

***DANIELA BRAMBILA CORGHI***

**ESTUDO DOS ALELOS HLA CLASSE II (LOCI DRB1 E  
DQB1) EM PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

***CAMPINAS***

***2005***

***DANIELA BRAMBILA CORGHI***

**ESTUDO DOS ALELOS HLA CLASSE II (LOCI DRB1 E  
DQB1) EM PACIENTES INFECTADOS  
PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre  
em Farmacologia.*

**Orientador:** *Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Júnior*

**Co-Orientador:** *Dra Neiva Sellan Lopes Gonçalves*

**CAMPINAS**

**2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C812e	<p>Corghi, Daniela Brambila Estudos dos alelos HLA classe II ( LOCI DRB1 e DQB1) em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C. / Daniela Brambila Corghi. Campinas, SP : [s.n.], 2005.</p> <p>Orientadores : Fernando Lopes Gonçalves Júnior, Neiva Sellan Lopes Gonçalves Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Hepatite C. 2. Hepatite não-A, não - B. 3. Complexo principal de histocompatibilidade. 4. Vírus. 5. Reação em cadeia da polimerase. 6. Interferon. 7. Hepatite por vírus. 8. Genótipo. 9. Biologia Molecular. 10. Ribavirina. I. Gonçalves Júnior, Fernando Lopes. II. Gonçalves, Neiva Sellan Lopes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p> <p>(Slp/fcm)</p>
-------	--



## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

### **Orientador:**

**Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Junior**

### **Membros:**

**Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Junior**

**Profa. Dra. Lílian Maria de Castilho**

**Profa. Dra. Maria Lúcia Cardoso Gomes Ferraz**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 29/07/2005**

## ***DEDICATÓRIA***

*Aos meus pais Ivan e Geralda, que sempre me incentivaram e me ensinaram a lutar por meus ideais com amor, trabalho, humildade e dedicação.*

*À minha irmã Tatiana, que me apoiou e acreditou em mim em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

---

Ao Prof. Dr. Fernando Lopes Gonçalves Júnior, pela orientação deste trabalho que muito contribuiu para minha formação, pelo profissionalismo e exemplo.

À Dra. Neiva Sellan Lopes Gonçalves, pelas excelentes sugestões, sempre incentivando-me com paciência e carinho.

À bióloga Viviane Cristina Fais pela amizade e pelos bons momentos que dividimos no Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Estudos das Hepatites – FCM – UNICAMP.

Às médicas Dra. Maria Helena Postal Pavan e Dra. Aline Gonzáles Vigani, pela colaboração na seleção dos pacientes.

À enfermeira Maria Sílvia Kroll Lazarini que coletou as amostras dos pacientes sempre com carinho e dedicação.

À secretária Gláucia Maria Quaresma pela carinhosa atenção em todos os momentos.

À biomédica Sílvia Barbosa Dutra Marques, Supervisora do Laboratório de Histocompatibilidade (HLA) do Hemocentro – UNICAMP, que gentil e carinhosamente nos permitiu utilizar a infraestrutura do mesmo para a realização da genotipagem dos alelos HLA classe II.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Histocompatibilidade (HLA) pela atenção e carinho em todos os momentos.

À Dra. Ligia Beatriz Persoli e à Dra. Sofia Rocha Lieber, por suas atenciosas e valiosas sugestões em várias etapas da realização deste trabalho.

Às secretárias Andréia Regina Damiane de Souza, Kátia Hatsuko Ito e à bióloga Cirlene Aparecida Peterlini Pompeu do Laboratório de Sorologia do Hemocentro – UNICAMP, pela colaboração.

Às amigas Helen Naemi Homma e Edilaine Gildo Guariento pelas palavras de apoio e encorajamento nos momentos mais difíceis.

Ao departamento de estatística, em especial a Helymar Machado e Andréa Semolini, pela realização da análise estatística dos dados.

***APOIO***

***FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e à Pesquisa)***

*“Você não pode ensinar nada a um homem;  
você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta  
dentro dele mesmo”.*

*Galileu Galilei*

*“Se um dia tudo lhe parecer perdido, lembre-se de que  
você nasceu sem nada, e que tudo que conseguiu foi  
através de esforços e os esforços nunca se perdem,  
somente dignificam as pessoas.”*

*Charles Chaplin*

	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>1.1- Hepatite C</b> .....	21
<b>1.2- Sistema HLA</b> .....	28
<b>1.3- Hepatite C e Sistema HLA</b> .....	32
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	35
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	37
<b>3.1- Pacientes</b> .....	38
<b>3.2- Testes Laboratoriais</b> .....	39
3.2.1- Genotipagem para o VHC.....	40
3.2.2- Sorotipagem para o VHC.....	41
3.2.3- Genotipagem dos alelos HLA Classe II nos pacientes infectados pelo VHC.....	41
<b>3.3- Análise Estatística</b> .....	44
<b>4- RESULTADOS</b> .....	46
<b>5- DISCUSSÃO</b> .....	64
<b>6- CONCLUSÃO</b> .....	70
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	72
<b>8- APÊNDICES</b> .....	84

## *LISTA DE ABREVIACOES*

---

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase
<b>Anti-HCV</b>	Anticorpo contra o vírus da hepatite C
<b>Anti-HIV</b>	Anticorpo contra o vírus da Imunodeficiência Humana
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase
<b>C</b>	Região que codifica proteínas do nucleocapsídeo viral
<b>CH</b>	Cirrose Hepática
<b>DNA</b>	cido desoxirribonucléico
<b>E</b>	Região que codifica proteínas do envelope viral
<b>EDTA</b>	cido etilenodiaminotetracético
<b>F0</b>	Sem fibrose
<b>F1</b>	Fibrose grau um
<b>F2</b>	Fibrose grau dois
<b>F3</b>	Fibrose grau três
<b>F4</b>	Fibrose grau quatro
<b>GAMA-GT</b>	Gama glutamil transferase
<b>GEHEP</b>	Grupo de Estudos das Hepatites
<b>HBsAg</b>	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HLA</b>	Human Leucocyte Antigens (Antígenos Leucocitários Humanos)
<b>HNANB</b>	Hepatite não-A não-B
<b>HSP</b>	Heat Shoc Protein (Proteína do choque térmico)

<b>HVC</b>	Hepatite por vírus C
<b>IFN</b>	Interferon
<b>MHC</b>	Major Histocompatibility Complex (Complexo Maior de Histocompatibilidade)
<b>NCR</b>	Região não-codificadora
<b>NR</b>	Não-responder
<b>NS</b>	Região codificadora de proteínas não-estruturais
<b>ORF</b>	Open reading frame (Fase de leitura aberta)
<b>PCR</b>	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>RBV</b>	Ribavirina
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico
<b>RVS</b>	Resposta virológica sustentada
<b>SSP</b>	Sequence Specific Primer (Sequência específica de primer)
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF</b>	Tumor Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>USA</b>	United States of América (Estados Unidos da América)
<b>VHC</b>	Vírus da hepatite C

	<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1</b> Características dos 102 pacientes com infecção crônica pelo VHC de acordo com a resposta à terapêutica.....	48
<b>Tabela 2</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com infecção crônica pelo VHC e grupo controle.....	50
<b>Tabela 3</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com infecção crônica pelo VHC e grupo controle.....	50
<b>Tabela 4</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e grupo controle.....	51
<b>Tabela 5</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e grupo controle.....	52
<b>Tabela 6</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem RVS e grupo controle.....	53
<b>Tabela 7</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem RVS e grupo controle.....	53
<b>Tabela 8</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e pacientes sem RVS.....	54
<b>Tabela 9</b> Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e pacientes sem RVS.....	55
<b>Tabela 10</b> Alterações estruturais hepáticas (estágio de fibrose) observadas em 83 pacientes com hepatite crônica pelo vírus C, nos 2 grupos.....	56
<b>Tabela 11</b> Presença e estágio de fibrose de acordo com os alelos HLA-DRB1.....	57
<b>Tabela 12</b> Presença e estágio de fibrose de acordo com os alelos HLA-DQB1.....	57

<b>Tabela 13</b>	Presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos DRB1.....	58
<b>Tabela 14</b>	Presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos DQB1.....	59
<b>Tabela 15</b>	Presença ou ausência de cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DRB1.....	60
<b>Tabela 16</b>	Presença ou ausência de cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DQB1.....	60
<b>Tabela 17</b>	Frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 1.....	61
<b>Tabela 18</b>	Frequência dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 1.....	62
<b>Tabela 19</b>	Frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 3.....	63
<b>Tabela 20</b>	Frequência dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 3.....	63

	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1</b> Estrutura do vírus da hepatite C.....	22
<b>Figura 2</b> Organização básica do genoma do vírus da hepatite C.....	23
<b>Figura 3</b> Organização gênica da região HLA.....	29
<b>Figura 4</b> Esquema da molécula HLA de classe II.....	30
<b>Figura 5</b> Esquema do sítio antigênico da molécula HLA de classe II.....	31
<b>Figura 6</b> Genotipagem (PCR-SSP) dos alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1).....	43
<b>Figura 7</b> Distribuição dos genótipos dos pacientes com infecção crônica pelo VHC, de acordo com resposta ou não resposta ao tratamento antiviral.....	49

*RESUMO*



A hepatite pelo vírus C (HVC) é uma doença amplamente disseminada e de curso geralmente insidioso. Considera-se que 50 a 80% dos indivíduos com HVC aguda evoluirão para cronicidade. Cerca de 50% vão necessitar tratamento específico com algum tipo de interferon combinado, ou não, à ribavirina. O principal objetivo do tratamento da HVC crônica é obter-se uma resposta virológica sustentada (RVS).

O interesse no estudo da hepatite C e alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) se deve ao fato de o Sistema HLA apresentar associação com várias patologias.

Foram estudados 102 pacientes etnicamente miscigenados, não-aparentados, infectados pelo vírus da hepatite C (VHC), com anti-HIV e HBsAg negativos atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP. Foi possível determinar o genótipo do VHC em 98 indivíduos e realizou-se a biópsia hepática em 83 pacientes. A genotipagem dos alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) foi realizada nos 102 pacientes pela técnica de PCR-SSP de baixa resolução.

Os 102 pacientes foram tratados com IFN isolado ou associado à ribavirina ou PEG-IFN associado à ribavirina por 6 ou 12 meses de acordo com o genótipo do VHC. Destes 102, 51% dos pacientes apresentaram RVS ao tratamento.

Correlacionando-se a presença dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 com o genótipo do VHC e resposta virológica observou-se associação entre menor porcentual de RVS com a presença dos alelos HLA-DQB1\*03 e HLA-DQB1\*06 em pacientes infectados pelo genótipo 3. Observou-se associação entre a presença do alelo HLA-DRB1\*04 e maior frequência de cirrose hepática nos pacientes com HVC crônica.

Encontrou-se uma frequência 2,7 vezes maior do alelo HLA-DRB1\*07 nos indivíduos infectados pelo VHC do que na população geral. Observamos associação estatisticamente significativa entre a presença do alelo HLA-DQB1\*02 e infecção pelo VHC quando comparado ao grupo controle.

Houve concomitância da presença dos alelos HLA-DRB1\*13 e HLA-DQB1\*02 nos pacientes que não apresentaram RVS.

Não encontramos associação entre presença dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 quando comparamos pacientes com RVS e pacientes sem RVS.

Este trabalho permitiu estabelecer relações entre o Sistema HLA e a hepatite C em pacientes brasileiros.

***ABSTRACT***



Hepatitis C virus (HCV) infection becomes chronic in most cases, with only 10-20% of those infected not developing persistent viraemia. The knowledge of host factors that influence the course of the disease is still limited. The immune response to HCV may be an important determinant of disease resolution and can be influenced by a number of host factors. We investigated the distribution of HLA class II alleles in patients with chronic hepatitis C using a low-resolution PCR-sequence-specific-primer method to assess whether MHC class II alleles are associated with HCV infection and with their response to interferon therapy.

One hundred and two unrelated white Brazilian patients with confirmed chronic HCV infection were included in this study. Fifty-two patients with sustained viral response after therapy (responder) and 50 patients without sustained viral response (non-responder) after completion of therapy were included in this study.

The HLA-DRB1\*07 allele was significantly more frequent in chronic hepatitis C patients than in controls. The higher frequencies of HLA-DRB1\*13 and HLA-DQB1\*02 in these patients were not significantly different after P correction. There was no significant difference between the phenotype frequencies of HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in responder with non-responder patients. We found that HLA-DRB1\*07 is associated with chronic HCV infection.

