolução para hepatite C crónica em aproximadamente 90% dos pacientes com infeção aguda sintomática (Santantonio, et al., 2005; Wiegand, et al., 2006). No entanto, muitos dos pacientes com hepatite C, só são diagnosticados aquando de infeção crónica. A meta no tratamento da hepatite C crónica é a obtenção de resposta virológica sustentada (RVS) definida como, ausência de RNA viral no soro do doente seis meses após completar o tratamento.

À medida que o conhecimento do ciclo de vida do VHC vai aumentando, novos fármacos vão sendo desenhadas com o intuito de identificar pequenas moléculas inibidoras de várias proteínas do VHC envolvidas na replicação deste vírus (tabela I). Estes fármacos, já em fase clínica avançada prometem aumentar a taxa de sucesso, mas cujo preço será certamente uma limitação importante à sua utilização generalizada. Estes inibidores vão permitir uma terapia antiviral de ação direta (DAA) (Dore, 2012). Em 2011 foram licenciados dois fármacos inibidores de protease, o Boceprevir e o Telaprevir.

Tabela I: Agentes de terapia antiviral de ação direta para o vírus da hepatite C em desenvolvimento clínico.

Proteína Alvo	Fase 2	Fase 3	Licenciado
Inibidores de protease: NS3/NS4A	Danoprevir; ACH-1625; GS-9256; MK-5172; GSK2336805	Simeprevir; Bi201335; Asunaprevir	Boceprevir Telaprevir
Inibidores de polimerase: NS5B			
Análogos de nucleótidos	Mericitabine; INX-189; IDX184	GS-7977	
Não análogo de nucleótidos	BMS-791325; ABT-333; Tegobuvir; Filibuvir; VX-222; VCH-916		
Inibidores: NS5A	ABT-267; GS-5885	Daclatasvir	

(adaptado de Dore, 2012)

1.5.1. Terapia padrão atual

O tratamento para a infecção pelo VHC evoluiu da monoterapia com INF para o atual tratamento combinado do interferão peguilado (PEG-INF) com ribavirina (RBV).

A primeira terapia válida para pacientes com hepatite C crônica consistiu no uso de IFN- α injetável. Com uma semi-vida de 8 horas e uma rápida eliminação do organismo, as doses eram de 1-3 milhões de unidades (MU) três vezes por semana, em períodos entre três a seis meses e só 13%-19% dos pacientes atingiam uma RVS (McHutchison, et al., 1998; Poynard, et al., 1998). Através de técnicas de DNA recombinante criaram-se duas novas formas de INF, diferindo apenas em um aminoácido, o IFN- α 2a e o IFN- α 2b, ainda hoje utilizados.

A associação à ribavirina pretendeu aumentar a taxa de sucesso. Este fármaco é administrado por via oral em doses entre 1000/1200 mg/dia, dependendo do peso corporal do paciente (abaixo ou acima dos 75Kg). A terapia combinada resultou numa

melhoria da RVS de 38% a 43% mas trouxe uma toxicidade adicional (McHutchison, et al., 1998; Poynard, et al., 1998). O tempo do tratamento da terapêutica combinada depende do genótipo e da carga viral: 24 semanas para os genótipos virais 2 e 3, na presença de baixa carga viral inicial e 48 semanas para os genótipos 1 e 4.

Para melhorar as características farmacocinéticas do INF, criaram-se dois interferões peguilados (PEG-INF), ambos com uma eficácia significativamente superior nos vários ensaios clínicos realizados (Lindsay, et al., 2001; Reddy, et al., 2001). O PEG-IFN α -2a (PEGASYS; Roche) encontra-se ligado covalentemente a uma cadeia ramificada de polietilenoglicol com 40-kD e o PEG-IFN α -2b está ligado a uma cadeia linear de polietilenoglicol com 12-kD (PEG-Intron; Schering-Plough, Kenilworth, New Jersey, USA). Ambos possuem um tempo de semi-vida de cerca de sete dias, uma absorção mais sustentada e uma redução na taxa de eliminação do composto o que permite uma supressão viral mais eficaz e possibilita regimes com uma dose semanal única (Reddy, et al., 2001). A combinação destes compostos com a ribavirina veio aumentar a taxa de RVS para cerca do dobro (Lindsay, et al., 2001; Zeuzem, et al., 2000).

O tratamento padrão para pacientes com o diagnóstico de infeção crónica pelo vírus da hepatite C consiste então, na administração de PEG-IFN α (2a ou 2b) e ribavirina. O PEG-IFN α 2a é administrado em doses fixas de 180 microgramas (μ g) uma vez por semana e PEG-IFN α 2b é ajustado dependendo do peso do paciente, normalmente com doses entre os 80, 100 ou 120 μ g/semana. A Ribavirina deve ser administrada de acordo com o peso do paciente, através da administração de comprimidos com doses entre 1000/1200 mg/dia. O tempo do tratamento é de 24 semanas para os genótipos 2 e 3 e de 48 semanas para os genótipos 1 e 4. Com este

esquema terapêutico obtêm-se taxas de RVS na ordem dos 65% a 82% para os genótipos 2 e 3 e de 40% a 54% para os genótipos 1/4 (Craxì, et al., 2011).

1.5.2. Efeitos secundários e complicações da terapêutica

O tratamento é dispendioso e está associado a numerosos efeitos colaterais potencialmente graves, que muitas vezes necessitam de uma redução das doses ou de uma cessação prematura do tratamento, levando ao risco de insucesso da terapêutica.

Para o PEG-INF α -2a é comum o aparecimento de neutropenia, anemia e trombocitopenia, bem como sintomas gripais, enxaquecas e alopecia. Também podem ocorrer episódios depressivos, contudo são menos frequentes. O Peginterferão α -2b além da ocorrência de sintomas gripais e depressão também está associado a frequentes distúrbios gastrointestinais e a inflamação no local da injeção. Outros efeitos adversos, resultantes do tratamento com PEG-INF, contudo menos frequentes, são depressão da medula óssea, arritmias cardíacas, insuficiência renal e cardíaca, indução e exacerbação de doenças autoimunes, tais como hepatite autoimune, híper e hipotireoidismo, diabetes mellitus tipo 1 e suicídio. O aparecimento destes sintomas leva à falta de adesão à terapêutica e pode exigir a redução de doses ou mesmo descontinuação do tratamento. Os efeitos secundários resultam em 10%-20% de recaídas prematuras e 20% a 30% dos pacientes necessitam de modificação das doses farmacológicas para níveis mais baixos (Fried, 2002; Manns, et al., 2006).

Os pacientes no início da terapia devem ser informados sobre as expectativas do tratamento e os seus efeitos secundários, bem como dos possíveis impactos na sua qualidade de vida.

1.5.3. Interferões

Os IFNs são citocinas produzidas naturalmente pelo sistema imunitário do hospedeiro em resposta a uma infecção viral. Exibem uma vasta gama de funções antivirais *in vivo*, que incluem a expressão de vários genes de proteínas, a ativação de células assassinas naturais (*natural killer*, ou NK) e macrófagos e a regulação da expressão do complexo major de histocompatibilidade em células apresentadoras de antígenos (Brierley & Fish, 2002).

A família dos IFNs é dividida em três tipos: I, II e III. Os IFN do tipo I contêm cerca de 13 membros de IFN- α e um único membro de IFN- β , IFN- ω , IFN- κ e IFN- ϵ (Langer, et al., 2004). Os genes que codificam o tipo I dos IFNs estão agrupados no cromossoma 9. O tipo II é representado por um único membro, o IFN- γ , codificado pelo cromossoma 12 humano. Mais recentemente foi descoberto um grupo de IFNs, designados de tipo III. Os genes que originam este tipo de IFNs estão localizados no cromossoma 19 e codificam os IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 (também designadas de IL-29, IL-28A e IL-28B, respetivamente) (Kotenko, et al., 2003; Sheppard, et al., 2003).

O tipo I e tipo III de IFN exercem a sua atividade biológica através da mesma via de transdução de sinal, pela interação com recetores específicos da membrana celular, compostos por dois domínios: IFN- α R1 e IFN- α R2 para o recetor de IFN- α e IFN- λ R1 e IL-10R2 para o recetor de IFN- λ . O acoplamento do ligando ao recetor conduz à sua dimerização e à fosforilação de cinases associadas ao recetor, *Janus kinases 1* (Jak1) e *tyrosine-protein kinase 2* (Try2) (figura 6).

Estas cinases promovem a subsequente fosforilação de proteínas citoplasmáticas, que pertencem à família de proteínas *signal transducers and activators of transcription* (STATs), STAT1 e STAT2, que juntamente com o *interferon regulatory factor 9* (IRF9), formam o complexo trimérico que se transloca para o núcleo. Uma vez no

núcleo, este complexo liga-se a uma sequência de DNA, designada de *interferon-stimulated response element* (ISRE), um promotor que modula a transcrição de genes alvo (*interferon-stimulated genes* ou ISGs) (Kotenko, et al., 2003; Lau & Horvath, 2002; Sheppard, et al., 2003).

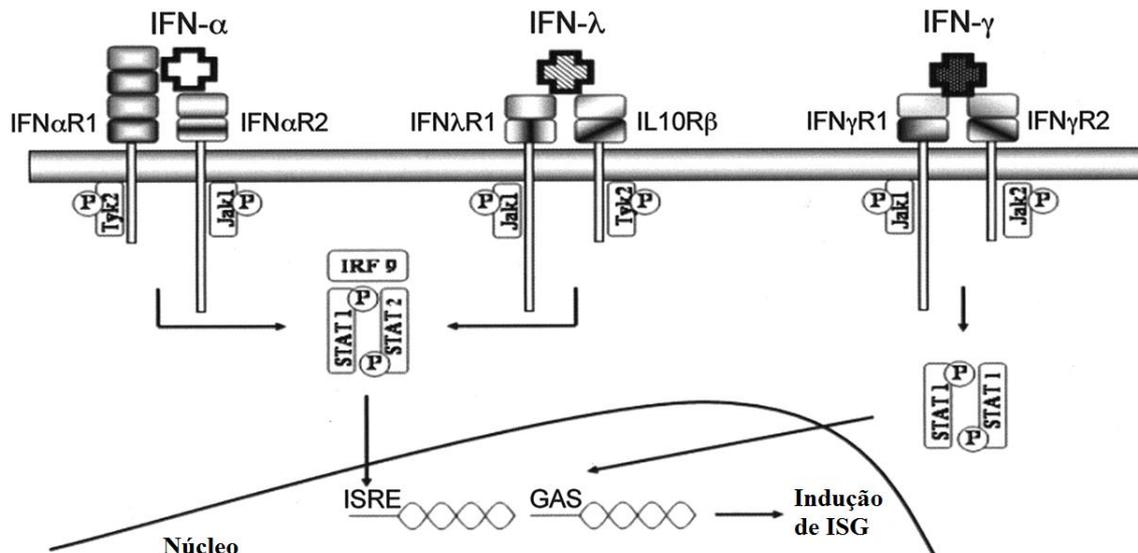


Figura 6: Via de sinalização de IFN. A ligação do IFN- α , IFN- λ e IFN- γ aos seus receptores conduz à expressão de genes alvo (*interferon-stimulated genes* ou ISG). O IFN- α e o IFN- λ partilham a mesma via de sinalização. A ligação ao receptor para o IFN- α/λ conduz a uma ativação e translocação das proteínas STAT1 e STAT2 e do *interferon regulatory factor 9* (IRF9) para o núcleo para induzir a expressão de ISGs através de ligação ao *interferon-stimulated response element* (ISRE). A via de sinalização do IFN- γ difere da anterior. A ligação ao receptor apenas ativa e transloca para o núcleo um homodímero de STAT1, que se liga ao γ -*activated sequence* (GAS) induzindo a expressão de ISGs. (adaptado de Marcello, et al., 2006).

1.5.4. Ribavirina

A ribavirina é um análogo de guanosina com um largo espectro de atividade antiviral em cultura de tecidos contra numerosos vírus de DNA e RNA (Sidwell, et al.,

1972). O mecanismo preciso pelo qual este fármaco atua sinergisticamente com o IFN continua uma incógnita, mas parece aumentar a segunda e terceira fases do decaimento viral, limitando assim a recaída. No entanto, foram propostos alguns mecanismos como: a atuação como agente mutagénico, ao incorporar-se no genoma do VHC (Crotty, et al., 2000), como inibidor da *RNA polimerase RNA dependente* (RdRP) (Maag, et al., 2001), como inibidor da enzima monofosfato ionosina desidrogenase, com depleção intracelular de guanosina necessárias para uma eficiente replicação do vírus (Zhou, et al., 2003), como ativador das células *T helper*, favorecendo a eliminação viral (Tam, et al., 1999), ou ainda como modulador da expressão de genes indutores do interferão (Feld, et al., 2007).