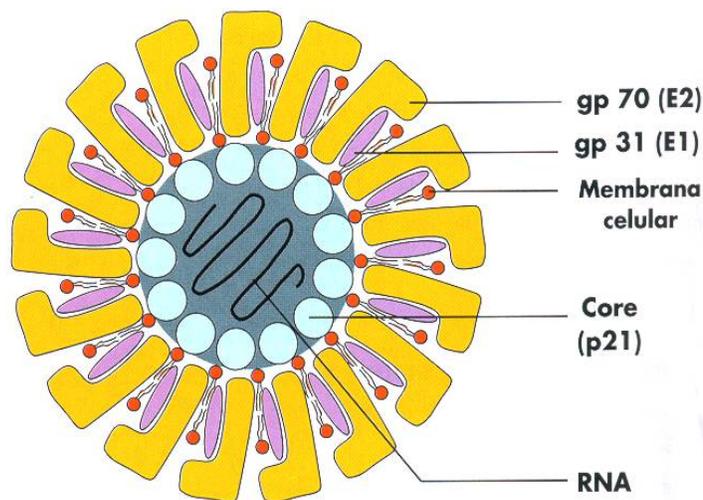
## *1- INTRODUÇÃO*

## 1.1- Hepatite C

A hepatite pelo vírus C (HVC), identificada inicialmente, como hepatite não-A, não-B (HNANB) é uma doença amplamente disseminada. A detecção e caracterização inicial do seu agente causador só foram possíveis em 1989, quando o vírus da hepatite C (VHC) foi clonado (CHOO *et al.*, 1989) e um antígeno viral foi expresso *in vitro*, tornando-se o fundamento dos ensaios de triagem do VHC (KUO *et al.*, 1989). CHOO e colaboradores (1989), nos EUA, a partir de plasmas de chimpanzés contendo o agente da hepatite NANB, construíram um banco de genes que lhes permitiu isolar um clone de DNA complementar. Observaram os autores que este clone não era derivado do DNA do hospedeiro, mas sim das moléculas de RNA presentes nas hepatites NANB, sendo, portanto, originário do genoma do vírus da hepatite NANB (CHOO *et al.*, 1990), a qual a partir deste momento, foi denominada hepatite pelo vírus C.

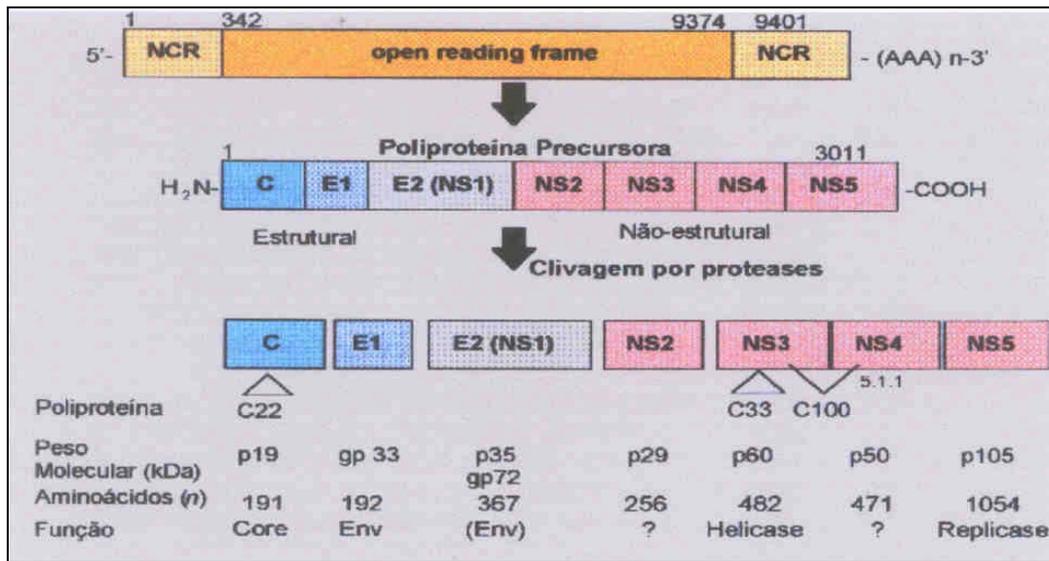
Algumas propriedades características do VHC são conhecidas a partir da sua transmissão a chimpanzés (TABOR *et al.*, 1978). Sabe-se que este vírus está presente em baixos títulos na maioria das pessoas infectadas (BRADLEY & MAYNARD, 1986). A classificação precisa do VHC ainda não é definitiva, mas está atualmente colocado na família Flaviviridae, como um gênero separado dos Flavivirus (febre amarela, dengue) e Pestivirus (diarréia bovina, cólera suína), pois, apesar de apresentar uma estrutura genômica geral semelhante a estes, no nível de seqüência, o VHC não se aproxima muito de nenhum deles. Para este novo gênero, foi proposto recentemente o nome Hepacivirus (SHUKLA *et al.*, 1995).

O VHC foi o primeiro vírus a ser descoberto por técnicas exclusivamente moleculares. Ainda não foi diretamente visualizado, mas sabe-se que é um vírus RNA, medindo menos de 60 nm, e que provavelmente contém um nucleocapsídeo interno com um genoma linear de aproximadamente 9600 nucleotídeos circundado por um envelope lipídico (KAITO *et al.*, 1994) (**Figura 1**).



**Figura 1-** Estrutura do vírus da hepatite C.

O genoma do VHC codifica uma poliproteína que sofre clivagem posterior. Na poliproteína com uma longa fase de leitura aberta (open reading frame - ORF) distinguem-se as proteínas estruturais: core e o envelope (E1 e E2) e as não estruturais (NS) enumeradas de 2 a 5 (NS2, NS3, NS4, NS5) que produzem as enzimas protease, helicase e RNA polimerase que atuam individual ou associadamente e são responsáveis pela replicação e expressão virais (CHOO *et al.*, 1991, KATO *et al.*, 1990). O genoma do VHC possui regiões mutáveis NS2/E1/E2 (Mc ALLISTER *et al.*, 1998), outras relativamente estáveis como core/NS3/NS4/NS5 (OKAMOTO *et al.*, 1990, GARSON *et al.*, 1990) e uma região altamente conservada que é a região 5' não codificadora (5'NCR) (**Figura 2**).



**Legenda:** **Open Reading Frame (ORF):** fase aberta de leitura; **NCR:** região não-codificadora; **S:** região que codifica regiões não-estruturais; **E:** região que codifica proteínas do envelope viral; **C:** região que codifica proteínas do nucleocapsídeo viral.

**Figura 2-** Organização básica do genoma do vírus da hepatite C

O agente etiológico da HVC não é uma partícula homogênea, podendo apresentar diversidade genética, que se traduz em diferentes tipos e subtipos. Assim, as cepas de VHC isoladas em diferentes regiões do mundo mostraram diferenças em 35% do seu genoma, o que permitiu classificá-las em 6 genótipos maiores e mais de 100 subtipos (SIMMONDS *et al.*, 1994). Os genótipos 1, 2 e 3 são responsáveis por 90% das infecções encontradas na América do Norte e Sul, Europa, Rússia, China, Japão, Austrália e Nova Zelândia (MONDELI *et al.*, 1999). Devido à distribuição geográfica mais restrita, outros genótipos são considerados raros, como o tipo 4, que é o principal genótipo do Oriente Médio, Egito e África Central, (McOMISH *et al.*, 1994, BUKH *et al.*, 1993), enquanto o tipo 5 é quase exclusivo do sul da África (SIMMONDS *et al.*, 1993) e o tipo 6 está presente em Hong Kong, Macau e Vietnã (McOMISH *et al.*, 1994).

Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações moleculares do VHC, que são denominadas *quasispecies*. Isto é possível, devido à replicação imperfeita do vírus, com surgimento de pequenas e constantes mutações. A maior ou menor diversidade das *quasispecies* parece estar relacionada com a pressão imunológica, já que costuma ser pequena nas fases iniciais da doença, com aminotransferases normais, apresentando alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica (ROSEN *et al.*, 1999).

Esta diversidade genotípica tem implicações em múltiplos aspectos da doença: na **epidemiologia**, devido às diferenças na distribuição geográfica e prováveis vias de contágio; na **patogênese**, pois condiciona cepas de diferentes graus de virulência (podendo ocorrer co-infecção por diferentes genótipos); no **diagnóstico**, devido à necessidade de seleção de seqüências de nucleotídeos de regiões extremamente conservadas para garantir a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos e moleculares; no **tratamento**, pois diferentes genótipos apresentam respostas diferentes às drogas utilizadas na terapia e na **profilaxia**, pois antepõe dificuldades na produção de vacinas (CHARMAN, 1995).

A partir da clonagem e caracterização do VHC (CHOO *et al.*, 1989), vários estudos têm confirmado ser o principal agente causal das hepatites pós transfusionais no mundo (ESTEBAN *et al.*, 1989, KUO *et al.*, 1989, PRINCE *et al.*, 1993).

Cerca de 18 a 26% dos pacientes com HVC desenvolvem icterícia durante a fase aguda da infecção (ESTEBAN *et al.*, 1989). Nos demais casos, os pacientes são assintomáticos (HOOFNAGLE, 1997). Cerca de 85% dos indivíduos com HVC tornam-se cronicamente infectados (HOOFNAGLE, 1997, ALTER, 1995) e a evolução para hepatite crônica usualmente passa despercebida (HOOFNAGLE, 1997). Aproximadamente 70% dos pacientes cronicamente infectados com HVC apresentam elevação persistente do nível das enzimas hepáticas (ALTER, 1995) e a biópsia hepática geralmente mostra evidências histológicas de hepatite crônica moderada (CONRY-CANTILENA *et al.*, 1996, PRIETO *et al.*, 1995, SERFATY *et al.*, 1995, SHAKIL *et al.*, 1995).

O conhecimento de sua história natural é dificultado pelo fato de, no início, a infecção ser totalmente assintomática. O curso da doença durante a fase crônica, via de regra, também não se acompanha de sintomas e o período para o desenvolvimento da doença hepática terminal pode se estender por 30 - 40 anos.

O diagnóstico laboratorial, utilizando o teste imunoenzimático (EIA, anti-HCV), mostra que os anticorpos contra o VHC persistem por anos após a infecção por este vírus, mesmo nos casos de infecção autolimitada. A prevalência do anti-HCV, em doadores de sangue no Brasil, varia de 1,4 a 2,3% e em nosso serviço foi de 2,1% (teste de 1ª geração) (GONÇALES Jr *et al.*, 1993). Assim, a presença do RNA do VHC, identificado através do teste da reação em cadeia da polimerase (PCR), é utilizada clinicamente para diferenciar os casos de persistência viral dos que conseguiram eliminar o vírus (clearance viral) (ALTER *et al.*, 1998).

É importante o diagnóstico precoce da infecção para instituir-se um efetivo tratamento antiviral. O principal objetivo do tratamento da hepatite crônica pelo vírus C é conseguir-se a resposta virológica sustentada (RVS). Pacientes que atingem resposta virológica sustentada têm baixíssima probabilidade de recidiva viral tardia. Além disso, aparentemente, a ausência de vírus detectáveis pode produzir benefícios, tais como promover a resolução da lesão hepática e diminuição da fibrose hepática, assim como a diminuição do risco de desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (POYNARD *et al.*, 1998).

Para avaliar-se a obtenção de uma resposta terapêutica, costumeiramente, realiza-se a pesquisa do RNA do VHC antes, durante, ao final do tratamento e 24 semanas após. Considera-se que houve RVS quando não se detecta o RNA do VHC, no soro, pelo teste da RT-PCR, no final do tratamento e na amostra coletada 24 semanas após a suspensão da terapêutica (LINDSAY, 2002). Considera-se recidivantes os pacientes que apresentam uma resposta virológica ao final do tratamento (RNA-VHC não detectável), mas que voltam a positivar o RNA do VHC, durante o seguimento. Não-respondedores são aqueles que não obtiveram negatificação do RNA do VHC ao final do tratamento. Alguns não-respondedores apresentam uma substancial redução do RNA do VHC (1 log unidade ou mais), durante a terapia e

costumam ser categorizados como respondedores parciais. Às vezes, os não-respondedores apresentam uma negatificação inicial do RNA do VHC, mas voltam a ficar positivos antes do final do tratamento (“breakthrough”) (DI BISCEGLIE, 1999, McHUTCHISON & POYNARD, 1999, McHUTCHISON *et al.*, 2002).

O Interferon-alfa é o principal antiviral utilizado no tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C. Nesta doença, o interferon-alfa (IFN) exerce tanto um efeito antiviral quanto imunomodulatório. A monoterapia, por 48 semanas, com IFN produz uma RVS que varia de 6-20% (POYNARD *et al.*, 1998, McHUTCHISON *et al.*, 1998).

A monoterapia tem sido abandonada desde o Consenso de Paris onde ficou estabelecida a superioridade da associação do interferon com a ribavirina (RBV) no tratamento dos pacientes com hepatite crônica pelo VHC (EASL INTERNACIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS C, 1999). Em grandes “trials”, a terapia combinada de IFN mais ribavirina, por 48 semanas, produziu RVS de 39% entre os pacientes infectados pelo genótipo 1 e de 65% entre pacientes infectados pelo genótipo 3 (McHUTCHISON & POYNARD, 1999, POYNARD *et al.*, 1998, McHUTCHISON *et al.*, 1998). Desde então, esta terapia combinada tem sido o tratamento de eleição.

Recentemente, uma nova formulação de interferon começou a ser utilizada na hepatite crônica pelo VHC, os interferons peguilados. Estes são compostos constituídos por uma molécula de interferon-alfa que se liga covalentemente a uma molécula de Polietilenoglicol (PEG). A peguilação altera as propriedades farmacocinéticas do interferon-alfa, melhorando a absorção, reduzindo a eliminação renal e aumentando a meia vida do medicamento sem alterar a atividade antiviral do IFN. Com isto, há menor desenvolvimento de resistência, pois a droga se mantém em concentrações mais elevadas e constantes na corrente sanguínea, produzindo melhor resposta terapêutica, principalmente quando associada a ribavirina (FRIED *et al.*, 2001, DI BISCEGLIE, 2002, FRIED *et al.*, 2002).

Recentes “trials” mostram que os interferons peguilados mais a ribavirina são mais efetivos que o interferon convencional sozinho ou combinado a ribavirina ou que o PEG-interferon sozinho na obtenção de RVS. O PEG-interferon associado a

ribavirina, por 48 semanas, produziu RVS em 42 a 46% dos pacientes infectados com o genótipo 1 e de 76 a 82% entre os pacientes infectados com os genótipos 2 e 3 (ZEUZEM *et al.*, 2000, MANNS *et al.*, 2001, FRIED *et al.*, 2002).

Os fatores dependentes do hospedeiro têm menor peso que os fatores virais na hora de determinar a resposta ao tratamento antiviral na infecção pelo VHC (GONÇALES Jr *et al.*, 2004). Os fatores do hospedeiro, tanto de forma isolada quanto combinada, não permitem estabelecer indicações terapêuticas na prática clínica. Existem características pessoais, tais como sexo, raça, idade, massa corpórea ou a presença de determinados alelos em genes polimórficos que se relacionaram com a resposta. Assim, a frequência de resposta é maior em mulheres do que em homens, é menor em afro-americanos do que em caucasianos e é maior em pacientes abaixo dos 40 anos (CIVEIRA & PRIETO, 2003).

Pacientes afro-americanos com hepatite C crônica apresentaram taxas de RVS em monoterapia com IFN 6 vezes mais baixas do que as de pacientes caucasianos (2% vs 12%) (REDDY *et al.*, 1999). As taxas de RVS foram melhores em pacientes afro-americanos que receberam terapia combinada de interferon e ribavirina durante 48 semanas, embora fossem mais baixas que as atingidas em pacientes caucasianos (23% vs 42%) (McHUTCHISON *et al.*, 2000). Uma possível explicação para a taxa de resposta menor em pacientes afro-americanos é que eles têm maior prevalência de VHC genótipo 1 do que os caucasianos (HOWELL *et al.* 2000).

O aumento no índice de massa corpórea tem sido associado a menores taxas de resposta virológica na HVC. A ribavirina deve ser sempre ajustada em função do peso corpóreo, para se obter maior eficácia terapêutica; o mesmo se faz para o interferon peguilado alfa 2b. A massa corpórea modifica a concentração tissular alcançada por alguns fármacos, e isto justifica as variações na terapia em pacientes com diferentes pesos (CIVEIRA & PRIETO, 2003).

A imunossupressão seja por co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou por outros fatores (tratamentos imunossupressores, hemodiálise etc.), reduz os percentuais de RVS com estes quadros (HU *et al.*, 2001).

A presença de fibrose avançada reduz consideravelmente a frequência de resposta virológica. Na cirrose estabelecida a taxa de resposta se reduz em 50% quando comparada àqueles que apresentam fibrose mínima (ZEUZEM, 2001).

Outros parâmetros têm sido relacionados, em alguns estudos, com a resposta ao tratamento. A presença de hemossiderose geralmente se associa a piores taxas de resposta virológica (CIVEIRA & PRIETO, 2003).

## **1.2- Sistema HLA**

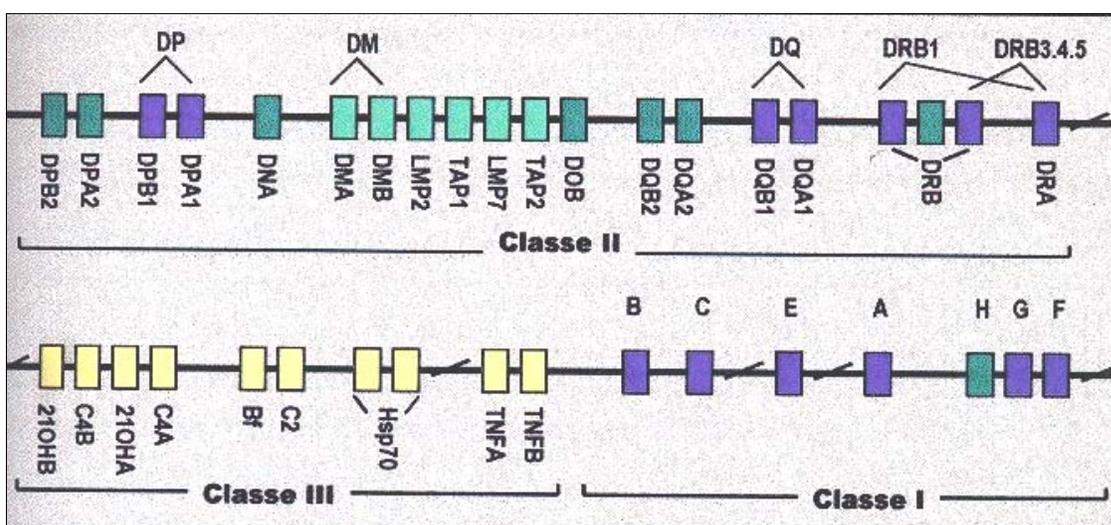
O interesse pelo estudo do Sistema HLA (“Human Leucocyte Antigens”) prende-se ao fato do mesmo ser o sistema mais polimórfico descrito no homem e da observação de que numerosas doenças (lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide juvenil, diabetes melitus insulina-dependente) apresentam associação com os antígenos HLA (COLOMBANI, 1992).

O Sistema HLA consiste em um conjunto de aloantígenos cuja importância foi reconhecida inicialmente no campo dos transplantes de tecidos e órgãos, daí serem também denominados de antígenos de histocompatibilidade. Atualmente, reconhecem-se estas moléculas como elementos capitais na interação entre células no decorrer de qualquer resposta imune (COLOMBANI, 1992).

Os genes responsáveis pela codificação dos antígenos HLA localizam-se no complexo ou região HLA que corresponde a um pequeno segmento cromossômico localizado no braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.3), compreendendo um segmento de DNA de aproximadamente 3.500 Kb. Nesta mesma região, além dos genes HLA, há outros genes que codificam para componentes do sistema complemento para enzimas (por exemplo, 21-hidroxilase), para fator de necrose tumoral e outros. Provavelmente, muitos genes ainda serão descobertos, relacionados tanto a funções imunológicas como não imunológicas (TROWSDALE, 1987b).

Complexos gênicos semelhantes existem em todos os mamíferos, talvez mesmo em todos os vertebrados, recebendo a denominação geral de “Major Histocompatibility Complex” (MHC). Os MHC mais bem estudados são o do camundongo (Complexo H2) e o do homem (Complexo HLA).

Os genes do Sistema HLA estão divididos em três regiões, sendo denominados como: genes HLA de classe I, classe II e classe III (**Figura 3**). Os genes HLA classe I (genes A, B, C) e II (genes DR, DQ, DP) codificam as glicoproteínas da superfície celular que correspondem aos antígenos HLA classe I (antígenos HLA -A, -B, -C) e classe II (antígenos HLA -DR, -DQ, -DP), respectivamente. Esses genes são codominantes, isto é, tanto os de origem materna como os de origem paterna se expressam a nível de membrana celular. Dentro da região HLA classe II foram identificados os genes que codificam as proteínas transportadoras de peptídeos (genes TAP1, TAP2) e os que codificam complexos protéicos de degradação de peptídeos (genes LMP2, LMP7). Os genes HLA classe III codificam diversas proteínas, entre elas: as do sistema complemento (C2, Bf, C4A, C4B); fator de necrose tumoral (“TNF: do inglês, tumour necrosis factor”, TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ); e proteínas do choque térmico (“HSP: do inglês, heat shoc protein”) (revisão de NEPOM & NEPOM, 1995).

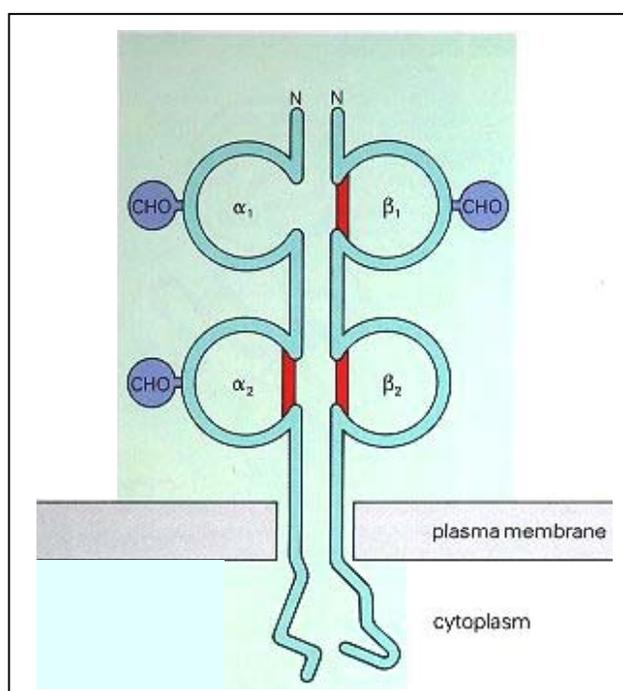


**Figura 3-** Organização gênica da região HLA.

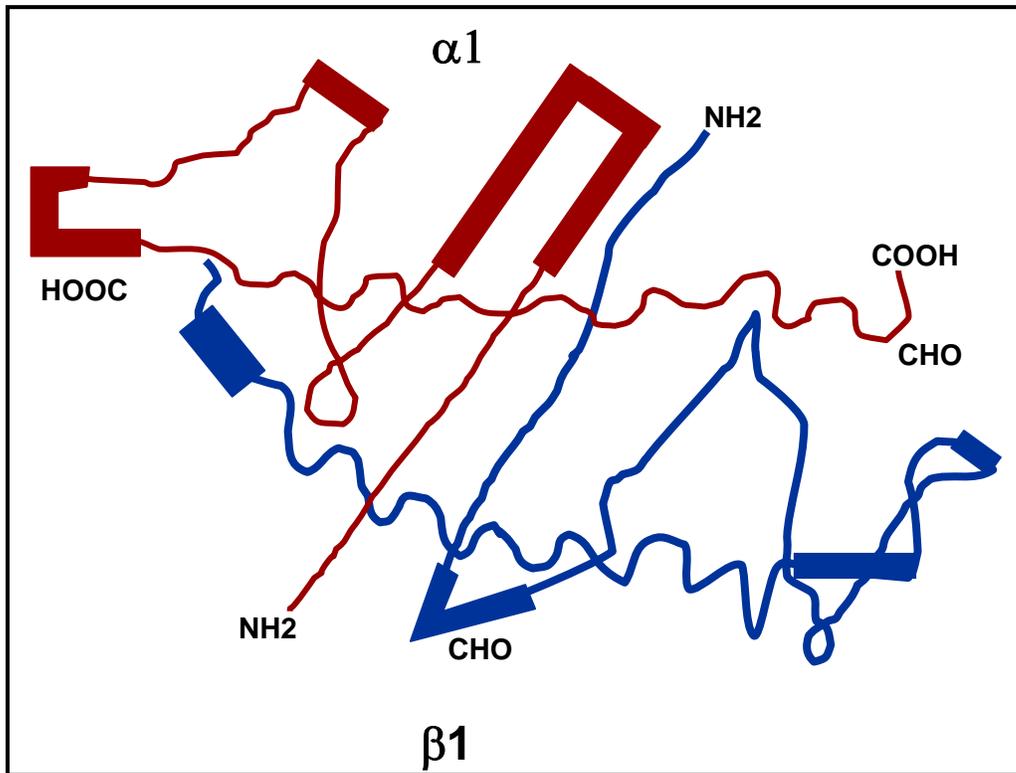
As moléculas HLA classe I estão presentes em praticamente todas as células nucleadas do organismo enquanto que as moléculas HLA classe II têm uma distribuição celular limitada, sendo encontradas principalmente em células

imunocompetentes, linfócitos B, células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas) e em células T ativadas (STRACHAN, 1987, TROWSDALE, 1987a).