1.6. Fatores de resposta ao tratamento

O conhecimento dos fatores que influenciam a resposta ao tratamento é útil para avaliar o prognóstico e orientar a decisão terapêutica. A resposta ao tratamento é avaliada por parâmetros relacionados com a carga viral e a eliminação do vírus, principais determinantes da evolução da doença. Os principais parâmetros avaliados são: a resposta virológica sustentada, ausência de níveis de RNA do VHC no soro do paciente 24 semanas após o término do tratamento, a não resposta (NR), definida como a presença de RNA do VHC no soro do paciente no final do tratamento e mantendo-se passadas 24 semanas e a resposta virológica precoce (RVP), definida como redução superior a $2 \log_{10}$ do valor inicial de RNA do VHC no soro, às 12 semanas de tratamento (Yee, et al., 2006).

Hoje em dia, existem alguns fatores de resposta ao tratamento aceites pela comunidade científica e que permitem avaliar a probabilidade de não obter uma RVS, que incluem: infecção pelo genótipo 1 do VHC, carga viral inicial elevada (> 600.000

unidades internacionais/mililitro (UI/mL)), avançado estado de fibrose ou presença de cirrose, elevado índice de massa corporal, idade superior a 40 anos e raça Africana.

O genótipo do VHC é particularmente usado para tomar decisões sobre o tratamento: pacientes que estejam infetados com o genótipo 2 e 3 têm taxas relativamente elevadas de RVS (65%-82%) com 24 semanas de tratamento, ao passo que, aqueles que possuam infecção crónica por genótipos virais 1 e 4 têm taxas de RVS muito menores (40%-54%) apesar de 48 semanas de tratamento (Craxì, et al., 2011). Por outro lado, se às 12 semanas, não houver redução dos níveis de RNA do VHC no soro do paciente em pelo menos $2 \log_{10}$ UI/mL, ou seja, cerca de 99% relativamente à carga viral inicial, o tratamento deverá ser interrompido, devido à probabilidade mínima de RVS (1%-3%) (Craxì, et al., 2011).

Uma vez que a ausência de carga viral no soro do paciente é importante para uma eficaz monitorização da eficácia do tratamento, a sua monitorização deve ser realizada no início da terapia e às semanas 4, 12 e 24 de tratamento bem como passadas 24 semanas após o fim deste para assegurar uma eventual RVS. Uma virémia inicial superior 600000 UI/mL associa-se a uma diminuição da taxa de RVS (Craxì, et al., 2011).

O facto de apenas cerca de metade dos pacientes infetados com hepatite C atingirem a cura através de tratamento sugere que a influência da contribuição genética individual é crucial para a resposta ao tratamento. Assim colocou-se a hipótese de que polimorfismos no genoma do hospedeiro possam estar associados à maior ou menor possibilidade de RVS consoante a presença de alelos protetores ou de risco. A determinação destes polimorfismos pode ser útil para avaliar a probabilidade de um paciente vir a obter uma erradicação do vírus (Craxì, et al., 2011). Este facto pode

relacionar-se com a constatação de que a etnicidade das populações representa um fator de resposta ao tratamento do VHC.

1.7. O marcador da *IL28B*

A identificação de variantes genéticas polimórficas que expliquem a suscetibilidade genética a fenótipos complexos, neste caso a resposta à terapêutica da hepatite C com o INF, tem seguido duas estratégias principais: o estudo de genes candidatos e a análise global do genoma, ou *Genome Wide Association* (GWA). Ao contrário das estratégias usadas nos fenótipos monogénicos, estes estudos não recorrem a famílias com doentes para identificar *loci* em desequilíbrio de ligação com marcadores que segreguem com a doença (estudos de ligação), mas comparam populações de doentes e controlos na tentativa de identificar marcadores que apresentem diferentes frequências entre ambas as populações (estudos de associação) (Manolio & F.S., 2009).

A abordagem de genes candidatos, selecionados pela sua previsível relação fisiopatológica com a doença, tem como principais limitações, o número reduzido de polimorfismos ou *loci* estudados e a impossibilidade de se descobrirem associações não previstas.

Os estudos do tipo GWA envolvem a genotipagem, graças à tecnologia de *arrays*, de milhares de polimorfismos de nucleótido único (SNPs), distribuídos por todo o genoma, não limitados a regiões reguladoras ou a genes conhecidos, à procura de variações genéticas que se associem a determinado fenótipo, de forma agnóstica. Para a eficiência dos GWA muito contribuiu o projeto internacional HapMap, que teve como objetivo mapear as variações do genoma humano e identificar haplótipos e TagSNPs (International HapMap Consortium, 2003; International HapMap Consortium, 2005).

Na identificação de marcadores genéticos de resposta ao tratamento da hepatite C ambas as abordagens têm sido utilizadas, mas até ao momento os estudos do tipo GWA foram os únicos a identificarem um marcador que se veio a revelar de interesse clínico, o SNP rs12979860 (tabela II).

O SNP rs12979860, situado 3 kb a montante do gene *IL28B*, foi identificado por Ge e colaboradores como apresentando a associação mais forte de entre todos os SNPs (Ge, et al., 2009) com a presença de uma resposta virológica sustentada em doentes sob tratamento com INF. Vários estudos similares identificaram SNPs candidatos na mesma região (tabela II) (Rauch, et al., 2010; Suppiah, et al., 2009; Tanaka, et al., 2009).

Tabela II: Sumário dos GWAS mais importantes relativos à resposta ao tratamento da infeção pelo HCV.

Estudo	Ancestral	Tamanho da população	Caso/Controlo	SNPs Associados
Ge et al.	Caucasianos/Africanos/Hispânicos	1.186/299/130	SR /NR	rs12979860 (OR 3,10)
Suppiah et al.	Caucasianos	848	SR /NR	rs8099917 (OR 1,98)
Tanala et al.	Japoneses	314	VR /NVR	rs8099917 (OR 12,10)
Rauch et al.	Caucasianos	232	SR /NR	rs8099917 (OR 5,19)

GWAS, *genome-wide association studies*; OR, *odds ratio*; SR/NR, resposta virológica sustentada/resposta virológica não sustentada; VR/NVR, respondedores virológicos/respondedores virológicos nulos.

A variante de risco de ausência de resposta ao tratamento foi identificada como a transição de uma timina por uma citosina (C > T). Estudos posteriores em diferentes grupos étnicos confirmaram que indivíduos com o genótipo CC exibem uma probabilidade, aproximadamente duas a cinco vezes superior de responder com sucesso

ao tratamento padrão atual quando comparados com indivíduos com o genótipo TT ou CT (Ge, et al., 2009; McCarthy, et al., 2010; Montes-Cano, et al., 2010; Thompson, et al., 2010).

A frequência da eliminação do VHC varia marcadamente entre diferentes grupos étnicos, de acordo com a maior ou menor frequência do alelo de risco nessas populações. Através da genotipagem de indivíduos saudáveis por todo o mundo, constatou-se que o alelo protetor C tem uma maior prevalência na população Este Asiática, uma prevalência intermédia na Europa e em indivíduos caucasianos e uma baixa frequência na população Africana (figura 7) (Thomas, et al., 2009).

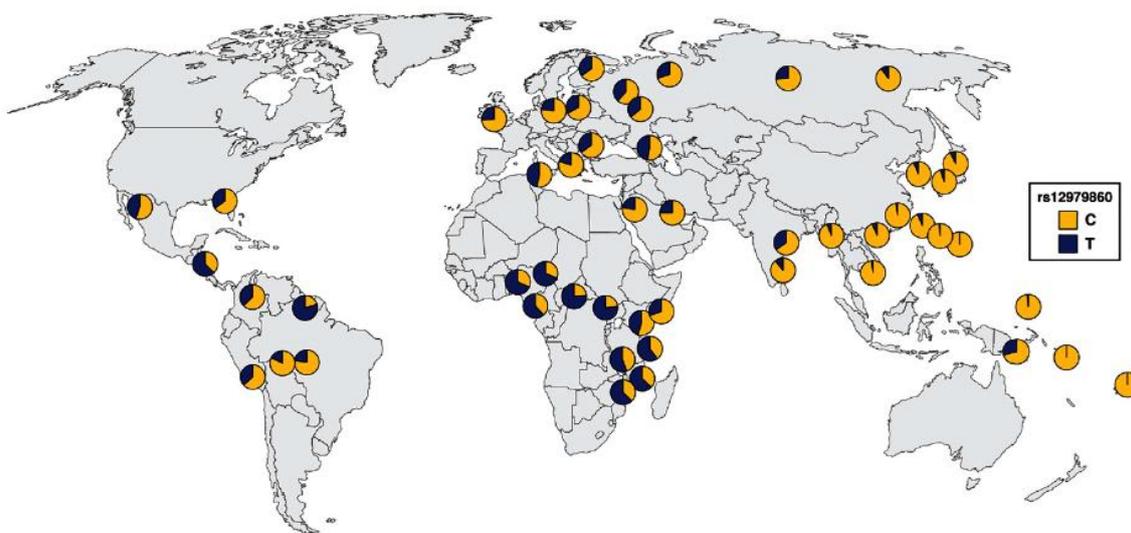


Figura 7: Frequências alélicas do polimorfismo rs12979860, entre diferentes etnias. Mapa com a prevalência da frequência do alelo da C, associada a uma taxa de RVS elevada e a prevalência da frequência do alelo T, associado a uma não resposta à terapia padrão. (adaptado de Thomas, et al., 2009)

Além da associação com a RVS, outras associações têm ganho relevo ao longo dos últimos anos. Verificou-se que o genótipo respondedor do rs12979860 tem as taxas

de RVS maiores em pacientes infetados com genótipos 2 e 3 do vírus, de melhor prognóstico, quando comparados com infetados com vírus do genótipo 1 (McCarthy, et al., 2010; Montes-Cano, et al., 2010). Contudo, esse mesmo genótipo respondedor parece associar-se a níveis de RNA virais iniciais mais elevados (Ge, et al., 2009; McCarthy, et al., 2010; Thompson, et al., 2010). Foi também encontrada uma forte associação do alelo protetor com a recuperação espontânea da infecção pelo vírus da hepatite C (Thomas, et al., 2009).

Apesar das diversas associações estabelecidas entre o rs12979860 e fatores de resposta ao tratamento atual para a hepatite C, desconhece-se o mecanismo envolvido, visto que este SNP se localiza numa região não codificante e muito distante da região reguladora do gene da *IL28B*. No entanto, a explicação mais plausível é uma possível interferência com os níveis de expressão desta interleucina, pela sua relação com o INF.

De facto, a *Interleucina 28B* é uma citocina que pertence à família do INF- λ , expressada em níveis reduzidos por uma variedade de células e induzindo significativamente uma resposta face a uma infecção viral, semelhante ao IFN- α (Li, et al., 2009). O recetor para IFN- λ é expresso essencialmente por tecidos epiteliais e hepatócitos, bem como por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (Sheppard, et al., 2003).

1.8. Polimorfismos da Bomba Exportadora de Sais Biliares

A formação de bÍlis é uma das funções chave que ocorre ao nível do fÍgado nos mamÍferos. O transporte de sais biliares do hepatÓcito para os canais biliares é efetuado por uma proteÍna da superfamÍlia de transportadores dependentes de adenosina trifosfato (ATP), *ATP-binding cassette* (ABC), a “bomba exportadora de sais biliares” (*bile salt export pump* ou BSEP) (Kullak-Ublick, et al., 2004; Meier & Stieger, 2002; Trauner &

Boyer, 2002). O gene que codifica a BSEP, *ABCB11* (ATP-binding cassette, subfamily B, member II), localiza-se no cromossoma 2 e está mutado em várias situações de colestase intra-hepática como a colestase intra-hepática familiar progressiva (PFIC) ou a colestase intra-hepática benigna recorrente (BRIC) (Byrne, et al., 2009; Pauli-Magnus, et al., 2005).

Um polimorfismo missense do gene *ABCB11*, V444A, correspondendo à transição 1331T > C, foi associado a baixos níveis de expressão de BSEP, à ocorrência de colestase da gravidez e colestase secundária à toma de contraceptivos orais (Meier, et al., 2006; Meier, et al., 2008), e, mais recentemente, à evolução para lesão hepática crónica em doentes com infeção pelo VHC (Iwata, et al., 2011).

Este polimorfismo é muito frequente em caucasianos. O genótipo 1331 CC encontra-se presente em cerca de 32.3% da população, o 1331 TT em 16.1% e o 1331 CT em 51.6% (NCBI, 2009). Embora ambos os aminoácidos valina e alanina possuam propriedades químicas semelhantes, o elevado grau de conservação em espécies mamíferas indica que, uma valina na posição 444 é essencial para o funcionamento normal da BSEP. Por outro lado, os portadores que possuem o alelo C na posição 444, exibem uma menor expressão da proteína transportadora hepática BSEP quando comparados com portadores para a variante correspondente a valina (Meier, et al., 2006).

Estudos recentes indicam que os sais biliares afetam a replicação do VHC pela supressão dos efeitos do interferão em modelos *in vitro* e a resposta à terapia com PEG-IFN em pacientes com infeção crónica. Os ligandos do recetor nuclear para os ácidos biliares, recetor X farnesoide (FXR), estimulam a replicação do VHC, ao passo que o silenciamento deste recetor, bem como o uso de antagonistas bloqueiam a sobre-regulação induzida pelos ácidos biliares (Chang & George, 2007; Scholtes, et al., 2008).