As moléculas de classe II são heterodímeros constituídos por duas cadeias glicoprotéicas,  $\alpha$  (cadeia pesada) e  $\beta$  (cadeia leve), unidas de forma não-covalente (ROITT *et al.*, 1989, ABBAS *et al.*, 1995). As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam dois domínios na região extra-celular,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , respectivamente. Os domínios  $\alpha_2$  e  $\beta_2$  têm homologia com os domínios das regiões constantes das imunoglobulinas. Os resíduos polimórficos das moléculas de classe II estão concentrados nos domínios  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , que constituem o sítio de ligação ao antígeno (ABBAS, *et al.*, 1995, COLOMBANI, 1992). No caso da molécula HLA-DR, a cadeia DR $\alpha$  é invariável, sendo o domínio  $\beta_1$  da cadeia DR $\beta$  muito variável. Assim, o polimorfismo genético das moléculas de classe II determina a superfície química para a ligação de peptídeos e influi no reconhecimento antigênico pelos linfócitos T (ABBAS, *et al.*, 1995).



**Figura 4-** Esquema da molécula HLA de classe II.



**Figura 5-** Esquema do sítio antigênico da molécula HLA de classe II.

O polimorfismo dos genes do Sistema HLA é enorme. Cada lócus HLA (A, B, C, DR, DQ, DP), assim como os loci que codificam os fatores de complemento (C2, C4A, C4B, Bf) podem ser ocupados por uma série de genes alternativos que constituem as séries alélicas (ALBERT *et al.*, 1984).

Além da diversidade de genes e do polimorfismo dos alelos, outra importante característica do Sistema HLA é a existência de desequilíbrios de ligação entre os genes, isto é, associações preferenciais entre determinados alelos de diferentes loci (por exemplo, HLA-A\*0101, -B\*0801, -DRB1\*0301 e -DQB1\*0201) (THORSBY & RONNINGEN, 1993).

A enumeração dos antígenos HLA presentes em um indivíduo constitui o fenótipo HLA. O conjunto de genes presentes na região HLA carregados por um cromossomo é denominado haplótipo. O conjunto de haplótipos materno e paterno constitui o genótipo HLA (ABBAS, *et al.*, 1995).

Dada a proximidade física entre os genes do Sistema HLA, a taxa de recombinação entre os mesmos é muito pequena (<1%), com exceção talvez da taxa de recombinação entre os genes DQ e DP, que parece ser relativamente alta devido a um “hot spot” de recombinação entre os mesmos. A baixa taxa de recombinação entre os genes HLA resulta em sua transmissibilidade em bloco de uma geração para outra, obedecendo aos padrões de herança mendeliana simples (MATTIUZ *et al.*, 1970, SVEJGAARD & RYDER, 1994).

A demonstração, na década de 1960, de que a suscetibilidade a certas leucemias em camundongos era controlada por genes do MHC, inspirou a realização de estudos, no homem, sobre associação entre doenças e antígenos HLA. O relato, em 1973, da extraordinária associação entre HLA-B27 e espondilite anquilosante representa um marco histórico no estudo de genes de suscetibilidade a doenças e Sistema HLA. Os trabalhos pioneiros de SCHLOSSTEIN e colaboradores (1973) e BREWERTON e colaboradores (1973) mostraram freqüências do antígeno HLA-B27 de 88 a 96% nos pacientes, enquanto que a freqüência desse antígeno observada em indivíduos controles foi de apenas 4 a 8%. A partir desses achados, numerosos estudos foram realizados abrangendo as mais diversas patologias (TIWARI & TERASAKI, 1985).

Alguns estudos foram publicados mostrando uma associação entre genes do Sistema HLA classe II e hepatite C crônica. O método de estudo empregado nestes trabalhos foi o de associação, isto é, as freqüências dos alelos HLA classe II foram comparadas entre pacientes e indivíduos controles do mesmo grupo étnico.

### **1.3- Hepatite C e Sistema HLA**

A imunogenética da hepatite viral crônica é um campo em desenvolvimento, mas ferramentas moleculares estão se tornando disponíveis e permitirão exploração cuidadosa nessa área (ANDRADE, D.R. & ANDRADE JR., D.H., 2003). Trabalhos recentemente publicados encontraram associação entre a presença de alelos HLA classe II com variados graus de resposta virológica e com o

desenvolvimento de infecção crônica pelo VHC (ALRIC, *et al.*, 1999, ALRIC *et al.*, 2000, WAWRZYNOWICZ-SYEZEWSKA *et al.*, 2000).

ALRIC e colaboradores em 1997 publicaram um estudo em que a frequência dos alelos HLA-DQB1\*0301 e HLA-DRB1\*1101 foi significativamente maior nos pacientes com infecção transitória pelo VHC (clearance viral) quando comparada com pacientes com infecção persistente. Não foram encontradas diferenças significativas quando se comparou os pacientes com infecção persistente e pacientes com infecção transitória quanto à idade, sexo, fonte da infecção ou genótipo do VHC.

Em 1998, CRAMP e colaboradores publicaram um estudo realizado em pacientes caucasóides, do norte europeu, com infecção transitória e infecção persistente em que os alelos HLA-DRB1\*04, HLA-DQA1\*03 e HLA-DQB1\*0301 foram encontrados com uma frequência estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos pacientes que apresentaram clearance viral (infecção transitória) quando comparada com a observada entre os pacientes com infecção crônica. O alelo HLA-DQB1\*0302 foi encontrado com uma frequência reduzida ( $p < 0,05$ ) em todos os pacientes (infecção transitória e infecção persistente) quando comparada com a frequência observada no grupo controle. Os pesquisadores concluíram que os alelos HLA-DRB1\*04, HLA-DQA1\*03 e HLA-DQB1\*0301 estão associados com o clearance viral do VHC enquanto que o alelo HLA-DQB1\*0302 está associado com a proteção contra a infecção pelo VHC.

ALRIC e colaboradores, em 1999, estudaram, na França, 170 pacientes que foram tratados com interferon- $\alpha$ . Destes, 50 pacientes foram respondedores ao tratamento e os demais foram não-respondedores à monoterapia com o interferon- $\alpha$ . A maior frequência da presença do alelo HLA-DRB1\*07 foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos pacientes não-respondedores, porém, após a correção do valor de “p” não mais se observou esta diferença significativa ( $p > 0,05$ ). A frequência de presença do alelo HLA-DQB1\*06 foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) nos pacientes respondedores com infecção pelo genótipo 1 do que nos pacientes não-respondedores infectados com este genótipo. Esta diferença não permaneceu significativa após a correção de Bonferroni (multiplicação do valor de “p” pelo número de alelos estudados) ( $p > 0,05$ ).

Em 2000, ALRIC e colaboradores observaram que entre pacientes franceses o clearance espontâneo do VHC foi relacionado com a presença dos alelos HLA classe II (HLA-DRB1\*1101 e HLA-DQB1\*0301). Observaram também, que a eliminação viral foi maior entre pacientes do sexo feminino com hepatite C. O mesmo não foi observado por estes autores quando avaliaram os genótipos virais.

Em 2000, WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA e colaboradores estudaram a associação entre os alelos HLA classe II com a infecção crônica pelo VHC e a resposta ao tratamento com interferon- $\alpha$  em pacientes poloneses. Os resultados confirmaram haver associação negativa entre a infecção crônica pelo VHC e a presença do alelo HLA-DQB1\*0301. Assim, observaram que a presença do haplótipo HLA-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*02 está associada com melhor resposta virológica ao interferon- $\alpha$ . Esse mesmo haplótipo, curiosamente, está associado com a não-resposta para vacinação da hepatite B. A presença do haplótipo HLA-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*02 também se associa à maior frequência de hepatite crônica entre indivíduos infectados com o VHC.

Resistência ou susceptibilidade à infecção crônica pelo VHC podem estar ligadas ao Sistema HLA conforme observaram YENIGÜIN & DURUPINAR. Estes autores, em 2002, publicaram um trabalho realizado na Turquia mostrando uma frequência reduzida do alelo HLA-DRB1\*11 em pacientes com infecção crônica pelo VHC quando comparada com o grupo controle. Eles concluíram que este alelo pode ser um importante fator genético que confere resistência e proteção contra a infecção crônica pelo VHC.

Neste estudo, procuramos investigar a distribuição dos alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) em pacientes brasileiros com hepatite C crônica que foram respondedores ou não-respondedores ao tratamento com algum tipo de interferon utilizado isoladamente ou associado à ribavirina e correlacionamos a presença destes alelos com o grau de lesão hepática. Não encontramos na literatura especializada avaliação semelhante nesta população de pacientes brasileiros como na maioria dos países ocidentais.

## ***2- OBJETIVOS***

- 1- Associar a presença de alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) em pacientes com HVC crônica e em indivíduos sem esta infecção (grupos controles);
- 2- Avaliar a ocorrência e o grau de associação entre os alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) e as alterações anátomo-patológicas observadas em pacientes com hepatite crônica pelo VHC;
- 3- Avaliar a ocorrência e o grau de associação entre os alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1) e a resposta virológica ao tratamento antiviral em pacientes com HVC crônica.

### *3- CASUÍSTICA E MÉTODOS*

### 3.1- Pacientes

Neste trabalho foram incluídos 102 pacientes etnicamente miscigenados, não-aparentados, infectados pelo vírus da hepatite C (VHC), com testes para anticorpos anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV) e antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) negativos, atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP pelo Grupo de Estudo das Hepatites (GEHEP). Os pacientes foram incluídos sequencialmente quando da realização das consultas ambulatoriais pré-agendadas e foram realizadas, posteriormente, as revisões dos respectivos prontuários para coleta dos demais dados. Dos 102, 86,3% (88/102) eram homens e 13,7% (14/102) mulheres. Em todos os pacientes foi pesquisada a presença do anti-HCV (HCV MEIA versão 3.0, ABBOTT Laboratories, North Chicago, IL), do RNA do VHC (AMPLICOR HCV Test, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NY, USA) e realizadas as dosagens de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), Gama-GT (gama glutamil transferase) e Fosfatase Alcalina. Todos apresentaram a pesquisa do RNA-VHC positiva pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) antes do início do tratamento. Os pacientes foram tratados com Interferon (IFN) isolado (13 pacientes) ou associado à Ribavirina (78 pacientes) ou PEG-Interferon (PEG-IFN) associado à Ribavirina (RBV) (11 pacientes). O Interferon- $\alpha$  2a ou 2b foi utilizado na dose de 3.000.000 de unidades três vezes por semana, por via subcutânea. Os pacientes que foram tratados com PEG-Interferon Alfa 2b receberam a dose padrão de 1,5 mcg/Kg. A Ribavirina foi utilizada na dose de 1000 a 1200 mg por dia, via oral, de acordo com o peso do paciente (<75Kg/ >75Kg). A duração do tratamento variou de acordo com o genótipo:

- 48 semanas para genótipo 1;
- 24 semanas para genótipo 3.