As observações realizadas até ao momento apontam para que a acumulação de sais biliares possa ser um marcador de mau prognóstico na previsão de RVS (Jorquera, et al., 2005; Lebovics, et al., 1997). Os pacientes que obtêm uma total eliminação viral após completar a terapia apresentam níveis séricos de concentrações de sais biliares significativamente mais reduzidos do que aqueles que não respondem ao tratamento, sugerindo uma possível relação entre a ausência de RNA viral e os níveis de sais biliares. Estas evidências suportam a hipótese de que a homozigotia para o alelo 1331C aumente a suscetibilidade para o desenvolvimento de infeção crónica do VHC (Iwata, et al., 2010). Diferenças significativas na resposta à terapia de acordo com os níveis de sais biliares também podem ser detetados no genótipo viral 2 e 3 e com uma significância estatística marginal no genótipo viral 1, o que evidencia a complexa interação entre hospedeiro e vírus.

A acumulação hepatocelular de sais biliares contribui também para o aumento de citocinas inflamatórias e quimocinas o que favorece eventos de fibrose hepática. A presença do polimorfismo 1331T > C foi associada ao aumento, para o dobro, do risco de desenvolvimento de cirrose hepática em pacientes com hepatite C crónica (Iwata, et al., 2011).

1.9. Outros polimorfismos

Os polimorfismos em genes do hospedeiro que estejam envolvidos no processo antiviral de resposta ao tratamento na hepatite C crónica são bons candidatos a fatores de previsão. Entre os vários polimorfismos para os quais estão descritas associações encontramos: polimorfismos em genes que codificam interleucinas (*IL*) como o rs1012356 (*IL22*) o 1188-A/C (*IL12B*) ou o 2592A (*IL10*), que podem interferir quer na resposta imunológica inata, quer na resposta farmacológica; polimorfismos no gene do

complexo de antígenos de leucócitos humanos (*HLA*), como o DRB1*1101, que interfere com a apresentação de antígenos às células T ou ainda polimorfismos do gene da apolipoproteína E (*APOE*), como as variantes *APOE**E2, *APOE**E3, *APOE**E4, que poderão interferir com o transporte da partícula viral do VHC na corrente sanguínea (Romero-Gomez, et al., 2011).

Em todos estes polimorfismos e muito outros, foram encontradas associações com a eliminação do VHC e/ou RVS. No entanto a grande maioria destes estudos continua a ser controversa, isto é, apresentam associação positiva num estudo e negativa noutro. Estes estudos necessitam de replicação a larga escala em várias etnias bem como de meta-análises exaustivas para definir melhor o interesse destes genes candidatos (Romero-Gomez, et al., 2011).

1.10. Objetivos

Recentemente, vários polimorfismos têm sido apontados como possíveis marcadores genéticos de resposta à terapêutica da infecção crónica pelo VHC. Neste trabalho, estudámos uma amostra de doentes com infecção crónica pelo VHC tratados com PEG-IFN e Ribavirina para verificar:

- Se os polimorfismos, rs12979860 (*IL28B*) e V444A (*ABCB11*) podem ser considerados fatores de prognóstico da resposta terapêutica.
- Se estes polimorfismos se correlacionam com outros fatores conhecidos de resposta à terapêutica como a idade, genótipo viral e carga viral.
- Qual a frequência destes genótipos na população assistida nos serviços de prestação de cuidados de saúde especializados.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1. Caracterização das populações estudadas

Estudaram-se um total de 117 doentes com infeção crónica pelo vírus da hepatite C, embora, para efeitos de resposta virológica, apenas tenha sido possível incluir 91 doentes neste estudo. Estes doentes eram seguidos no Hospital de Dia de Infeciosas do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra (CHUC). A população em análise era constituída por caucasianos oriundos da zona centro do país, 76.6% de homens e 26.4% de mulheres, entre os 26 e os 61 anos de idade (tabela III). Todos os participantes deram o seu consentimento informado por escrito para a participação neste estudo.

Tabela III: Constituição da população analisada.

Características	<i>n</i> (%)
Sexo	
Masculino	67 (76.6%)
Feminino	24 (26.4%)
Total	91
Idade	40.8* (26 – 61)**
Raça caucasiana	91 (100%)

*media de idades da população estudada; ** idade mais alta e mais baixa na população estudada; *n*, número de indivíduos

O protocolo terapêutico consistiu na administração de interferão peguilado α (2a ou 2b) combinado com ribavirina durante 24 semanas, para os genótipos virais 2 e 3 ou 48 semanas para os genótipos virais 1 e 4. A monitorização da resposta à terapêutica foi realizada por exames de deteção e quantificação de RNA viral no soro/plasma do paciente às 4, 12 e 24 semanas de tratamento e às 24 e 48 semanas após o término do tratamento para confirmação de eventual RVS. Às 12 semanas é definida uma eventual

RVP, isto é, diminuição de mais de 2 log₁₀ da virémia inicial. A par dos exames virológicos para detecção e quantificação do RNA do VHC são realizadas também análises bioquímicas completas, hemograma e testes de função hepática, para avaliar efeitos adversos da terapia.

A partir dos processos clínicos, recolheram-se dados do doente como idade, sexo, raça, genótipo viral, cargas virais, terapêutica realizada e resposta à terapia.

2.2. Caracterização Genotípica

2.2.1. Extração de DNA genómico

A extração do DNA realizou-se a partir de 10 mL de sangue periférico previamente colhido para tubos contendo EDTA e congelado até à sua utilização.

Recorreu-se ao método da ureia, adaptando a técnica previamente descrita (Miller, et al., 1988). Após o descongelamento, a amostra de sangue foi transferida para um tubo de Falcon de 50 mL e tratada com 40 mL de uma solução de lise de eritrócitos constituída por PBS 1X com 0.1% de IGEPAL. Esta solução promove a lise de eritrócitos e a libertação da hemoglobina. As amostras foram posteriormente colocadas num agitador automático durante 10 min e de seguida centrifugou-se a suspensão obtida durante 20 min a 600 g. Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se novamente o sedimento em 40 mL da mesma solução de lise de eritrócitos, repetindo-se este procedimento até à obtenção de sobrenadantes límpidos, para uma completa remoção da hemoglobina.

O sedimento resultante foi resuspenso com um tampão de lise de membranas constituído por uma solução contendo NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl, pH 7.4 e ureia 7 M. Adicionou-se 1 mL de cada vez até completa homogeneização. De seguida,

juntou-se SDS a 10% num volume correspondente a 1/5 do volume do homogeneizado e deixou-se incubar, durante a noite, a 37°C.

Para precipitar as proteínas existentes no homogeneizado, adicionou-se uma solução de NaCl a 6%, 1 mL por cada 3.5 mL de amostra, agitando-se vigorosamente e centrifugando-se depois durante 30 min a 1200 g. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um novo Falcon de 50 mL e adicionou-se etanol absoluto para precipitar o DNA. Recolheu-se o DNA com uma pipeta de Pasteur, lavando-o novamente com etanol absoluto e transferiu-se esse DNA para um *eppendorf* de 1.5 mL. Após a evaporação do etanol, o DNA foi eluído em 200 µL de água bidestilada e incubado a 65°C durante 30 min para inativação de DNAses e RNAses. As amostras foram conservadas a -20°C até à sua utilização.

2.2.2. Quantificação do DNA das amostras

Procedeu-se à quantificação do DNA e avaliação do grau de pureza de cada uma das amostras, por espectrofotometria, com leituras das absorvâncias dos comprimentos de onda de 260/280 nm e 260/230 nm, considerando-se normal o valor compreendido entre 1.8-2.0 e 1.8-2.2 respetivamente. Para este efeito, utilizou-se o aparelho de espectrofotometria nanodrop (Nanodrop ND-1000).

2.3. Estudo dos polimorfismos

O polimorfismo associado à *IL28B*, rs12979860, foi caracterizado por sequenciação automática pelo método de Sanger. O SNP, V444A ou rs2287622, no exão 13 do gene *ABCB11*, foi caracterizado pela técnica *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP).

2.3.1. Genotipagem do marcador da IL28B

Selecionámos o locus com a associação mais significativa encontrada no estudo tipo GWA realizado por Ge e colaboradores (2009), o SNP rs12979860 (C > T), situado a montante do gene da *IL28B*.

A reação de amplificação foi efetuada num volume total de 25 µL contendo: 200 ng de DNA, 0.2 nM de dNTPs (Biolabs), 0.2 µM de cada primer (Invitrogen™), 1.5 µM de MgCl₂ (Nzytech), 0.03 unidades de Taq DNA polimerase (Nzytech) e tampão 1x (Nzytech). Os primers usados foram previamente desenhados no programa informático *Beacon Designer* (tabela IV). As amplificações foram realizadas num termociclador, *My Cycler* (Bio-Rad) sob as seguintes condições: desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos, cada um constituído por uma desnaturação de 30 segundos a 95°C, uma hibridização dos primers de 30 segundos a 60°C e uma extensão de 30 segundos a 72°C, finalizando-se com uma extensão de 10 minutos a 72°C. O amplicom pretendido tinha 242 pares de bases (pb). Utilizaram-se sempre controlos positivos e controlos negativos.

Tabela IV: Primers utilizados no estudo dos polimorfismos

Gene	SNP*	Primers
<i>Interleucina 28B</i>	rs12979860 C > T*	Proximal: 5' GCT TAT CGC ATA CGG CTA GC 3' Distal: AGG CTC AGG GTC AAT CAC AG 3'
<i>ABCB11</i>	V444A T > C*	Proximal: 5' ACA CCG AGT ATC AAC ACA AAG C 3' Distal: 5' CCA GGA CAG TCT CAA TGT ATG C 3'

* número de acesso do GeneBank: rs12979860 (NT_011109.16); V444A (NM_003742).

Para verificar a amplificação, as amostras submetidas a PCR foram corridas numa eletroforese em tina horizontal. Utilizou-se um gel de agarose a 2% (p/v) (1.2 gr de agarose, 60 mL de TAE 1x e 5 µL de brometo de etídio), em tampão TAE a uma voltagem de 100 volts. Em cada poço do gel, colocaram-se 5 µL da amostra amplificada e 1 µL de loading buffer tipo IV. Para visualização das bandas recorreu-se a um transiluminador de UV (Vilber Lourmat).

De seguida, procedeu-se à genotipagem do fragmento de 242pb por sequenciação automática.

Para tal, as amostras amplificadas foram submetidas a uma primeira purificação do produto de PCR através do kit, *Jet Quick PCR Product Purifications Spin kit/250* (Genome) para eliminação do excesso de primers e de sais. Na reação de sequenciação, para um total de 20 µL utilizaram-se: 2 µL do produto de PCR purificado, 2 µL de solução de terminadores (*BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit*, Applied Biosystems), que para além dos terminadores contém dNTPs, uma DNA polimerase e tampão, e 2 µL do primer proximal. As condições da reação de sequenciação foram as seguintes: desnaturação inicial de 1 minuto a 96°C seguida de 25 ciclos, cada um composto por uma desnaturação de 10 segundos a 96°C, uma hibridização de 5 segundos a 50°C e uma extensão de 4 minutos a 60°C, no termociclador *My Cycler* (Biorad). O produto da PCR de sequenciação foi novamente purificado para remover o excesso de terminadores e de primers, com o kit, *Auto Seq[™] G-50 Dye Terminator Removal kit* (GE Healthcare). A eletroforese de sequenciação efetuou-se num *AbiPrism 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram analisadas recorrendo ao programa informático *Sequencing Analysis* (versão 5.2) (figura 8).