Uma nova pesquisa do RNA-VHC foi realizada na 24<sup>a</sup> semana de tratamento nos pacientes que apresentavam infecção pelo genótipo 3 e na 48<sup>a</sup> semana nos pacientes que apresentaram infecção pelo genótipo 1. Se os pacientes apresentassem RNA-VHC positivo ao final do tratamento eram considerados não-respondedores à terapêutica. Se os pacientes com infecção pelo genótipo 3 apresentassem RNA-VHC negativo na 24<sup>a</sup> semana

e os pacientes com infecção pelo genótipo 1 apresentassem RNA-VHC negativo na 48ª semana eram considerados respondedores ao final do tratamento.

Nova pesquisa do RNA-VHC foi realizada 6 meses após o final do tratamento em todos os pacientes sendo considerado como respondedor virológico sustentado (RVS) os que permaneceram negativos (n=52 pacientes) e não-respondedores (NR) os que apresentaram positividade para a PCR (n=50 pacientes).

Os grupos controles (n=99 indivíduos para os alelos DRB1 e n=222 indivíduos para os alelos DQB1) foram constituídos por doadores de medula óssea sem evidência de doença hepática e negativos para o anti-HCV atendidos junto ao Laboratório de Histocompatibilidade (HLA) no Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP (Hemocentro).

Foram excluídos os pacientes das raças negra e amarela, os pacientes anti-HIV positivos e os pacientes HBsAg positivos.

### **3.2- Testes laboratoriais**

Todas as 102 amostras utilizadas em nosso estudo foram previamente submetidas ao teste da RT-PCR qualitativo (AMPLICOR HCV Test, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NY, USA) para confirmar a infecção pelo VHC. O teste de genotipagem do VHC (INNO-LIPA HCV II INNOGENETICS, Ghent, Belgium) foi realizado em 79 amostras e o teste de sorotipagem do VHC (ABBOTT MUREX HC02, Dartford, UK) foi feito em outras 19 amostras. Em 2 casos não se conseguiu genotipar ou sorotipar o VHC na amostra pré-tratamento. Em outros 2 pacientes, por problemas técnicos com as amostras do estudo, não foi possível obter-se o genótipo do VHC.

A biópsia hepática foi rotineiramente realizada em 83 pacientes do estudo por via percutânea, guiadas com ultra-som ou por via laparoscópica, com agulhas de Menghini ou Trucut 14G. O fragmento hepático após ser processado era corado com hematoxilina e eosina, tricômico de Masson e reticulina. A indicação da biópsia hepática seguiu os critérios do GEHEP e fazia parte da abordagem assistencial dos pacientes. Nenhuma biópsia foi realizada para este estudo específico.

A biópsia foi classificada de acordo com o estadiamento da fibrose (DESMET, *et al.*, 1994, GAYOTTO, 2000), dentro da rotina diagnóstica do Departamento de Patologia da FCM-UNICAMP. O estadiamento da fibrose variou de 0 a 4 (0 – fibrose ausente; 1 – fibrose portal sem septos; 2 – fibrose portal com poucos septos; 3 – fibrose portal com numerosos septos delineando nódulos sem cirrose; 4 – cirrose). O grau da atividade histológica foi, também, avaliado levando-se em conta a atividade inflamatória na região portal, peri-portal e lobular, usando-se o seguinte critério: 0- sem atividade histológica; 1- lesões mínimas; 2- atividade leve; 3- atividade moderada; 4- atividade severa. Para a avaliação das seções histológicas foram considerados pelo Departamento da Patologia, somente os fragmentos hepáticos com pelo menos 7 espaços porta.

### 3.2.1- Genotipagem para o VHC

A genotipagem para o VHC foi realizada pela técnica de hibridização reversa, através da utilização do teste comercial (INNO-LIPA HCV II INNOGENETICS, Ghent, Belgium). A execução e a interpretação dos resultados obedeceram rigorosamente às especificações e padronizações do fabricante.

Resumidamente, o teste permitiu a determinação dos seis genótipos e seus subtipos, baseando-se nas variações encontradas na região 5' não codificadora (5'NCR) dos diferentes genótipos do VHC. Os produtos foram marcados pela biotina e reversamente hibridizados por uma sonda, através da incorporação do primer 5'- biotinilado, a temperatura de 50°C para a amplificação. Após a hibridização, adicionou-se fosfatase alcalina conjugada a estreptavidina, que se ligou aos híbridos previamente formados. Depois, incubou-se com um cromógeno, que permitiu a formação de um precipitado de cor púrpura/acastanhado evidenciando-se as linhas onde ocorreu a hibridização. Consequentemente, a linha que apresentou a cor púrpura/acastanhada foi considerada positiva, sendo a representação da interação entre a sonda e o produto de PCR biotinilado. O resultado foi interpretado utilizando-se uma tabela que permitiu visualizar e determinar todas as linhas com coloração (presença de hibridização), obtendo-se assim, a determinação do genótipo e seu subtipo.

### 3.2.2- Sorotipagem para o VHC

O teste de sorotipagem para o VHC é um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos para os sorotipos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do vírus, utilizando-se soro humano. Para a realização deste teste foi utilizado um kit comercial (ABBOTT MUREX HC02, Dartford, UK).

Neste ensaio de sorotipagem, resumidamente, a amostra diluída é incubada na presença de péptidos heterólogos concorrentes, com microcavidades revestidas com antígenos específicos de sorotipo de VHC. Durante a primeira incubação, quaisquer anticorpos anti-HCV específicos do sorotipo presentes na amostra ligar-se-ão aos antígenos imobilizados. Depois da lavagem, para eliminar o material não ligado, os anticorpos anti-HCV capturados são incubados com o conjugado peroxidase-anti-IgG humana monoclonal. Durante a segunda incubação formar-se-á um complexo antígeno-anticorpo humano-anticorpo anti-humano/enzima nas microcavidades contendo amostras com anticorpos para um sorotipo específico de VHC. Depois da eliminação do excesso do conjugado, a enzima ligada é detectada através da adição de uma solução contendo 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. Desenvolve-se uma cor púrpura nas cavidades contendo amostras reativas anti-HCV. A reação enzimática é terminada com a adição de ácido sulfúrico, desenvolvendo uma cor laranja, lida fotometricamente. A quantidade de conjugado ligado é quantitativa, daí a cor nas cavidades estar diretamente relacionada com a concentração de anticorpos específicos na amostra.

### 3.2.3- Genotipagem dos alelos HLA classe II dos pacientes infectados pelo VHC

O material utilizado foi sangue total colhido em tubo vacutainer de 5mL com anticoagulante EDTA durante uma das avaliações ambulatoriais do GEHEP. Imediatamente após a coleta, o material era encaminhado para o laboratório de Biologia Molecular do GEHEP para ser processado.

O DNA dos pacientes foi extraído através do kit comercial Puregene<sup>TM</sup> DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Inc. – USA), resumidamente através dos seguintes procedimentos: adicionam-se 300µL de sangue total em um eppendorf de 1,5mL contendo

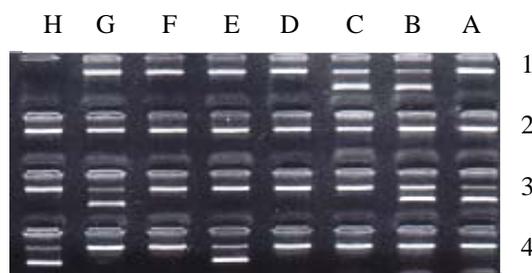
900µL de Solução de Lise de Hemácias; homogeneiza-se por inversão e incuba-se por 10 minutos à temperatura ambiente. O material é centrifugado por um minuto a 13000 rpm. Remove-se o sobrenadante com uma pipeta deixando, aproximadamente, 20µL do líquido residual; neste momento, o pellet de leucócitos já é visualizado. Aplica-se um vórtex vigoroso até esse pellet se desmanchar por completo. Adicionam-se 300µL de Solução de Lise de Leucócitos e 100µL de Solução de Precipitação de Proteína. Aplica-se um vórtex vigoroso por, aproximadamente, vinte segundos. Centrifuga-se por três minutos a 13000 rpm; neste momento é visualizado um pellet de cor marrom escura (é desprezado). O sobrenadante é colocado em um outro eppendorf de 1,5mL, devidamente identificado, já contendo 300µL de álcool isopropílico. Homogeneiza-se por inversão 50 vezes. Neste momento, a fita de DNA já é visível. Centrifuga-se, novamente, um minuto a 13000 rpm. Haverá a formação de um pequeno pellet branco e o sobrenadante é desprezado. Deixa-se o eppendorf secar, virado para baixo, sobre um papel absorvente para que saia todo o excesso de álcool isopropílico. Adicionam-se, então, 300µL de etanol 70% gelado e centrifuga-se um minuto a 13000 rpm. Despreza-se todo o sobrenadante (etanol) e deixa-se secar à temperatura ambiente sobre papel absorvente, de dez a quinze minutos. Depois do eppendorf completamente seco adicionam-se 150µL de Solução de Hidratação de DNA. Veda-se o eppendorf para que não ocorra evaporação do material sendo, então, deixado em banho seco a 37°C overnight. No dia seguinte ele é testado em gel de agarose a 2% para verificação de sua qualidade (5µL de DNA e 2µL do corante azul de bromofenol). Depois disto, o DNA está pronto para a realização da genotipagem HLA classe II. Caso não fosse utilizado imediatamente, ele poderia ser conservado à temperatura de -20°C por um período mínimo de 12 meses.

A genotipagem foi realizada pela técnica de PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primer) de baixa resolução (Micro SSP2L, One Lambda, Canoga Park, CA, USA). A amplificação, pelo método de PCR, dos genes DRB1 e DQB1 foi realizada, resumidamente, através dos seguintes procedimentos: 39µL de DNA são adicionados à solução Master Mix (One Lambda – Biosystems) e acrescidos de 20µL de taq DNA polimerase. Homogeneiza-se bem o PCR mix utilizando o vórtex. Dispensam-se 10µL do PCR mix nos 32 microtubos da reação os quais contém os “primers” específicos e

liofilizados. Vedam-se bem os microtubos para que não ocorra evaporação. Eles são colocados no termociclador (Perkin Elmer Cetus, Cetus Corp 9600, Boston, MA, USA) para que se inicie o processo de amplificação.

A amplificação ocorre, inicialmente, a 96°C por dois minutos e dez segundos para permitir a desnaturação das moléculas de cadeias duplas do DNA alvo. Após este período, seguem-se nove ciclos de 96°C por dez segundos (desnaturação) e 63°C por sessenta segundos, intervalo este, que permitirá o enovelamento dos “primers” com sua respectiva cadeia do DNA. Terminados estes, iniciam-se mais vinte ciclos, sendo: a 96°C (desnaturação) por dez segundos; 59°C por cinqüenta segundos e 72°C por trinta segundos, temperatura ótima para a atividade da taq DNA polimerase, com conseqüente extensão da cadeia complementar de DNA na direção 5’ a 3’.

O produto final foi, então, examinado por eletroforese, em gel de agarose a 2,5%, corado pelo brometo de etídio e visualizado através de luz ultravioleta. Fotografia “polaroid” (**Figura 6**) em branco e preto foi tirada para registro permanente de cada genotipagem. A interpretação dos resultados da PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento específico de DNA amplificado. Um controle interno de reação é incluído em toda reação de PCR. Este controle interno amplifica uma região conservada do gene da  $\beta$ -globina Humana que está presente em toda amostra de DNA humano e é usado para verificar a integridade da reação de PCR. A análise e interpretação dos resultados foram feitas através de planilhas fornecidas pelo fabricante e devidamente arquivadas.



**Legenda:** Controle Negativo: 1H; Controle Interno: presente em todas as reações (exceto em 1H); Reações Positivas: 1B, 1C, 3A, 3B, 3G, 4E, 4H; Linhas 1, 2 e 3: alelos HLA-DRB1 (HLA-DRB1\*03, HLA-DRB1\*07); Linha 4: alelos HLA-DQB1 (HLA-DQB1\*02, HLA-DQB1\*02)

**Figura 6-** Genotipagem (PCR-SSP) dos alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1)

### 3.3- Análise estatística

Para descrever as frequências fenotípicas em cada grupo foram feitas tabelas de frequência.

Para comparar as frequências entre os grupos de Controles e Casos utilizado o teste Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) ou, quando necessário (valores esperados menores que 5), o teste exato de Fisher. Em seguida, foi calculado o valor de p corrigido pela correção de Bonferroni, multiplicando-se o p-valor original por 13 para os alelos DRB1 e por 5 para os alelos DQB1.

Também foi feito o cálculo da Razão de Risco (OR=Odds Ratio) e o respectivo Intervalo de 95% de Confiança (IC 95%) na comparação entre os grupos Caso e Controle.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja,  $p < 0,05$ .

O valor de p corrigido raramente alcança significância estatística a nível de 0,05. O p corrigido corresponde ao valor de p (resultante do teste de qui quadrado ou do teste de Fisher, conforme o número de amostra), multiplicado pelo número de alelos estudados. Esta correção faz-se necessária pois os dois grupos estudados (pacientes versus indivíduos controles) estão sendo submetidos a comparações múltiplas, uma vez que cada alelo HLA pesquisado gera uma tabela de contingência 2x2. Aceitando-se como 5% a probabilidade de erro em cada uma das comparações, se 20 comparações forem analisadas é altamente provável ( $20 \times 5 = 100$ ) que uma delas apresente  $p < 0,05$ , simplesmente ao acaso (SVEJGAARD e RYDER, 1979). O critério de correção do valor de p deve ser sempre obedecido quando se trata de um primeiro trabalho sobre associação entre alelos HLA e doenças. Em trabalhos subseqüentes, pode ser dispensado, desde que haja clara hipótese H1 em relação ao(s) alelo(s) associado(s). Deve-se salientar, entretanto, que a menos que o número de pacientes e de controles seja muito grande, ou que a diferença de frequência do alelo seja extremamente diferente entre os grupos, o valor de p corrigido não atinge significância estatística (SVEJGAARD e RYDER, 1979).

Em se tratando de estudo de associação de alelos HLA e doenças, o problema de origem étnica deve ser sempre considerado, uma vez que as associações podem variar quantitativamente ou qualitativamente em diferentes grupos étnicos (HORS, 1985).

Utilizou-se nas análises referidas o software: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 6.12.

SAS Institute Inc, 1989-1996, Cary, NC, USA.

## ***4- RESULTADOS***

Na **tabela 1** estão listadas algumas características dos pacientes com RVS (n=52) e sem RVS (n=50), tais como idade, sexo e fatores de risco para a aquisição da hepatite C, levantadas pela consulta dos prontuários.

Dos 102 pacientes que fizeram parte do estudo, 86,3% (88/102) eram do sexo masculino e 13,7% (14/102) do sexo feminino.

Entre os 52 pacientes com RVS, 86,5% (45/52) eram do sexo masculino e 13,5% (7/52) eram do sexo feminino. A média de idade nesta população foi de  $43,2 \pm 11,4$  anos. Nos 50 pacientes sem RVS, 86% (43/50) eram do sexo masculino e 14% (7/50) eram do sexo feminino e a média de idade foi de  $44,1 \pm 9,2$  anos. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ) em relação à idade e sexo dos pacientes com RVS e dos pacientes sem RVS.

Analisando-se ainda na **tabela 1**, os fatores de risco para a aquisição do VHC nos 102 indivíduos da população estudada, observa-se que entre os 52 pacientes com RVS, 23,1% (12/52) fizeram uso de droga endovenosa; 15,4% (8/52) foram submetidos à transfusão sanguínea; 9,6% (5/52) foram submetidos à cirurgia prévia; 1,9% (1/52) teve como fator de risco a tatuagem, 1,9% (1/52) fez uso de acupuntura e em 48,1% (25/52) não foi possível a identificação dos fatores de risco.

Dos 50 pacientes sem RVS, 26% (13/50) eram usuários de droga endovenosa; 22% (11/50) foram submetidos à transfusão de sangue; 8% (4/50) foram submetidos à cirurgia prévia; 2% (1/50) referiram a tatuagem como o possível fator de risco; 2% (1/50) referiram atuar em atividade profissional de risco; 2% (1/50) relataram como fator de exposição um contato sexual suspeito e em 38% (19/50) não foi identificada a presença de fatores de risco. Analisando-se os dados relativos aos fatores de risco encontrados nos pacientes com RVS e nos pacientes sem RVS, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre pacientes de ambos os grupos ( $p>0,05$ ).

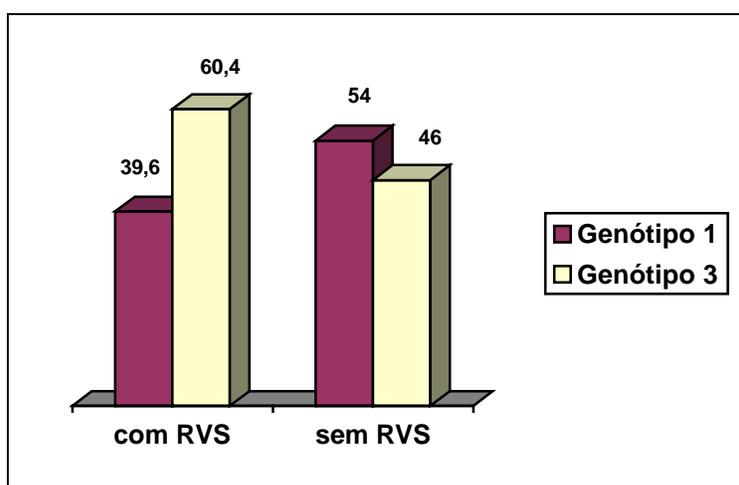
**Tabela 1-** Características dos 102 pacientes com infecção crônica pelo VHC de acordo com a resposta à terapêutica.

Características	Pac. com RVS		Pac. sem RVS		Total	
	(n=52)		(n=50)		(n=102)	
Idade (média ± DP)	43.2 ± 11.4		44.1 ± 9.2		44.4 ± 10.3	
Sexo (M/F)	45/07		43/07		88/14	
Fatores de Risco	N	%	N	%	N	%
Usuários de droga endovenosa	12/52	23.1	13/50	26	25/102	24.5
Transfusão	8/52	15.4	11/50	22	19/102	18.6
Cirurgia prévia	5/52	9.6	4/50	8	9/102	8.8
Tatuagem	1/52	1.9	1/50	2	2/102	2
Acupuntura	1/52	1.9	--	--	1/102	1
Profissional da saúde	--	--	1/50	2	1/102	1
Contato sexual	--	--	1/50	2	1/102	1
Desconhecido	25/52	48.1	19/50	38	44/102	43.1

Os testes de genotipagem e sorotipagem foram realizados em 79 e 19 pacientes, respectivamente, com infecção crônica pelo VHC. O genótipo 1 foi encontrado em 47% (46/98) dos pacientes e o genótipo 3 em 53% (52/98) dos pacientes com infecção pelo VHC. Não foram encontrados pacientes infectados com outros genótipos.

O genótipo 1 foi encontrado em 39,6% (19/48) dos pacientes que responderam ao tratamento (pacientes com RVS) e em 54% (27/50) dos pacientes que não responderam ao tratamento antiviral (pacientes sem RVS), enquanto que o genótipo 3 foi encontrado em 60,4% (29/48) dos pacientes com RVS e em 46% (23/50) dos pacientes sem RVS (**Figura 7**).

Assim, relacionando-se resposta ao tratamento antiviral (pac. com RVS e pac. sem RVS) e genótipo do VHC encontrado, não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p>0,05$ ). Cabe acrescentar que aqui estão avaliados pacientes que foram tratados com diferentes formulações de interferon (alfa-2a, alfa-2b ou IFN peguilado) isolados ou combinados com ribavirina por diferentes períodos de tempo e que apresentavam diferentes graus de lesões hepáticas.



**Figura 7-** Distribuição dos genótipos dos pacientes com infecção crônica pelo VHC, de acordo com resposta ou não resposta ao tratamento antiviral.

Nas **tabelas 2 e 3** estão listados os resultados da pesquisa dos alelos HLA classe II, DRB1 e DQB1, respectivamente, nos 102 pacientes com infecção crônica pelo VHC. Estes resultados foram comparados com a distribuição destes mesmos alelos nos grupos controles. Como se nota na **tabela 2**, houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) na frequência dos alelos HLA-DRB1\*13 e HLA-DRB1\*07 entre os pacientes com infecção crônica pelo VHC quando comparados com o grupo controle. Como se observa, após a correção do valor de “p” houve diferença significativa somente para o alelo HLA-DRB1\*07 ( $p<0,05$ ).

Na **tabela 3**, observou-se uma maior frequência do alelo HLA-DQB1\*02 nos pacientes com infecção crônica pelo VHC antes da correção de Bonferroni ( $p<0,05$ ).

**Tabela 2-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com infecção crônica pelo VHC e grupo controle.

DRB1	Controles (n=99)		Pacientes (n=102)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
01	24	24.1	16	15.7	0.1288	N.S.	0.58	0.27 – 1.24
15	14	14.1	16	15.7	0.7586	N.S.	1.13	0.49 – 2.63
16	3	3	9	8.8	0.0831	N.S.	3.1	0.74 – 14.93
03	18	18.2	25	24.5	0.2741	N.S.	1.46	0.7 – 3.05
04	15	15.1	23	22.5	0.1805	N.S.	1.63	0.75 – 3.56
11	26	26.3	25	24.5	0.7753	N.S.	0.91	0.46 – 1.81
12	4	4	1	1	0.2072 <sup>F</sup>	N.S.	0.24	0.01 – 2.29
13	14	14.1	27	26.5	<b>0.0301</b>	0.3913	2.19	1.01 – 4.76
14	8	8.1	4	3.9	0.2134	N.S.	0.46	0.11 – 1.78
07	12	12.1	34	33.3	<b>0.0003</b>	<b>0.0039</b>	<b>3.63</b>	1.66 – 8.05
08	6	6.1	7	6.9	0.8172	N.S.	1.14	0.33 – 4.01
09	3	3	3	2.9	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.97	0.15 – 6.19
10	7	7.1	3	2.9	0.2092 <sup>F</sup>	N.S.	0.4	0.08 – 1.78

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 3-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com infecção crônica pelo VHC e grupo controle.

DQB1	Controles (n=222)		Pacientes (n=102)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
02	86	38.7	54	52.9	<b>0.0165</b>	0.0825	1.78	1.08 – 2.94
03	119	53.6	52	51	0.6605	N.S.	0.9	0.55 – 1.48
04	24	10.8	6	5.9	0.1552	N.S.	0.52	0.18 – 1.39
05	79	35.6	36	35.3	0.9594	N.S.	0.99	0.59 – 1.66
06	85	38.3	39	38.2	0.9927	N.S.	1	0.6 – 1.66

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

Observa-se, nas **tabelas 4 e 5**, a distribuição dos alelos HLA classe II, DRB1 e DQB1, respectivamente, em pacientes que apresentaram resposta virológica sustentada (RVS) após o tratamento com algum tipo de interferon isoladamente ou associado à ribavirina quando comparados com os grupos controles. Na **tabela 4**, nota-se que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas na frequência do alelo HLA-DRB1\*07 entre os pacientes com RVS quando comparou-se com o grupo controle mesmo após a correção de Bonferroni ( $p\text{-corrigido} < 0,05$ )

Entre os alelos DQB1, como mostra a **tabela 5**, não observou-se diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a presença destes alelos em um maior grau de RVS quando comparado com seu grupo controle.

**Tabela 4-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e grupo controle.

DRB1	Controles (n=99)		Pac. com RVS (n=52)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
01	24	24.1	9	17.3	0.3272	N.S.	0.65	0.25 – 1.65
15	14	14.1	9	17.3	0.6069	N.S.	1.27	0.46 – 3.45
16	3	3	4	7.7	0.2338 <sup>F</sup>	N.S.	2.67	0.48 – 15.77
03	18	18.2	11	21.2	0.6595	N.S.	1.21	0.48 – 3.01
04	15	15.1	10	19.2	0.5216	N.S.	1.33	0.5 – 3.49
11	26	26.3	12	23.1	0.6682	N.S.	0.84	0.36 – 1.97
12	4	4	1	1.9	0.6601 <sup>F</sup>	N.S.	0.47	0.02 – 4.61
13	14	14.1	13	25	0.0980	N.S.	2.02	0.8 – 5.1
14	8	8.1	3	5.8	0.7490	N.S.	0.7	0.14 – 3.07
07	12	12.1	17	32.7	<b>0.0023</b>	<b>0.0299</b>	<b>3.52</b>	1.42 – 8.84
08	6	6.1	4	7.7	0.7373 <sup>F</sup>	N.S.	1.29	0.29 – 5.51
09	3	3	0	0	0.5515 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 4.3
10	7	7.1	2	3.8	0.7192 <sup>F</sup>	N.S.	0.53	0.07 – 2.92

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 5-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e grupo controle.