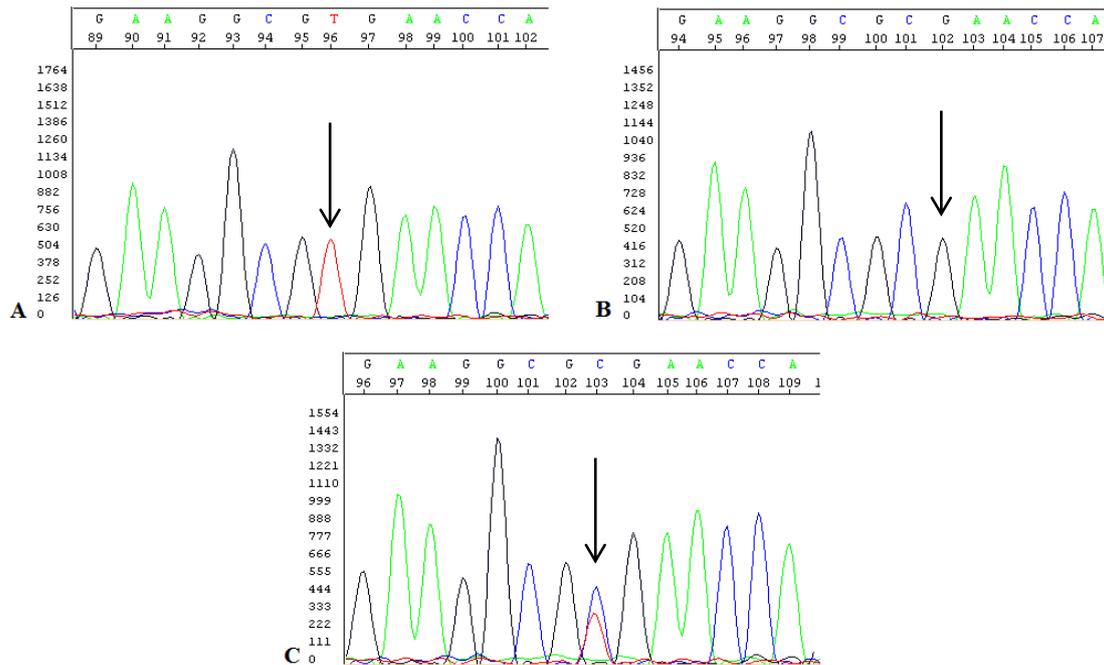


Figura 8: Eletroferogramas representativos dos três genótipos possíveis relativos ao polimorfismo rs12979860 situado a montante da *IL28B*. (A) Eletroferograma que mostra a presença de homozigotia para timina. (B) Eletroferograma que corresponde a homozigotia para citosina. (C) Eletroferograma representativo de heterozigotia

2.3.2. Genotipagem do *ABCB11*

A técnica de RFLP é utilizada para detetar variações conhecidas, mutações ou polimorfismos, que interfiram com um *site* de restrição de uma endonuclease. Estas enzimas reconhecem sequências específicas de DNA de cadeia dupla que digerem, originando fragmentos que são depois separados e identificados por eletroforese. O SNP, V444A ou rs2287622, foi identificado com a enzima de restrição *Hae III* (figura 9). Amplificou-se um segmento de 327 pb, que na presença do *site* de restrição, correspondente ao alelo com citosina, origina, após digestão, um segmento de 307 pb e um outro de 120 pb. Na presença do alelo com timina, não há digestão, permanecendo o segmento inicial de 327 pb.

Para a reação de PCR, num volume total de 25 μ L, utilizaram-se: 200 ng de DNA, tampão 1x (Nzytech), 0.2 nM de dNTPs (Biolabs), 1 μ M de $MgCl_2$ (Nzytech), 0.2 μ M de cada primer (proximal e distal) (InvitrogenTM) e 0.03 unidades de Taq DNA polimerase (Nzytech). Os primers foram previamente desenhados através do programa *Beacon Designer* (tabela IV). As amplificações foram realizadas sob as seguintes condições: uma desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos, cada uma com uma desnaturação de 30 segundos a 95°C, uma hibridização dos primers de 30 segundos a 56°C e uma extensão de 30 segundos a 72°C, finalizando-se a reação com uma extensão de 10 minutos a 72°C, num termociclador *My Cycler* (Biorad). Utilizaram-se sempre controlos positivos e controlos negativos.

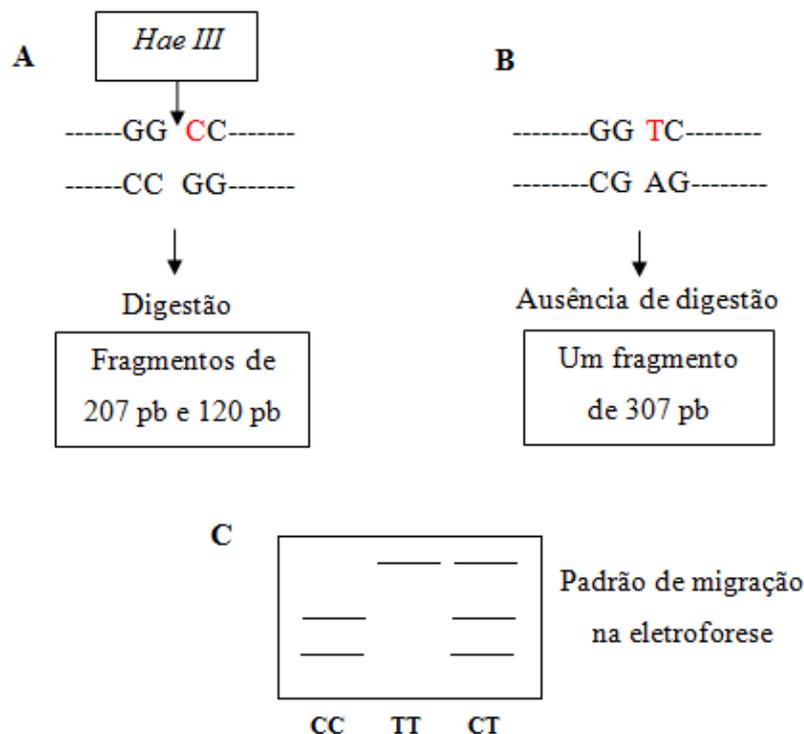


Figura 9: Identificação do polimorfismo V444A por RFLP. (A) Alelo com a sequência de restrição reconhecida pela *Hae III*. (B) Alelo sem a sequência de restrição. (C) Padrão da eletroforese dos 3 genótipos: homozigotos para o alelo C (com a sequência de restrição), homozigotos para o alelo T (sem a sequência de restrição) e heterozigotos.

Para verificar a amplificação realizou-se uma eletroforese nas mesmas condições anteriormente descritas. As amostras amplificadas foram digeridas, utilizando, para um volume final de 11 μ L, 9 μ L de produto de PCR, 0,27 unidades da enzima de restrição, *Hae III* (Takara) e tampão 1x (Takara), incubando durante a noite a 37°C. Os fragmentos foram analisados num gel de agarose a 3% (2,4 gr de agarose, 80 mL de TAE 1x, 8 μ L de brometo de etídio) e visualizados no transiluminador de UV (figura 10).

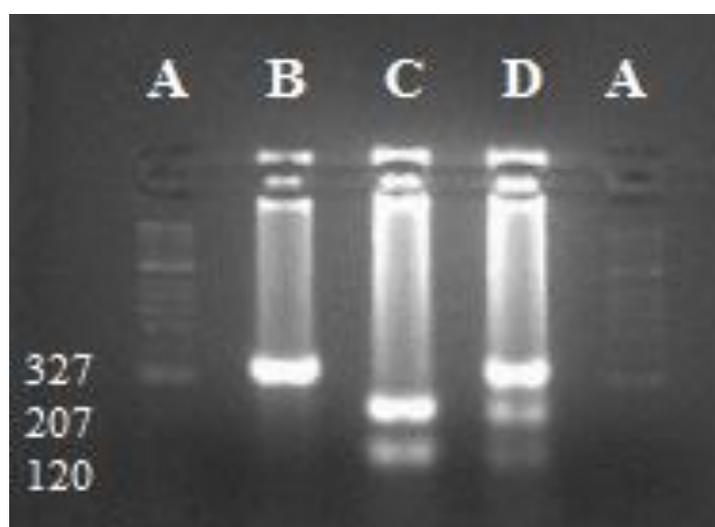


Figura 10: Análise da variante polimórfica, V444A do gene *ABCB11* por RFLP. Produto da digestão de um fragmento de 327pb visualizado através do GelDoc 2000 (Bio-Rad). (A) Marcador de peso molecular HyperLadder™ IV (Bioline). (B) Indivíduo homocigótico para o alelo T, sem local de restrição, originando um único fragmento de 327pb. (C) Indivíduo homocigótico para o alelo C, com um local de restrição, originando dois fragmentos, de 207 pb e 120 pb. (D) Indivíduo heterocigótico CT para a variante V444A, com local de restrição num dos alelos, apresentando três fragmentos (327 pb, 207 pb e 120 pb).

Para a otimização inicial da técnica de RFLP utilizaram-se amostras representativas dos 3 genótipos, previamente sequenciadas por um protocolo

semelhante ao anteriormente descrito, no mesmo *AbiPrism 3130 Genetic Analyser*.

Estas amostras foram igualmente utilizadas para controlos positivos (figura 11).

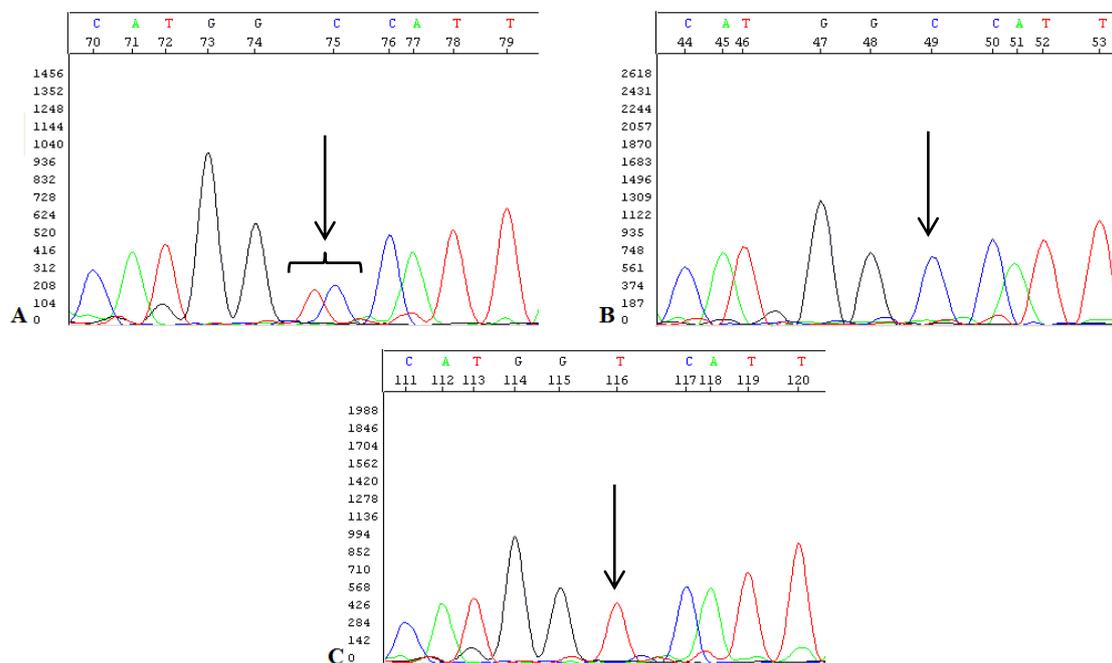


Figura 11: Eletroferogramas representativos dos três genótipos possíveis relativos ao polimorfismo V444A, situado no exão 13 do gene *ABCB11*.

(A) Eletroferograma representante da heterozigotia para o polimorfismo V444A, presença dos alelos T e C (genótipo TC). (B) Eletroferograma de homozigotia para o alelo mutado, alelo C (genótipo CC). (C) Eletroferograma correspondente à homozigotia para o alelo *wild-type*, alelo T (genótipo TT).

2.4. Amplificação e quantificação da carga viral

A quantificação da carga viral, no soro de pacientes com infeção crónica pelo VHC foi realizada pelo teste *COBAS[®] AmpliPrep/COBAS[®] TaqMan[®] HCV* (Roche), um teste de amplificação de ácidos nucleicos *in vitro*, totalmente automatizado. A preparação das amostras é realizada pelo equipamento *COBAS[®] AmpliPrep* (Roche) ao passo que a amplificação e deteção do RNA do VHC é processada no Analisador *COBAS[®] TaqMan[®] 48* (Roche).

A técnica baseia-se em três processos principais: preparação das amostras, transcrição reversa e PCR em tempo real. Como controlo e para homogeneizar os resultados é usado um controlo interno da reação, designado por Produto de Quantificação (PQ), que consiste numa sequência de RNA não infecciosa que contém sequências do VHC com locais de ligação aos primers idênticos aos do RNA do VHC alvo e uma região única de ligação de sonda que permite que o amplicom do PQ se distinga do amplicom alvo. Este controlo é incorporado em cada amostra e submetido a todo o processo.

A preparação automatizada das amostras é realizada a partir de 1 mL de soro do paciente por uma técnica de captura à base de sílica. Simultaneamente processam-se 1 mL de controlo positivo com níveis elevados do VHC, 1 mL de controlo positivo com baixos níveis do VHC e 1 mL de controlo negativo de plasma. As partículas virais são lisadas e os ácidos nucleicos libertados por incubação a temperaturas elevadas com uma protease e tampão caotrópico. As amostras são depois transferidas para o Analisador COBAS® TaqMan® 48.

A transcrição reversa e amplificação são efetuadas com a enzima termoestável recombinante, *Thermus specie DNA polimerase* (Z05). A Z05 possui atividade simultânea de transcriptase reversa e de polimerase de DNA.

O uso de sondas fluorescentes duplamente marcadas (TaqMan) possibilita a deteção em tempo real da acumulação de produtos de PCR pela monitorização e registo da emissão de fluorescência. As sondas consistem em sondas oligonucleotídicas específicas para o VHC alvo e para o PQ. As sondas do VHC alvo e do PQ estão marcadas com substâncias que emitem diferentes fluorescências. As condições do processo de amplificação e quantificação da carga viral realizaram-se de acordo com as indicações do fabricante.