DQB1	Controles (n=222)		Pac. com RVS (n=52)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
02	86	38.7	24	46.2	0.3262	N.S.	1.36	0.71 – 2.6
03	119	53.6	23	44.2	0.2234	N.S.	0.69	0.36 – 1.31
04	24	10.8	4	7.7	0.5040	N.S.	0.69	0.19 – 2.22
05	79	35.6	21	40.4	0.5176	N.S.	1.23	0.63 – 2.38
06	85	38.3	17	32.7	0.4524	N.S.	0.78	0.39 – 1.55

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

Analisando-se as **tabelas 6 e 7**, que mostram, respectivamente, as frequências dos alelos HLA classe II, DRB1 e DQB1, entre os pacientes sem RVS e seus grupos controles observa-se frequência significativa ( $p < 0,05$ ) dos alelos HLA-DRB1\*13, HLA-DRB1\*07 e HLA-DQB1\*02. Ao corrigirmos o valor de “p”, os alelos HLA-DRB1\*07 e HLA-DQB1\*02 continuaram apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 em pacientes sem RVS e grupo controle.

DRB1	Controles (n=99)		Pac. sem RVS (n=50)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
01	24	24.1	7	14	0.1458	N.S.	0.51	0.18 – 1.38
15	14	14.1	7	14	0.9813	N.S.	0.99	0.33 – 2.87
16	3	3	5	10	0.1188 <sup>F</sup>	N.S.	3.56	0.7 – 19.79
03	18	18.2	14	28	0.1682	N.S.	1.75	0.73 – 4.19
04	15	15.1	13	26	0.1095	N.S.	1.97	0.79 – 4.92
11	26	26.3	13	26	0.9725	N.S.	0.99	0.42 – 2.28
12	4	4	0	0	0.3010 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 3.05
13	14	14.1	14	28	<b>0.0409</b>	0.5317	2.36	0.95 – 5.91
14	8	8.1	1	2	0.2732 <sup>F</sup>	N.S.	0.23	0.01 – 1.92
07	12	12.1	17	34	<b>0.0014</b>	<b>0.0182</b>	3.73	1.49 – 9.43
08	6	6.1	3	6	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.99	0.19 – 4.73
09	3	3	3	6	0.4035 <sup>F</sup>	N.S.	2.04	0.31 – 13.3
10	7	7.1	1	2	0.2683 <sup>F</sup>	N.S.	0.27	0.01 – 2.28

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 7-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 em pacientes sem RVS e grupo controle.

DQB1	Controles (n=222)		Pac. sem RVS (n=50)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
02	86	38.7	30	60	<b>0.0060</b>	<b>0.03</b>	2.37	1.21 – 4.66
03	119	53.6	29	58	0.5728	N.S.	1.2	0.62 – 2.33
04	24	10.8	2	4	0.1855 <sup>F</sup>	N.S.	0.34	0.05 – 1.58
05	79	35.6	15	30	0.4531	N.S.	0.78	0.38 – 1.58
06	85	38.3	22	44	0.4551	N.S.	1.27	0.65 – 2.46

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

As **tabelas 8 e 9** mostram as frequências fenotípicas dos alelos HLA classe II, DRB1 e DQB1, respectivamente, nos pacientes com RVS e pacientes sem RVS. Como é observado, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição destes alelos nos dois grupos quando comparados ( $p>0,05$ ).

**Tabela 8-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1 entre pacientes com RVS e pacientes sem RVS.

DRB1	Pac. com RVS (n=52)		Pac. sem RVS (n=50)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	(%)	N	(%)				
01	9	17.3	7	14	0.6461	N.S.	1.29	0.39 – 4.27
15	9	17.3	7	14	0.6461	N.S.	1.29	0.39 – 4.27
16	4	7.7	5	10	0.7387 <sup>F</sup>	N.S.	0.75	0.16 – 3.5
03	11	21.2	14	28	0.4217	N.S.	0.69	0.25 – 1.87
04	10	19.2	13	26	0.4135	N.S.	0.68	0.24 – 1.9
11	12	23.1	13	26	0.7315	N.S.	0.85	0.32 – 2.31
12	1	1.9	0	0	1 <sup>F</sup>	N.S.	---	---
13	13	25.0	14	28	0.7314	N.S.	0.86	0.32 – 2.26
14	3	5.8	1	2	0.6178 <sup>F</sup>	N.S.	3	0.26 – 77.6
07	17	32.7	17	34	0.8886	N.S.	0.94	0.38 – 2.33
08	4	7.7	3	6	1 <sup>F</sup>	N.S.	1.31	0.23 – 7.86
09	0	0.0	3	6	0.1142 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 2.14
10	2	3.8	1	2	1 <sup>F</sup>	N.S.	1.96	0.13 – 56.54

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher. OR para pacientes com RVS em relação a pacientes sem RVS.

**Tabela 9-** Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1 entre pacientes com RVS e pacientes sem RVS.

DQB1	Pac. com RVS (n=52)		Pac. sem RVS (n=50)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	(%)	N	(%)				
02	24	46.2	30	60	0.1613	N.S.	0.57	0.24 – 1.35
03	23	44.2	29	58	0.1643	N.S.	0.57	0.24 – 1.35
04	4	7.7	2	4	0.6783 <sup>F</sup>	N.S.	2	0.29 – 16.61
05	21	40.4	15	30	0.2726	N.S.	1.58	0.64 – 3.9
06	17	32.7	22	44	0.2401	N.S.	0.62	0.26 – 1.49

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher. OR para pacientes com RVS em relação a pacientes sem RVS.

Foi possível levantar os dados relativos à biópsia hepática em 83 pacientes (**tabela 10**). A análise do estágio de fibrose observada na avaliação histopatológica mostra que entre os pacientes com RVS, 15% (6/40) não apresentaram fibrose, 30% (12/40) apresentaram fibrose portal, 42,5% (17/40) apresentaram fibrose portal com septos, 7,5% (3/40) apresentaram fibrose com septos e nódulo e 5% (2/40) apresentaram cirrose. Entre os pacientes não-respondedores ao tratamento, 4,6% (2/43) não apresentaram fibrose, 4,6% (2/43) apresentaram fibrose portal, 37,3% (16/43) apresentaram fibrose portal com septos, 34,9% (15/43) apresentaram fibrose com septos e nódulos e 18,6% (8/43) apresentaram cirrose. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo de pacientes com RVS quando comparado com o grupo de pacientes sem RVS. Assim, no grupo sem RVS houve maior porcentual de pacientes com alterações histopatológicas em estágios avançados (F3 e F4). No grupo com RVS houve predomínio de fibrose leve (F1).

**Tabela 10-** Alterações estruturais hepáticas (estágio de fibrose) observadas em 83 pacientes com hepatite crônica pelo vírus C, nos 2 grupos.

Diagnóstico Histológico	Pac. com RVS		Pac. sem RVS		Total	
	N	%	N	%	N	%
<b>Fibrose</b>	<b>N=40</b>		<b>N=43</b>		<b>N=83</b>	
F0 (sem fibrose)	6/40	15	2/43	4.6	8/83	9.7
F1 (fibrose portal)	12/40	30*	2/43	4.6	14/83	16.9
F2 (fibrose portal com septos)	17/40	42.5	16/43	37.3	33/83	39.7
F3 (fibrose com septos e nódulos)	3/40	7.5	15/43	34.9*	18/83	21.7
F4 (cirrose)	2/40	5	8/43	18.6	10/83	12

\*p<0,05

As **tabelas 11 e 12** correlacionam a presença ou não de fibrose e os estágios de fibrose encontrados nas biópsias hepáticas com os alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1. Nas **tabelas 11 e 12**, pacientes com fibrose (F1, F2, F3, F4) (n=75) foram comparados com pacientes sem fibrose (F0) (n=8). Observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa de ocorrência de fibrose entre pacientes com diferentes alelos DRB1 e DQB1 (p>0,05).

**Tabela 11-** Presença e estágio de fibrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DRB1.

DRB1	Pac. com fibrose (F1, F2, F3, F4) (n=75)		Pac. sem Fibrose (F0) (n=8)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
	01	12	16	1				
15	12	16	1	12.5	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.75	--
16	6	8	1	12.5	0.5219 <sup>F</sup>	N.S.	1.64	--
03	18	24	2	25	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	1.06	0.13 – 6.65
04	17	22.7	3	37.5	0.3921 <sup>F</sup>	N.S.	2.05	0.34 – 11.41
11	21	28	2	25	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.86	0.11 – 5.32
12	1	1.3	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 82.49
13	17	22.7	1	12.5	0.6795 <sup>F</sup>	N.S.	0.49	0.02 – 4.5
14	1	1.3	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 182.49
07	26	34.7	2	25	0.7110 <sup>F</sup>	N.S.	0.63	0.08 – 3.84
08	6	8	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 10.06
09	2	2.7	1	12.5	0.2650 <sup>F</sup>	N.S.	5.21	0 – 91.93
10	3	4	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 25.03

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.N.S

**Tabela 12-** Presença e estágio de fibrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DQB1.

DQB1	Pac. com fibrose (F1, F2, F3, F4) (n=75)		Pac. sem Fibrose (F0) (n=8)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
	02	40	53.3	4				
03	40	53.3	6	75	0.2889 <sup>F</sup>	N.S.	2.63	0.43 – 20.24
04	5	6.7	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 12.73
05	27	36	1	12.5	0.2562 <sup>F</sup>	N.S.	0.25	0.01 – 2.27
06	27	36	2	25	0.7070 <sup>F</sup>	N.S.	0.59	0.08 – 3.62

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

Nas **tabelas 13 e 14** distribuimos os pacientes com diferentes estágios de fibrose (F1, F2 e F3) e os pacientes com cirrose hepática (CH) correlacionando-os com os alelos DRB1 e DQB1. Foram comparados pacientes que apresentavam fibrose F1, F2 e F3 (n=65) com pacientes com CH (n=10). Como se nota na **tabela 13**, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na frequência do alelo HLA-DRB1\*04. Após a correção do valor de “p” esta diferença estatística desapareceu ( $p > 0,05$ ). Com relação aos alelos HLA-DQB1 observa-se, na **tabela 14**, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

**Tabela 13-** Presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DRB1.

DRB1	Pac. com fibrose (F1, F2, F3) (n=65)		Pac. com Cirrose Hepática (CH) (n=10)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
	01	9	13.8	3				
15	10	15.4	2	20	0.6573 <sup>F</sup>	N.S.	1.38	0.17 – 8.83
16	6	9.2	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 6.65
03	17	26.1	1	10	0.4347 <sup>F</sup>	N.S.	0.31	0.01 – 2.78
04	12	18.5	5	50	<b>0.0413<sup>F</sup></b>	0.5369	4.42	0.91 – 21.81
11	18	27.7	3	30	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	1.12	0.2 – 5.63
12	1	1.5	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 123.38
13	15	23.1	2	20	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.83	0.11 – 5.03
14	1	1.5	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 123.38
07	22	33.8	4	40	0.7305 <sup>F</sup>	N.S.	1.3	0.27 – 6.02
08	6	9.2	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 6.65
09	2	3.1	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 30.03
10	3	4.6	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 16.59

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 14-** Presença de fibrose ou cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DQB1.

DQB1	Pac. com fibrose		Pac. com Cirrose		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	(F1, F2, F3)		Hepática (CH)					
	(n=65)		(n=10)					
N	%	N	%					
02	34	52.3	6	60	0.7423 <sup>F</sup>	N.S.	1.37	0.3 – 6.48
03	34	52.3	6	60	0.7423 <sup>F</sup>	N.S.	1.37	0.3 – 6.48
04	5	7.7	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 8.42
05	24	37	3	30	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.73	0.13 – 3.6
06	23	35.4	4	40	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	1.22	0.25 – 5.61

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

Comparamos, nas **tabelas 15 e 16**, pacientes com cirrose hepática (n=10) e pacientes sem cirrose hepática (n=73) e fizemos a correlação com os alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1. Como se nota na **tabela 15**, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na frequência do alelo DRB1\*04. Após a correção do valor de “p” esta diferença estatística desapareceu ( $p > 0,05$ ). Com relação aos alelos HLA-DQB1 observa-se, na **tabela 16**, que não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos.