O analisador COBAS[®] TaqMan[®] 48 calcula a concentração de RNA do VHC presente nas amostras, comparando o sinal do VHC com o sinal do PQ em cada amostra e controlo. A análise dos resultados é feita pelo programa informático AMPLILINK[®] (versão 3.2.2) (figura 12).

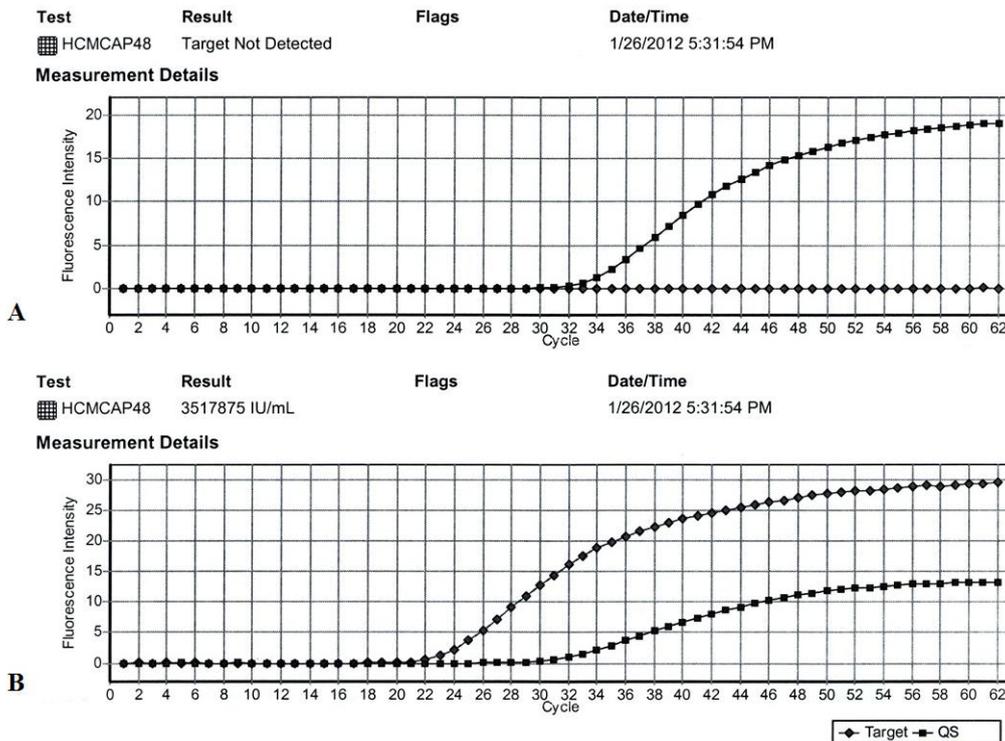


Figura 12: Resultado final do processo de amplificação e quantificação da carga viral do vírus da hepatite C, através do instrumento COBAS[®] analisado pelo programa informático AMPLILINK[®] (versão 3.2.2). (A) Carga viral negativa, ausência de fluorescência da curva *Target* (amostra alvo de estudo) comparado com a curva de *quantification standard* (QS). (B) Presença de carga viral na amostra de estudo curva *Target* com níveis de fluorescência superiores à curva QS apresentando 3.517.875 UI/mL do vírus da hepatite C.

2.5. Genotipagem do Vírus da Hepatite C

O genoma do VHC consiste numa região central (*core*) que codifica as proteínas estruturais e não estruturais e em regiões não codificantes, 5'-NCR (ou UTR) e a 3'-

NCR (ou UTR). A região 5'-NCR e a *core* são altamente conservadas. A região 5'-NCR contém múltiplos motivos específicos que permitem a determinação do genótipo viral. A determinação do genótipo do VHC foi realizada através do teste, *VERSANT HCV Amplification 2.0* (LiPA). Este teste permite a identificação do genótipo e diferenciação dos subtipos em plasma ou soro humano positivos para RNA do VHC, através da técnica de RT-PCR associada a hibridização reversa. Para a amplificação do cDNA utilizam-se primers marcados com biotina para amplificar duas sequências, uma da região 5'UTR e outra da região *core*, que contêm variações específicas dos tipos e subtipos virais. Posteriormente, as sequências amplificadas e marcadas com biotina, são hibridizadas com sondas específicas dos vários subtipos do VHC, imobilizadas num suporte de nitrocelulose. A visualização obtém-se por uma reação colorimétrica após adição de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina e do substrato cromogénico BCIP/NBT (Bio-blots). As tiras de nitrocelulose contêm 3 sondas controlo, incluindo um controlo da reação colorimétrica e controlos da PCR, e 22 sondas específicas dos genótipos do VHC.

O RNA do VHC presente nas amostras foi extraído a partir de 500 µL de plasma de doentes infetados, usando o kit *QIAamp DSP Virus kit* (QIAGEN). Este procedimento é realizado utilizando as colunas do MinElute QIAamp num sistema de vácuo. Inicialmente as amostras foram lisadas em 500 µL de um tampão de lise e 75 µL de protease, seguido de homogeneização em vórtex e uma incubação durante 15 min a 56°C. Adicionaram-se 600 µL de etanol, procedeu-se a homogeneização em vórtex e nova incubação de 5 min à temperatura ambiente. Transferiu-se depois o lisado para a coluna do MinElute QIAamp; fez-se passar o lisado pela coluna por vácuo, ficando os ácidos nucleicos absorvidos na membrana de gel de sílica da coluna. Removeram-se os contaminantes residuais através de lavagens com soluções tampão, seguidas de

aplicação de vácuo, com 600 µL de AW1, 600 µL de AW2 e por fim 750 µL de etanol. Retirou-se a coluna do aparelho de vácuo, centrifugou-se a 20.000 x g para secar a membrana, aplicou-se a coluna num novo tubo coletor e deixou-se secar por incubação a 56°C durante 3 minutos. Finalmente procedeu-se à eluição dos ácidos nucleicos puros da membrana da coluna MinElute QIAamp aplicando-se 20 a 60 µL do tampão de eluição (AVE), seguido de incubação à temperatura ambiente por 3 a 5 minutos, e centrifugação a 20.000 x g por um minuto. Em cada ensaio são sempre incluídas uma amostra de controlo positivo e uma de controlo negativo que vêm no kit, *Versant Control 2.0* (LiPA).

A síntese de DNA complementar do VHC e a amplificação foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante do kit *VERSANT HCV Amplification 2.0* (LiPA). A *Master mix* foi preparada usando a *ENZ MIX* e a *AMP MIX* fornecida (26 µL de AMP MIX para 4 µL de ENZ MIX para cada amostra). Para cada amostra adicionaram-se 30 µL de *master mix* a 20 µL de RNA do VHC extraído. A reação foi realizada no termociclador, *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com as seguintes etapas: transcrição reversa de 30 minutos a 50°C, passo inicial da ativação da PCR de 15 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos constituídos por: desnaturação de 30 segundos a 95°C, hibridização de 30 segundos a 50°C e extensão de 15 segundos a 72°C, finalizando-se com uma extensão final de 2 minutos a 72°C.

A hibridização reversa é automatizada recorrendo-se a um *Autoblot 3000H* (MedTec) de acordo com as especificações do fabricante. No fim obtém-se um registo de bandas correspondendo às sequências hibridizadas (figura 13).

Os genótipos do VHC são determinados através do alinhamento das bandas obtidas com um cartão de leitura padrão. O programa informático *LiPA Scan HCV*

Interpretation Software (Siemens) é usado para interpretar os padrões das bandas para genotipagem e subtipagem.

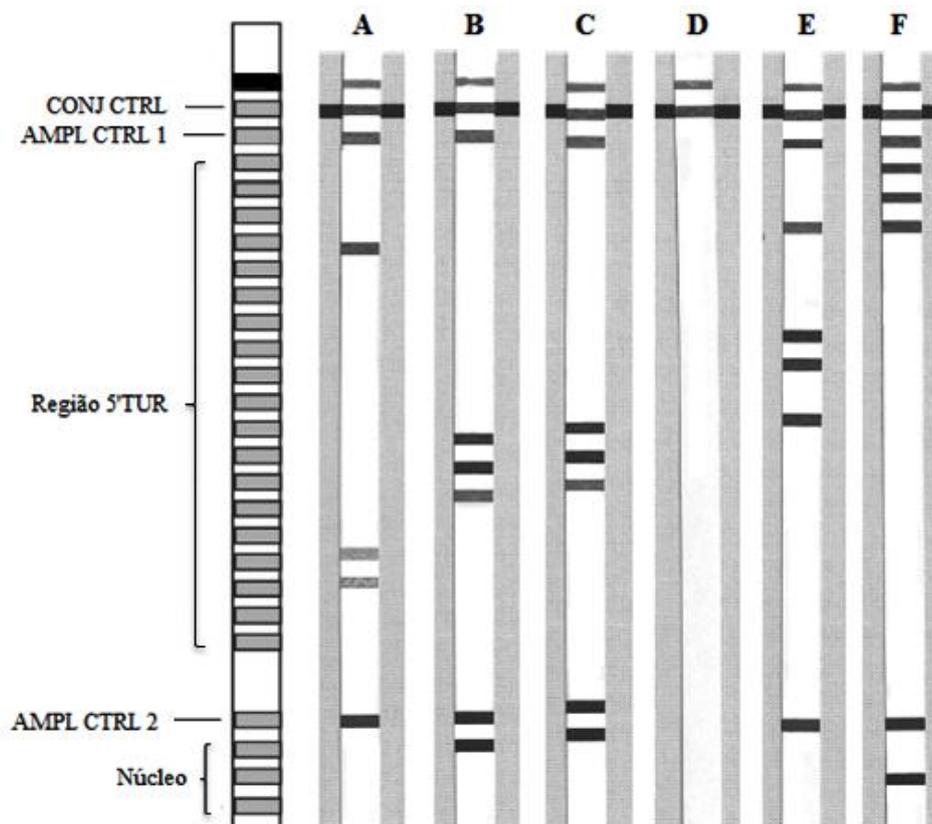


Figura 13: Representação do ensaio *VERSANT HCV Amplification 2.0* (LiPA), com a faixa controle (esquerda) e restantes amostras (A-F). (A) genótipo 6 do VHC; (B) e (C) genótipo 3a do VHC; (D) controle negativo; (E) genótipo 2b do VHC; (F) genótipo 1a do VHC. CONJ CTRL, controle conjugado; AMPL CTRL 1, amplificação controle 1; AMPL CTRL 2, amplificação controle 2. (adaptado de Verbeeck, et al., 2008)

Com este teste poderá haver erro na classificação do genótipo viral de 4% das amostras quando comparado com o teste padrão, a sequenciação da região NS5B, o que torna o teste automatizado mais fiável e o mais usado na prática clínica.

2.6. Estatística

Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, recorrendo ao programa MedCalc (MedCalc Software, versão 12.3.0, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium). Realizou-se o teste de χ^2 para analisar a relação de independência entre variáveis qualitativas nominais respeitando os dois pressupostos do teste: nenhuma célula da tabela deve ter uma frequência inferior a 1 e não existir uma frequência esperada inferior a 5 em mais de 20% das suas células.

Para os valores de χ^2 estatisticamente significativos ($P < 0.05$) procedeu-se à realização da análise das variáveis através do rácio de produtos cruzados (*Odds ratio*, OR). Este teste faz a associação entre os indivíduos expostos e obtenção de resposta, neste caso, quanto maior o OR melhor é a associação.

A análise da média das idades foi realizada através do teste t-student no programa Microsoft Excel (© 2012 Microsoft). Neste teste existe significância estatística para $P < 0.05$.

Efetuuou-se ainda o teste Hardy-Weinberg para ver se a população estava em equilíbrio.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

A identificação de marcadores de resposta à terapia da hepatite C é atualmente, para a comunidade científica, uma questão importante para a decisão terapêutica, com a atual terapia a mostrar-se insuficiente em muitos doentes e por vezes associada a efeitos adversos graves e com perspectiva de opção por novos fármacos, cujo preço excessivo imporá critérios de seleção judiciosos.

Em pacientes com hepatite C crónica, a obtenção de resposta viral sustentada à terapia combinada, PEG-INF/RBV, revela-se dependente de características quer do hospedeiro quer do vírus (Kau, et al., 2008). Além do genótipo e carga viral, temos vários fatores clínicos relativos ao paciente importantes na resposta viral, como a idade, género, etnicidade, coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e/ou como o vírus da hepatite B (VHB), cirrose, obesidade e ingestão de álcool (Kau, et al., 2008; National Institutes of Health, 2002). A intensa investigação nesta área, embora com resultados controversos, revelou uma associação de polimorfismos localizados em genes reguladores da atividade antiviral mediada pelo IFN e em múltiplos outros genes relacionados com o transporte e infeciosidade das partículas virais ou ainda com a resposta do hepatócito (Ge, et al., 2009; Iwata, et al., 2010; Rauch, et al., 2010; Stieger & Geier, 2011; Suppiah, et al., 2009; Tanaka, et al., 2009).

A necessidade de definir marcadores clinicamente úteis, a controvérsia dos resultados publicados e a falta de referências relativamente à população portuguesa, motivaram este estudo, que tem como principal objetivo avaliar a influência dos polimorfismos rs12979860, marcador associado à *IL28B*, e V444A, um SNP do gene *ABCB11*, que codifica uma bomba transportadora de sais biliares, na resposta à terapia combinada atual, numa amostra da população da região centro do país com diagnóstico de hepatite C crónica.

3.1. Caracterização da população

Estudaram-se um total de 117 doentes (tabela V) com infeção crónica pelo VHC, embora, para efeitos de resposta virológica, apenas tenha sido possível incluir 91 doentes. A população era toda constituída por caucasianos oriundos da zona centro do país, com uma média de idades de 40 anos. Esta média de idades foi estatisticamente igual quer para a população que obteve RVS, quer para a população que não respondeu, não existindo assim, na nossa amostra, associação significativa entre a idade e a resposta viral.

Relativamente ao género, o sexo masculino foi aquele onde se obteve uma maior frequência de doentes infetados (80.2%), o mesmo se verificando nos doentes que responderam positivamente ao tratamento (83.5%). Mais uma vez não se obteve qualquer significância estatística entre o género e a resposta ao tratamento. Estes resultados são inesperados, uma vez que, é já aceite pela comunidade científica que, uma idade inferior a 40 anos e o género feminino são fatores de bom prognóstico e se associam à RVS (Bakr, et al., 2006; Iwata, et al., 2010; Micallef, et al., 2006; Page, et al., 2009).

Quanto à presença de outras infeções como a hepatite B mas, principalmente, o VIH, 78% dos pacientes não as apresentaram. Embora sem diferenças estatisticamente significativas, verificou-se que a RVS foi mais frequente no grupo sem infeções associadas, confirmando que a coinfeção com outras doenças, nomeadamente VIH, traz riscos acrescidos de falência terapêutica, em parte por necessidade de interromper o tratamento devido à toxicidade sinérgica dos fármacos usados (Bräu, et al., 2004; Myers, et al., 2004).

Tabela V: Caracterização da amostra da população em estudo.

Características		Global	RVS		NR	P*	
		(n = 91)	(n = 67)	(%)	(n = 24)		(%)
Sexo	Masculino	73 (80.2%)	56	83.5	17	70.8	ns
	Feminino	18 (19.8%)	11	16.5	7	29.2	
Idade	média; dp	40.7; 7.9	40.6; 8.1		41.2; 7.0		ns
	< 40 anos	42 (46.2%)	31	46.3	11	45.8	ns
	≥ 40 anos	49 (53.8)	36	53.7	13	54.2	
Outras infecções	Sim	20 (22%)	14	20.8	6	25	ns
	Não	71 (78%)	53	79.2	18	75	

* Nível de significância associado à realização do teste χ^2 entre a RVS e NR para cada uma da característica da população em estudo, exceto para a média das idades, parâmetro para o qual se usou o teste *t* de Student; ns, $P > 0.05$; RVS, resposta virológica sustentada; NR, ausência de RVS; *n*, número de indivíduos; dp, desvio padrão.

3.2. Determinação das frequências alélicas e genótípicas

3.2.1. Polimorfismo marcador do gene da *IL28B*

As frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo marcador da *IL28B* (rs12979860) não estavam, ainda, descritas para a população portuguesa. Os dados mostram que a frequência do alelo “protetor”, C, na população estudada, foi de 67.5%, ao passo que, a frequência do alelo “de risco”, T, foi de 32.5%. Estes valores estão de acordo com a bibliografia existente, que aponta, para a população caucasiana, frequências que variam entre 60%-70% para o alelo C e de 30%-40% para o alelo T (Ge, et al., 2009; Thomas, et al., 2009; McCarthy, et al., 2010; Montes-Cano, et al., 2010). A distribuição das frequências genótípicas vai ao encontro da das frequências alélicas, com o genótipo CC a apresentar, 47.9% e o genótipo TT apenas 12.8%, correspondendo os heterozigotos a 39.3% (tabela VI). Estes valores são semelhantes aos

referenciados para populações caucasianas (Langer, et al., 2004; Moghaddam, et al., 2011; Montes-Cano, et al., 2010). As frequências genótípicas obtidas respeitam o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Três estudos (Ge, et al., 2009; Thomas, et al., 2009; Thompson, et al., 2010) mostram que a população com descendência africana é a etnia que apresenta as frequências mais baixas relativamente ao alelo C “protetor”, cerca de 40% apresentando o genótipo CC uma frequência de 16%, ao passo que, cerca de 37% da população apresentava o genótipo TT.

Verificou-se que o polimorfismo rs12979860 está fortemente associado com a RVS para a população caucasiana estudada. Pela análise da tabela VI, notamos que, à semelhança de outros estudos (McCarthy, et al., 2010; Montes-Cano, et al., 2010), o genótipo CC, se associa a uma frequência de RVS mais elevada, 56.7%. No entanto, a taxa de RVS na nossa população é mais baixa relativamente a outros estudos que apontam para valores de 82% (Ge, et al., 2009) e 69% (Thompson, et al., 2010).

Tabela VI: Polimorfismo rs12979860, frequências genótípicas e correlação com a RVS.

Genótipos	Global (n = 117)	RVS (n = 67)	NR (n = 24)	P*, OR (95% IC)
CC	56 (47.9%)	38 (56.7%)	5 (20.8%)	0,0026; 6,1 (1.88 – 19.79)
CT	46 (39.3%)	23 (34.3%)	10 (41.7%)	
TT	15 (12.8%)	6 (9%)	9 (37.5%)	

* nível de significância associado à realização do teste χ^2 entre a RVS e NR para os diferentes genótipos; RVS, resposta virológica sustentada; NR, ausência de RVS; n, número de indivíduos; OR, *odd ratio*, calculado para os genótipos CC e CT em comparação com o TT, relativamente à presença ou ausência de RVS.

Verifica-se igualmente, que os doentes com os genótipos com homozigotia ou heterozigotia para o alelo C (CC e CT) têm uma probabilidade de atingir a RVS cerca de 5 vezes superior à dos doentes homozigotos para o alelo T ($P = 0.0069$; OR = 5.1; IC95%: 1.56 – 16.64) (tabela VI). Estes valores estão de acordo com estudos prévios, realizados em caucasianos, com *odds ratios* que variam entre 7.3 e 5.79 (Ge, et al., 2009; McCarthy, et al., 2010).

Permanece mal explicada a razão da associação deste SNP, não codificante e distando várias kb do gene mais próximo, a *IL28B*. Para além de poder interferir com a regulação da transcrição do gene da *IL28B*, é possível que este polimorfismo esteja em desequilíbrio de ligação com outras variantes, elas sim diretamente relacionadas com o fenótipo em causa (Ge, et al., 2009; Rauch, et al., 2010).

3.2.2. Gene *ABCB11*

O efeito do polimorfismo V444A (1331T > C) na obtenção de RVS face ao tratamento da infeção crónica pelo VHC, não tem sido explorado e as frequências alélicas e genóticas nas populações caucasianas são ainda muito escassas.

Estudaram-se as frequências alélicas e genóticas para este polimorfismo, bem como a correlação entre os diferentes genótipos e a presença ou ausência de RVS (tabela VII). Constatou-se assim, que o alelo T apresentava uma frequência de 43.6%, enquanto o alelo C tinha uma frequência de 56.4%. Estes valores respeitam o equilíbrio de Hardy-Weinberg. A pouca literatura existente indica uma frequência para o alelo de risco próxima dos 60% (Iwata, et al., 2011; Iwata, et al., 2010; Meier, et al., 2008).

Relativamente aos genótipos, as frequências foram de 15.4% para os homozigotos CC, de 28.2% para a homozigotos TT e de 56.4% para os heterozigotos. Estes dados são corroborados por estudos prévios (Iwata, et al., 2010; Iwata, et al.,

2011), embora apresentando pequenas diferenças e com a base de dados do NCBI (NCBI, 2009). Contrariamente ao polimorfismo marcador da *IL28B*, o rs12979860, o polimorfismo V444A não apresentou uma associação estatisticamente significativa com a RVS (Tabela VII). Contudo não podemos deixar de notar o aumento da frequência do genótipo TT nos doentes que alcançaram a RVS. Esperamos que estudando uma população de maior dimensão esta diferença venha a ter significado estatístico.

Um estudo recente (Iwata, et al., 2011) sugere um ligeiro aumento da frequência do alelo C na população de doentes com hepatite C, relativamente a controlos não infetados (OR = 1.41; IC95%: 1.012 – 1.965). O mesmo se verifica para o genótipo CC. O estudo também revela uma associação, estatisticamente significativa ($P = 0.01$), entre o genótipo CC e o aumento da ocorrência de cirrose nos doentes com hepatite C. Por dificuldades na recolha de dados, na nossa amostra não nos foi possível estudar esta associação.

Tabela VII: Polimorfismo V444A, frequências genótípicas e correlação com a RVS.

Genótipos	Global (<i>n</i> = 117)	RVS (<i>n</i> = 67)	NR (<i>n</i> = 24)	<i>P</i>*
C/C	33 (28.2%)	16 (23.9%)	6 (25%)	ns
C/T	66 (56.4%)	37 (52.2%)	17 (70.8%)	
T/T	18 (15.4%)	14 (20.9%)	1 (4.2%)	

* Nível de significância associado à realização do teste χ^2 entre a RVS e NR para o genótipo V444A; RVS, resposta virológica sustentada; NR, ausência de RVS; *n*, número de indivíduos; ns, $P > 0.05$.

O alelo C foi associado a uma redução dos níveis de expressão da proteína BSEP (Byrne, et al., 2009; Lang, et al., 2007; Meier, et al., 2006; Meier, et al., 2008), a

proteína codificada pelo gene *ABCB11*, possivelmente por interferência com o splicing ou por incorreto processamento da BSEP (Byrne, et al., 2009). A acumulação de sais biliares, por mecanismos ainda pouco claros, conduziria a uma diminuição dos níveis de eliminação viral, podendo a presença de sais biliares constituir um marcador de prognóstico negativo na previsão da RVS (Stieger & Geier, 2011).

3.3. Outros fatores de resposta

Analisou-se igualmente a correlação entre a RVS e outros marcadores de resposta à terapêutica já conhecidos como a carga viral, o genótipo viral e a resposta virológica precoce (tabela VIII).

Para efeitos de análise, associaram-se os genótipos virais 1 e 4, relacionados com uma má resposta à terapêutica, e os genótipos 2 e 3, considerados marcadores de boa resposta à terapêutica. Verificou-se uma maior frequência de doentes infetados com os genótipos de risco (67%), dos quais 80.2% são relativos ao genótipo viral 1 (dados não apresentados), o que está de acordo com os dados conhecidos para populações europeias (Esteban, et al., 2008). Realça-se o facto da não obtenção de RVS ser de 91.7% nos indivíduos que possuem genótipos virais de risco, semelhante ao encontrado por outros autores (McCarthy, et al., 2010; Iwata, et al., 2010).

A presença dos genótipos 2 e 3 associou-se a um aumento da probabilidade de RVS de 7.89%, comparativamente aos genótipos 1 e 4 ($P = 0.008$; OR = 7.89; IC95%: 1.71 – 36.55), confirmando a necessidade de uma abordagem terapêutica específica para os doentes infetados com os genótipos 1 e 4.

Os resultados da análise da carga viral inicial não mostraram associação estatisticamente significativa com a RVS, embora os doentes com uma carga viral inicial inferior a 600000 UI/mL alcançassem mais frequentemente a RVS.

No caso da resposta virológica precoce (RVP), é de realçar o facto, de que só obtiveram RVS os doentes com uma RVP positiva às 12 semanas de tratamento. Esta associação já tinha sido descrita (Thompson, et al., 2010) e confirma a utilidade deste parâmetro para a decisão terapêutica.

Tabela VIII: Correlação dos vários fatores de risco com a RVS.

Fator de risco		Global (n = 91)	RVS (n = 67)	NR (n = 24)	<i>p</i> *	OR; (IC95%)
Genótipo do VHC	2/3	30 (33%)	28 (41.8%)	2 (8.3%)	0.008	7.89 (1.71-36.55)
	1/4	61 (67%)	39 (58.2%)	22 (91.7%)		
Carga viral inicial	< 600000 UI/mL	37 (58.2%)	31 (46.3%)	6 (25%)	0.074	2.58
	≥ 600000 UI/mL	54 (41.8%)	36 (53.7%)	18 (75%)	ns	(0.91-7.31)
RVP	Positiva	68 (74.7%)	67 (100%)	1 (4.2%)	-	-
	Negativa	23 (25.3%)	0	23 (95.8%)	-	-

* nível de significância associado à realização do teste χ^2 entre a RVS e NR para cada fator de resposta à terapia; RVP, resposta virológica precoce; RVS, resposta virológica sustentada; NR, ausência de RVS; *n*, número de indivíduos; OR, *odd ratio*; IC, intervalo de confiança; ns, *P* > 0.05.

3.4. Associação entre genótipos e outros fatores de resposta

Na tabela IX e X, analisa-se a associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados, rs12979860 e V444A e os fatores de resposta à terapia combinada de PEG-IFN/RBV, genótipo viral, carga viral, idade e RVP.

Não se verificou associação estatisticamente significativa entre os genótipos virais e os genótipos do polimorfismo rs12979860 (*IL28B*). Contudo, os genótipos virais de risco (1 e 4) foram mais frequentes nos doentes homocigotos CC. Esta

correlação foi descrita por alguns autores, como Montes-Cano e colaboradores (2010) que associam o genótipo CC à presença do genótipo viral 1, mas nem sempre confirmada (McCarthy, et al., 2010). Relativamente à resposta à terapêutica, estes dois parâmetros parecem ser fatores independentes de resposta.

O polimorfismo, V444A, também não mostrou qualquer associação com o genótipo viral. Ainda não existem estudos com os quais comparar os resultados obtidos.

Em relação à carga viral, e apesar de não haver associação significativa da virémia com o polimorfismo rs12979860, notamos uma maior frequência de doentes com carga viral elevada em doentes com genótipo CC (30 em 43). Este facto é referido noutros estudos (Ge, et al., 2009; McCarthy, et al., 2010; Thompson, et al., 2010), com resultados estatisticamente significativos, e embora pareça ser contraditório com os resultados que associam uma carga viral inicial baixa com um melhor prognóstico, a explicação pode residir no facto do genótipo CC poder estar associado a um decréscimo mais acentuado da carga viral nos primeiros dias de terapia (Thompson, et al., 2010).

Tabela IX: Associação entre os polimorfismos estudados, o genótipo viral e a carga viral.

Polimorfismos	Genótipo Viral		<i>P</i> *	Carga viral		<i>P</i> *
	2/3 (<i>n</i> = 30)	1/4 (<i>n</i> = 61)		<600000 UI/ml (<i>n</i> = 37)	>600000 UI/ml (<i>n</i> = 54)	
rs12979860	C/C	13 (43.3%)	30 (49.1%)	13 (35.1%)	30 (55.5%)	ns
	C/T	11 (36.7%)	22 (36%)	17 (46%)	16 (29.7%)	
	T/T	6 (20%)	9 (14.8%)	7 (18.9%)	8 (14.8%)	
V444A	C/C	7 (23.3%)	15 (24.5%)	8 (21.6%)	14 (26%)	ns
	C/T	17 (56.7%)	37 (60.7%)	22 (59.4%)	32 (59.2%)	
	T/T	6 (20%)	9 (14.8%)	7 (19%)	8 (14.8%)	

* nível de significância associado à realização do teste χ^2 entre a os vários genótipos para cada polimorfismo e os fatores de resposta; *n*, número de indivíduos; ns, *P* > 0.05

A análise do polimorfismo V444A com a carga viral foi inconclusiva. Um estudo de Iwata e colaboradores (2010) não encontrou correlação entre a carga viral e os níveis de sais biliares, mas aponta para o efeito que a possível acumulação de sais biliares possa ter na resposta antiviral do interferão (Iwata, et al., 2010).

Relativamente à idade dos doentes e à existência ou não de RVP, também não se encontraram associações estatisticamente significativas com nenhum dos dois polimorfismos estudados. Contudo, para o polimorfismo, rs12979860, o genótipo CC apresenta as frequências mais elevadas de RVP (53%), confirmando os resultados de outros autores (Thompson, et al., 2010). Assim, o genótipo CC embora possa estar associado a uma carga viral inicial elevada, também se associa a uma RVP positiva, isto é a uma diminuição acentuada dos níveis de RNA do VHC após o início do tratamento, como sugerido por Thompson e colaboradores (2010).

Tabela X: Associação entre os polimorfismos estudados, a idade e a RVP

Polimorfismos	Idade		<i>P</i> *	RVP		<i>P</i> *
	< 40 anos (<i>n</i> = 42)	> 40 anos (<i>n</i> = 49)		Presente (<i>n</i> = 68)	Ausente (<i>n</i> = 23)	
rs12979860	C/C	20 (47.6%)		36 (53%)	7 (30.4%)	
	C/T	15 (35.7%)	ns	22 (32,3%)	11 (47.8%)	ns
	T/T	7 (16.7%)		10 (14.7%)	5 (21.7%)	
V444A	C/C	12 (28.6%)		17 (25%)	5 (21.7%)	
	C/T	24 (57.1%)	ns	37 (54.4%)	17 (74%)	ns
	T/T	6 (14.3%)		14 (20.6%)	1 (4.3%)	

*nível de significância entre os vários genótipos para cada polimorfismo e os fatores de resposta; RVP, resposta viral precoce; *n*, número de indivíduos; ns, $P > 0.05$.

Capítulo 4 – Conclusão

Dos vários fatores analisados, pudemos confirmar, que para a nossa população, tal como descrito para outras populações caucasianas, o SNP associado à *IL28B*, rs12979860, pode ser considerado um marcador de boa resposta à terapêutica da hepatite C baseada no INF, estando a presença do alelo C relacionada com uma maior probabilidade de RVS (OR = 5.1; IC95%: 1.56 – 16.64).

Relativamente ao polimorfismo V444A, do gene *ABCB11*, os resultados sugerem que o genótipo TT se poderá associar a uma maior probabilidade de RVS, embora seja necessário prosseguir os estudos com uma amostra de doentes de maior dimensão.

Quanto aos fatores não relacionados com o genótipo do doente, confirmou-se que os genótipos virais 1 e 4 se associam a uma má resposta ao tratamento, bem como a RVP negativa.

Para que seja possível definir um modelo integrado, multifatorial, de previsão da resposta à terapêutica baseada no INF, clinicamente útil, teremos de prosseguir este trabalho com uma população de maior dimensão e a análise de outros marcadores. Para as novas terapêuticas não baseadas no INF que estão a ser introduzidas, será necessário verificar estas associações. É provável que o SNP associado à *IL28B*, não seja um marcador de resposta para estas novas terapêuticas mas se mantenha útil para selecionar os doentes para os quais a terapêutica clássica, mais barata, seja eficaz.

Referências Bibliográficas

- André P, Perlemuter G, Budkowska A & Bréchet C (2005). Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Seminars in Liver Disease*, Volume 25, pp. 93-104.
- Asselah T, Rubbia-Brandt L, Marcellin P & Negro F (2006). Steatosis in Chronic Hepatitis C: Why Does it Really Matter?. *Gut*, Volume 55, pp. 123-130.
- Bakr I, Rekacewicz C, El Hosseiny M. S, Ismail, El Daly M, El-Kafrawy S, Esmat G, Hamid MA, Mohamed MK, Fontanet A (2006). Higher clearance of hepatitis C virus infection in females compared with males. *Gut*, 55(8), pp. 1183-1187.
- Barbeau J, Goforth J, Caliendo A & Nolte F (2004). Performance characteristics of a quantitative TaqMan hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent.. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 24, pp. 3739-3746.
- Bartosch B & Cosset F (2006). Cell entry of Hepatitis C virus. *Virology*, Volume 348, pp. 1-12.
- Booth J, O'Grady J & Neuberger J (2001). Clinical guidelines on the management of hepatitis C.. *Gut*, Volume 49 (suppl 1), pp. 1-21.
- Bräu N, Rodriguez-Torres M, Prokupek D, Bonacini M, Giffen CA, Smith JJ, Frost KR, Kostman JR (2004). Treatment of chronic hepatitis C in HIV/HCV-coinfection with interferon alpha-2b+ full-course vs. 16-week delayed ribavirin. *Hepatology*, 39(4), pp. 989-998..
- Bressanelli S, Tomei L, Rey F & De Francesco R (2002). Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in complex with ribonucleotides.. *Journal of Virology*, Volume 76, p. 3482–3492.
- Brierley M & Fish E (2002). IFN-alfa/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, Volume 22, p. 835–845.

- Bukh J, Miller R & Purcell R (1995). Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Seminars in Liver Disease*, Volume 15, pp. 41-63.
- Burra P (2009). Hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, Volume 29, pp. 53-65.
- Byrne J, Strautnieks SS, Ihrke G, Pagani F, Knisely AS, Linton KJ, Mieli-Vergani G, Thompson RJ (2009). Missense mutations and single nucleotide polymorphisms in ABCB11 impair bile salt export pump processing and function or disrupt pre-messenger RNA splicing. *Hepatology*, 49(2), pp. 553-567.
- Calvaruso V & Craxì A (2011). European Association of the Study of the Liver hepatitis C virus clinical practice guidelines. *Liver International*, 32(Supplement S1), pp. 2-8.
- Chang K & George D (2007). Bile acids promote the expression of hepatitis C virus in replicon-harboring cells. *Journal of Virology*, Volume 81, pp. 9633-9640.
- Choo Q, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, Volume 244, p. 359-362.
- Cocquerel L, Voisset C & Dubuisson J (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *Journal of General Virology*, Volume 87, pp. 1075-1084.
- Craxì A, Pawlotsky JM, Wedemeyer H, Bjoro K, Flisiak R, Fornis X, Mondelli M, Peck-Radosavljevic M, Rosenberg W, Sarrazin C, Jacobson I, Dusheiko G, European Association for the Study of the Liver (2011). EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, Volume 55, pp. 245-264.

- Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen.. *Nature Medicine*, Volume 6, pp. 1375-1379.
- Dore G (2012). The changing therapeutic landscape for hepatitis C. *Medical Journal of Australia*, 196(10), pp. 628-632.
- Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum EH, Moradpour D, Bienz K (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex.. *Journal of Virology*, Volume 76, p. 5974–5984.
- Elbeik T, Surtihadi J, Destree M, Gorlin J, Jortani AS, Kuramoto K, Ng V, Jr Valdes R, Valsamakis A, Terrault AN (2004). Multicenter evaluation of the performance characteristics of the bayer VERSANT HCV RNA 3.0 assay (bDNA).. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 42, pp. 563-569.
- Esteban J, Sauleda S & Quer J (2008). The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *Journal of Hepatology*, 48(1), pp. 148-162.
- Feld J & Hoofnagle J (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature*, pp. 436:967-972.
- Feld J, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, Pusek SN, Schweigler LM, Theodore D, Zacks SL, Liang TJ, Fried MW (2007). Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology*, Volume 46, pp. 1548-1563.
- Fried M (2002). Side effects of therapy of hepatitis C and their management.. *Hepatology*, 36(5) (Supplemento 1), pp. 237-244.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen E, Qiu P, Bertelsen HA, Muir JA, Sulkowski M, McHutchison GJ, Goldstein BD, (2009).

- Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature*, Volume 461, pp. 399-401.
- Griffin S, Beales LP, Clarke DS, Worsfold O, Evans SD, Jaeger J, Harris MP, Rowlands DJ (2003). The p7 protein hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Letters*, Volume 535, pp. 34-38.
- Hofmann W, Zeuzem S & Sarrazin C (2005). Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. *J Clin Virol*, Volume 32, pp. 86-91.
- Hoofnagle J (2002). Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, Volume 36, pp. 21-9.
- Hsu M, Zhang J & Flint M, (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotype retroviral particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(12), pp. 7271-7276.
- International HapMap Consortium, (2003). The International HapMap Project. *Nature*, Volume 426, pp. 789-794.
- International HapMap Consortium, (2005). A haplotype map of the human genome. *Nature*, Issue 437, pp. 1299-1320.
- Iwata R, Baur K, Stieger B, Mertens JC, Daly AK, Frei P, Braun J, Vergopoulos A, Stickel F, Sabrane K, Martin IV, Schmitt J, Goetze O, Day CP, Müllhaupt B, Geier A, Swiss Hepatitis C Cohort Study Group, (2011). A common polymorphism in the ABCB11 gene is associated with advanced fibrosis in hepatitis C but not in non-alcoholic fatty liver disease. *Clinical Science (Lond)*, Volume 120, pp. 287-296.

- Iwata R, Stieger B, Mertens JC, Müller T, Baur K, Frei P, Braun J, Vergopoulos A, Martin IV, Schmitt J, Goetze O, Bibert S, Bochud PY, Müllhaupt B, Berg T, Geier A, Swiss Hepatitis C Cohort Study Group, (2010). The role of bile acid retention and a common polymorphism in the ABCB11 gene as host factors affecting antiviral treatment response in chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, Volume 18, pp. 768-778.
- Jorquera F, Monte MJ, Guerra J, Sanchez-Campos S, Merayo JA, Olcóz JL, González-Gallego J, Marin JJ (2005). Usefulness of combined measurement of serum bile acids and ferritin as additional prognostic marker to predict failure to reach sustained response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Volume 20, pp. 547-554.
- Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M (1994). Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *Journal of General Virology*, Volume 75, pp. 1755-1760.
- Kau A, Vermehren J & Sarrazin C (2008). Treatment predictors of a sustained virologic response in hepatitis B and C. *Journal of Hepatology*, 49(4), p. 634–651.
- Kotenko S, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003). IFN- λ mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*, Volume 4, p. 69–77.
- Kullak-Ublick G, Stieger B & Meier P (2004). Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease.. *Gastroenterology*, Volume 322–342, p. 126.

- Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis.. *Science*, Volume 244, pp. 362-364.
- Labarga P, Soriano V, Caruz A, Poveda E, Di Lello F, Hernandez-Quero J, Moreno S, Bernal E, Miró JM, Leal M, Gutierrez F, Portilla J, Pineda JA (2011). Association between IL28B gene polymorphisms and plasma HCV-RNA levels in HIV/HCV-co-infected patients. *AIDS*, 25(6), pp. 761-766.
- Lamarre D, Anderson PC, Bailey M, Beaulieu P, Bolger G, Bonneau P, Bös M, Cameron DR, Cartier M, Cordingley MG, Faucher AM, Goudreau N, Kawai SH, Kukulj G, Lagacé L, LaPlante SR, Narjes H, Poupart MA (2003). An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus.. *Nature*, Volume 426, p. 186–189.
- Lang C, Meier Y, Stieger B, Beuers U, Lang T, Kerb R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Pauli-Magnus C (2007). Mutations and polymorphisms in the bile salt export pump and the multidrug resistance protein 3 associated with drug-induced liver injury. *Pharmacogenetics and Genomics*, 17(1), pp. 47-60.
- Langer J, Cutrone E, Kotenko S (2004). The class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Volume 15, p. 33–48.
- Lauer G, Walker B (2001). Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, Volume 345, pp. 41-45.
- Lau J, & Horvath C (2002). Mechanism of type I interferon cell signaling and STAT-mediated transcriptional responses. *Mount Sinai Journal of Medicine*, Volume 69, pp. 156-168.

- Lavillette D, Morice Y, Germanidis G, Donot P, Soulier A, Pagkalos E, Sakellariou G, Intrator L, Bartosch B, Pawlotsky JM, Cosset FL (2005). Human serum facilitates hepatitis C virus infection, and neutralizing responses inversely correlate with viral replication kinetics at the acute phase of hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, Volume 79, pp. 6023-6034.
- Lebovics E, Seif F, Kim D, Elhosseiny A, Dworkin BM, Casellas A, Clark S, Rosenthal WS (1997). Pruritus in chronic hepatitis C: association with high serum bile acids, advanced pathology, and bile duct abnormalities. *Digestive Diseases and Sciences*, Volume 42, pp. 1094-1099.
- Lemon S, Walker C, Alter M, Yi M (2007). Hepatitis C virus.. In: *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1253–1304.
- Li M, Liu X, Zhou Y, Su S (2009). Interferon-lambdas: the modulators of antiviral, antitumor, and immune responses. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 86, pp. 23-32.
- Lindenbach B, Thiel H, Rice C (2007). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p. 1101–1152.
- Lindsay K, Trepo C, Heintges T, Shiffman ML, Gordon SC, Hoefs JC, Schiff ER, Goodman ZD, Laughlin M, Yao R, Albrecht JK, Hepatitis Interventional Therapy Group (2001). A randomized, double-blind trial comparing pegylated interferon alfa-2b to interferon alfa-2b as initial treatment for chronic hepatitis C.. *Hepatology*, Volume 34, pp. 395-403.
- Maag D, Castro C, Hong Z, Cameron C (2001). Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin.. *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 276, pp. 46094-46098.

- Manns M, Rambusch E (1999). Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection.. *Journal of Hepatology*, Volume 31, pp. 39-42.
- Manns M, Wedemeyer H, Cornberg M (2006). Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, Volume 55, pp. 1350-1359.
- Manolio T, Collins FS (2009). The HapMap and genome-wide association studies in diagnosis and therapy. *Annual Review of Medicine*, Volume 60, pp. 443-456.
- Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR (2006). Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology*, pp. 131:1887-1898.
- Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S, Galli-Stampino L, Colombatto P, Brunetto M, Yen TS, Houghton M, Pileri P, Abrignani S (2004). Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes.. *European Journal of Immunology*, 34(10), p. 2834–2842.
- McCarthy J, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG (2010). Replicated Association between an IL28B Gene Variant and a Sustained Response to Pegylated Interferon and Ribavirin. *Gastroenterology*, Volume 138, pp. 2307-2314.
- McHutchison J, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZC, Ling MH, Cort S, Albrecht JK (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*, Volume 339, pp. 1485-1492.
- Meier P, Stieger B (2002). Bile salt transporters. *Annual Review of Physiology*, Volume 64, p. 635–661.

- Meier Y, Pauli-Magnus C, Zanger UM, Klein K, Schaeffeler E, Nussler AK, Eichelbaum M, Meier PJ, Stieger B (2006). Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver. *Hepatology*, Volume 44, p. 62–74.
- Meier Y, Zodan T, Lang C, Zimmermann R, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Stieger B, Pauli-Magnus C (2008). Increased susceptibility for intrahepatic cholestasis of pregnancy and contraceptive-induced cholestasis in carriers of the 1331T>C polymorphism in the bile salt export pump. *World Journal of Gastroenterology*, 14(1), pp. 38-45.
- Méndez S, Uribe E (2005). In: *Conceptos actuales en Hepatitis C*. 2a ed. Mexico: McGraw-Hill, pp. 85-103.
- Micallef J, Kaldor J, Dore G (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of Viral Hepatitis*, Volume 13, pp. 34-41.
- Miller S, Dykes D, Polesky H (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), p. 1215.
- Moghaddam A, Melum E, Reinton N, Ring-Larsen H, Verbaan H, Bjørø K, Dalgard O (2011). IL28B genetic variation and treatment response in patients with hepatitis C virus genotype 3 infection. *Hepatology*, 53(3), pp. 746-754.
- Montes-Cano M, Garcia-Lozano JR, Abad-Molina C, Romero-Gómez M, Barroso N, Aguilar-Reina J, Núñez-Roldán A, González-Escribano MF (2010). IL28B genetic variants and hepatitis virus infection by different viral genotypes. *Hepatology*, Volume 52, pp. 33-7.
- Moradpour D, Penin F, Rice C (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews Microbiology*, Volume 5, pp. 453-463.

- Myers R, Benhamou Y, Bochet M, Thibault V, Mehri D, Poynard T (2004). Pegylated interferon alpha 2b and ribavirin in HIV/hepatitis C virus-co-infected non-responders and relapsers to IFN-based therapy. *AIDS*, 18(1), pp. 75-79.
- National Institutes of Health (2002). Management of Hepatitis C: 2002. s.l., s.n., pp. 1-46.
- NCBI (2009). National Center for Biotechnology Information. [Online] Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Acedido em 13 Maio 2012].
- Otto G & Puglisi J (2004). The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation.. *Cell*, Volume 119, p. 369–380.
- Page K, Hahn JA, Evans J, Shiboski S, Lum P, Delwart E, Tobler L, Andrews W, Avanesyan L, Cooper S, Busch MP (2009). Acute hepatitis C virus infection in young adult injection drug users: a prospective study of incident infection, resolution, and reinfection. *Journal of Infectious Diseases*, 200(8), pp. 1216-1226.
- Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ (2005). Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *Journal of Hepatology*, Volume 43, p. 342–357.
- Pawlotsky J (2002). Use and interpretation of virological tests for hepatitis C.. *Hepatology*, Volume 36, pp. 65-73.
- Pawlotsky J, Chevaliez S & McHutchison J (2007). The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology*, Volume 132, p. 1979–1998.
- Pawlotsky J, Lonjon I, Hezode C, Raynard B, Darthuy F, Remire J, Soussy CJ, Dhumeaux D (1998). What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories?. *Hepatology*, Volume 27, pp. 1700-1702.

- Pawlotsky J, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Lahonne C, Darthuy F (1997). Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay.. *Journal of Clinical Microbiology*, Volume 35, pp. 1734-1739.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, pp. 282, 938–941.
- Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, pp. 457,882–886.
- Poynard T, Marcellin P, Lee SS, Niederau C, Minuk GS, Ideo G, Bain V, Heathcote J, Zeuzem S, Trepo C, Albrecht J (1998). Randomised trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus.. *The Lancet*, Volume 352, pp. 1426-1432.
- Purcell R (1994). Hepatitis C virus. In: *Encyclopedia of Virology*. London: Academic Press Ltd, pp. 569-574.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R (2010). Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study.. *Gastroenterology*, Volume 139, pp. 1338-1345.
- Reddy K, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J (2001). Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-

- 2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C.. *Hepatology*, Volume 33, pp. 433-438.
- Romero-Gomez M, Eslam M, Ruiz A & Maraver M (2011). Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment.. *Liver International*, 31(4), pp. 443-60.
- Santantonio T, Fasano M, Sinisi E, Guastadisegni A, Casalino C, Mazzola M, Francavilla R, Pastore G (2005). Efficacy of a 24-week course of PEG-interferon alpha-2b monotherapy in patients with acute hepatitis C after failure of spontaneous clearance.. *Journal of Hepatology*, Volume 42, pp. 329-333.
- Sarasin-Filipowicz M. Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W (2008). Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C.. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 105:7034-9.
- Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, Roccasecca RM, Acali S, Filocamo G, Traboni C, Nicosia A, Cortese R, Vitelli A (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, Volume 21, p. 5017–5025.
- Scholtes C, Diaz O, Icard V, Kaul A, Bartenschlager R, Lotteau V, André P (2008). Enhancement of genotype 1 hepatitis C virus replicon by bile acids through FXR. *Journal of Hepatology*, Volume 48, pp. 192-199.
- Sharma S (2010). Hepatitis C virus: molecular biology & current therapeutic options.. *Indian Journal of Medical Research*, Volume 131, pp. 17-34.
- Sheppard P, Kindsvogel W., Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, 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 (2003). IL-28, IL-

29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*, Volume 4, p. 63–68.

Shimizu Y, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H (1996). Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy.. *Hepatology*, Volume 23, pp. 205-209.

Sidwell R, Huffman JH, Khare GP, Allen LB, Witkowski JT, Robins RK (1972). Broad-spectrum antiviral activity of Virazole: 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide.. *Science*, Volume 177, pp. 705-706.

Simmonds P (1999). Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology*, Volume 31, pp. 54-60.

Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *Journal of General Virology*, Volume 74, pp. 2391-2399.

Stieger B & Geier A (2011). Genetic variations of bile salt transporters as predisposing factors for drug-induced cholestasis, intrahepatic cholestasis of pregnancy and therapeutic response of viral hepatitis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(4), pp. 411-425.

Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J (2009). IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy.. *Nature Genetics*, Volume 41, p. 1100–1104.

Svrtlih N, Jevtovic D, Simonovic J, Delic D, Dokic L, Gvozdenovic E, Boricic I, Nestic Z, Neskovic G, Urban V (2007). Older age at the time of liver biopsy is the

- important risk factor for advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepato-Gastroenterology*, 54(80), pp. 2324-2327.
- Tam R, Pai B, Bard J, Lim C, Averett DR, Phan UT, Milovanovic T (1999). Ribavirin polarizes human T cell responses towards a Type 1 cytokine profile.. *Journal of Hepatology*, Volume 30, pp. 376-382.
- 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 (2009). Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nature Genetics*, Volume 41, pp. 1105-1109.
- Thomas D, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O’Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*, Volume 461, pp. 798-801.
- Thompson A, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG (2010). Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 139(1), pp. 120-129.

- Trauner M, & Boyer J (2002). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiological Reviews*, Volume 83, p. 633–671.
- Verbeeck J, Stanley MJ, Shieh J, Celis L, Huyck E, Wollants E, Morimoto J, Farrior A, Sablon E, Jankowski-Hennig M, Schaper C, Johnson P, Van Ranst M, Van Brussel M (2008). Evaluation of Versant hepatitis C virus genotype assay (LiPA) 2.0. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(6), pp. 1901-1906.
- Wiegand J, Buggisch P, Boecher W, Zeuzem S, Gelbmann CM, Berg T, Kauffmann W, Kallinowski B, Cornberg M, Jaeckel E, Wedemeyer H, Manns MP, German HEP-NET Acute HCV Study Group (2006). Early monotherapy with pegylated interferon alfa-2b for acute hepatitis C infection: The HEP-NET Acute-HCV-II Study.. *Hepatology*, Volume 43, pp. 250-256.
- World Health Organization (2011). Hepatitis C - Fact Sheet No.164. [Online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/index.html> [Acedido em 31 Maio 2012].
- Yee H, Currie SL, Darling JM, Wright TL, Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center (2006). Management and treatment of hepatitis C viral infection: recommendations from the Department of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center program and the National Hepatitis C Program office.. *The American Journal of Gastroenterology*, 101(10), pp. 2360-2378.
- Zein N, 2000. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes.. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), pp. 223-235.
- Zeuzem S, Feinman SV, Rasenack J, Heathcote EJ, Lai MY, Gane E, O'Grady J, Reichen J, Diago M, Lin A, Hoffman J, Brunda MJ (2000). Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C.. *The New England Journal of Medicine*, Volume 343, pp. 1666-1672.

Zhou S, Liu R, Baroudy BM, Malcolm BA, Reyes GR (2003). The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology*, Volume 310, pp. 333-342.