**Tabela 15-** Presença ou ausência de cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DRB1.

DRB1	Pac. sem Cirrose		Pac. com Cirrose		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	Hepática (CH)		Hepática (CH)					
	(n=73)		(n=10)					
N	%	N	%					
01	10	13.7	3	30	0.1865 <sup>F</sup>	N.S.	2.7	0.46 – 14.77
15	11	15.1	2	20	0.6524 <sup>F</sup>	N.S.	1.41	0.1 – 8.85
16	7	9.6	0	0	0.5899 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 6.19
03	19	26	1	10	0.4381 <sup>F</sup>	N.S.	0.32	0.01 – 2.76
04	15	20.5	5	50	<b>0.0411<sup>F</sup></b>	0.5343	3.87	0.83 – 18.35
11	20	27.4	3	30	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	1.14	0.21 – 5.62
12	1	1.4	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 138.59
13	16	21.9	2	20	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.71	0.1 – 4.06
14	1	1.4	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 138.59
07	24	32.9	4	40	0.7266 <sup>F</sup>	N.S.	1.36	0.29 – 6.2
08	6	8.2	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 7.53
09	3	4.1	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 18.68
10	3	4.1	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 18.68

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 16-** Presença ou ausência de cirrose em pacientes com infecção pelo vírus C de acordo com os alelos HLA-DQB1.

DQB1	Pac. sem Cirrose		Pac. com Cirrose		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	Hepática (CH)		Hepática (CH)					
	(n=73)		(n=10)					
N	%	N	%					
02	34	52.3	6	60	0.7429 <sup>F</sup>	N.S.	1.38	0.31 – 6.46
03	34	52.3	6	60	0.7429 <sup>F</sup>	N.S.	1.38	0.31 – 6.46
04	5	7.7	0	0	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.0	0 – 9.52
05	24	37.0	3	30	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.82	0.15 – 4
06	23	35.4	4	40	0.7339 <sup>F</sup>	N.S.	1.28	0.27 – 5.82

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

As **tabelas 17 e 18** mostram, respectivamente, as freqüências dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 em pacientes que apresentaram RVS e nos pacientes sem RVS infectados com genótipo 1. O genótipo 1 estava presente em 19 pacientes que responderam à terapia antiviral e em 27 pacientes sem RVS.

Como se nota, entre os pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC, não houve diferença estatisticamente significante nas respostas virológicas obtidas, de acordo com os alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 ( $p>0,05$ ).

**Tabela 17-** Freqüência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 1.

GENÓTIPO 1								
DRB1	Pac. com RVS (n=19)		Pac. sem RVS (n=27)		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	N	%	N	%				
01	4	21.1	4	14.8	0.5826	N.S.	0.65	0.18 – 1.38
15	4	21.1	3	11.1	0.3553	N.S.	0.47	0.33 – 2.87
16	2	10.5	3	11.1	0.9499	N.S.	1.06	0.7 – 19.79
03	3	15.8	8	29.6	0.2785	N.S.	2.25	0.73 – 4.19
04	3	15.8	7	25.9	0.4118	N.S.	1.87	0.79 – 4.92
11	4	21.1	3	11.1	0.3553	N.S.	0.47	0.42 – 2.28
12	0	0	0	0	--	--	--	--
13	8	42.1	7	25.9	0.2490	N.S.	0.48	0.95 – 5.91
14	1	5.3	0	0	0.4130 <sup>F</sup>	N.S.	0.0	0.01 – 1.92
07	6	31.5	10	37.03	0.7019	N.S.	1.27	1.49 – 9.43
08	0	0	3	11.1	0.2565 <sup>F</sup>	N.S.	--	--
09	0	0	2	7.4	0.5043 <sup>F</sup>	--	--	--
10	0	0	0	0	--	--	--	--

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 18-** Frequência dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 1.

GENÓTIPO 1								
DQB1	Pac. com RVS		Pac. sem RVS		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	(n=19)		(n=27)					
	N	%	N	%				
02	8	42.1	18	66.6	0.0980	N.S.	2.75	0.70 – 11.17
03	8	42.1	12	44.4	0.8747	N.S.	1.1	0.29 – 4.25
04	0	0	2	7.4	0.5043 <sup>F</sup>	N.S.	--	--
05	7	36.8	7	25.9	0.4282	N.S.	0.6	0.14 – 2.54
06	11	57.9	10	37	0.1619	N.S.	0.43	0.11 – 1.66

N.S.=Não Significativo. \*<sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

São mostradas nas **tabelas 19 e 20**, respectivamente, as frequências dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 em pacientes que responderam ou não-responderam ao tratamento antiviral que apresentaram infecção pelo genótipo 3 do VHC.

O genótipo 3 foi encontrado em 52 pacientes sendo que, 29 pacientes responderam ao tratamento (RVS) e 23 pacientes foram não-respondedores ao tratamento (sem RVS). Com relação à **tabela 19** que mostra a frequência dos alelos HLA-DRB1 observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o tipo de resposta virológica observada com os alelos presentes ( $p > 0,05$ ).

Na **tabela 20**, onde estão os resultados das frequências dos alelos HLA-DQB1, nota-se que há diferença estatisticamente significativa na resposta virológica com os alelos HLA-DQB1\*03 e HLA-DQB1\*06 ( $p < 0,05$ ) nos pacientes sem RVS quando comparados com os pacientes com RVS. Após a correção do valor de “p” verifica-se que as diferenças estatisticamente significantes desaparecem ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 19-** Frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 3.

GENÓTIPO 3								
DRB1	Pac. com RVS		Pac. sem RVS		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	(n=29)		(n=23)					
	N	%	N	%				
01	5	17.2	3	13	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.72	0.12 – 4.12
15	3	10.3	4	17.3	0.6855 <sup>F</sup>	N.S.	1.82	0.29 – 11.96
16	3	10.3	1	4.3	0.6205 <sup>F</sup>	N.S.	0.39	0.01 – 4.82
03	7	24.1	5	21.7	0.8384	N.S.	0.87	0.2 – 3.82
04	6	20.7	6	26.1	0.6463	N.S.	1.35	0.31 – 5.91
11	8	25.6	10	43.5	0.2315	N.S.	2.02	0.55 – 7.58
12	0	0	0	0	--	--	--	--
13	5	17.2	6	26.1	0.5065 <sup>F</sup>	N.S.	1.69	0.37 – 7.87
14	3	10.3	1	4.3	0.6205 <sup>F</sup>	N.S.	0.39	0.01 – 4.82
07	9	31	6	26.1	0.6957	N.S.	0.78	0.2 – 3.1
08	4	13.8	0	0	0.1204 <sup>F</sup>	N.S.	0	0 – 1.89
09	0	0	1	4.3	0.4423 <sup>F</sup>	N.S.	--	--
10	2	6.9	1	4.3	1.0000 <sup>F</sup>	N.S.	0.61	0.02 – 9.59

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

**Tabela 20-** Frequência dos alelos HLA-DQB1 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS infectados com genótipo 3.

GENÓTIPO 3								
DQB1	Pac. com RVS		Pac. sem RVS		p-valor	p-valor corrigido	OR	IC 95% OR
	(n=29)		(n=23)					
	N	%	N	%				
02	15	51.7	10	43.5	0.5544	N.S.	0.72	0.21 – 2.48
03	13	44.8	17	73.9	<b>0.0349</b>	0.1745	3.49	0.93 – 13.64
04	4	13.8	0	0	0.1204 <sup>F</sup>	N.S.	0.0	0 – 1.89
05	14	48.3	7	30.4	0.1928	N.S.	0.47	0.13 – 1.70
06	5	17.2	11	47.8	<b>0.0176</b>	0.0880	4.40	1.07 – 19.09

N.S.=Não Significativo. <sup>F</sup> Teste Exato de Fisher.

## *5- DISCUSSÃO*

A hepatite pelo vírus C (HVC) é reconhecida como uma das maiores causas de doença crônica do fígado no mundo. Aproximadamente 20% dos pacientes infectados eliminam o vírus C espontaneamente enquanto a grande maioria desenvolve infecção crônica de gravidade variável. A maioria dos pacientes permanece assintomática durante a evolução da infecção e mesmo quando há desenvolvimento de cirrose ou carcinoma hepatocelular (ALTER *et al.*, 1992, KIYOSAWA *et al.*, 1990, TSUKUMA *et al.*, 1993, VAN DER POEL *et al.*, 1994). Há evidências circunstanciais que mostram que mecanismos imunes têm uma importante contribuição para controlar a infecção pelo VHC (BOTARELLI *et al.*, 1993, FERRARI *et al.*, 1994).

O IFN alfa é o principal antiviral utilizado no tratamento de pacientes com HVC aguda e crônica. A monoterapia com IFN, por 48 semanas, é capaz de produzir uma RVS que varia de 6-20% (POYNARD *et al.*, 1998, McHUTCHISON *et al.*, 1998) enquanto que a terapia combinada de IFN mais ribavirina, por 48 semanas, pode produzir RVS em 39% dos pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC e em 65% dos infectados pelo genótipo 3 (McHUTCHISON & POYNARD, 1999, POYNARD *et al.*, 1998, McHUTCHISON *et al.*, 1998, FRIED *et al.*, 2002).

Existem características pessoais, tais como sexo, idade, raça, massa corpórea ou a presença de determinados alelos em genes polimórficos que se relacionaram com a resposta ao tratamento, embora os fatores dependentes do hospedeiro tenham menor peso que os fatores virais na hora de determinar a resposta à terapia antiviral na infecção pelo VHC (CIVEIRA & PRIETO, 2003, GONÇALES JR. *et al.*, 2004).

O interesse pelo estudo do Sistema HLA com hepatite crônica pelo vírus C prende-se ao fato do mesmo ser o sistema mais polimórfico descrito no homem e da observação de que numerosas doenças, por exemplo, artrite reumatóide juvenil e diabetes melitus insulina dependente, apresentarem associação com os antígenos HLA (COLOMBANI, 1992). A melhor ilustração é a conhecida associação entre o antígeno HLA-B27 e a espondilite anquilosante, que, descoberta em 1973, representou um marco histórico no estudo de genes de suscetibilidade a doenças e Sistema HLA (SCHLOSSTEIN *et al.*, 1973, BREWERTON, *et al.*, 1973). Devido à escassez de trabalhos relacionando o

Sistema HLA e a HVC procuramos estudar os alelos HLA classe II (loci DRB1 e DQB1), para verificarmos se existe alguma associação estatisticamente significativa.

Como pudemos observar neste estudo os 102 pacientes infectados cronicamente pelo VHC que responderam ou não ao tratamento com IFN ou IFN peguilado associado ou não à ribavirina apresentaram características semelhantes. Assim, a média da faixa etária nos dois grupos, bem como a distribuição por sexo foram similares. Em relação aos fatores de risco, 24,5% (25/102) dos pacientes relataram serem usuários de droga endovenosa enquanto que em 43,1% (44/102) dos pacientes não foi possível a identificação de um fator de risco (tabela 1). Como se sabe, a HVC é transmitida preferencialmente por via endovenosa em nossa região (GONÇALES *et al.*, 2000). Sabe-se também que cerca de 53% dos pacientes com hepatite C não referem comportamento de risco para a aquisição da infecção pelo VHC (GONÇALES *et al.*, 2000). Com isto consideramos ser a nossa casuística representativa do ponto de vista epidemiológico de nossa região.

Avaliamos, a seguir, a frequência dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 em pacientes que apresentaram RVS e aqueles sem RVS em relação aos genótipos encontrados. Em relação aos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 e genótipo 1 do VHC, em pacientes com RVS e pacientes sem RVS não encontramos nenhuma relação estatisticamente significativa (tabelas 17 e 18). Também não foi observada nenhuma relação estatisticamente significativa quando comparamos o tipo de resposta virológica em pacientes infectados pelo genótipo 3 do VHC e os alelos HLA-DRB1 (tabela 19). Porém, os alelos HLA-DQB1\*03 e HLA-DQB1\*06 apareceram em frequências estatisticamente significativa nos pacientes sem resposta virológica que apresentavam o genótipo 3 do VHC quando comparadas com às frequências destes alelos nos pacientes que responderam ao tratamento (tabela 20).

Avaliamos e não encontramos correlação entre a presença dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 com a presença e intensidade da fibrose hepática nos pacientes estudados (n=83) (tabelas 11 e 12). No entanto, quando estudamos a frequência dos alelos HLA-DRB1 e HLA-DQB1 em pacientes com diferentes graus de fibrose (n=75) e cirrose hepática encontramos uma diferença estatisticamente significativa em relação ao alelo HLA-DRB1\*04 e os pacientes que apresentaram cirrose hepática (tabela 13). Em relação

aos alelos HLA-DQB1 nada foi encontrado (tabela 14). Em um estudo realizado na França por HÜE e colaboradores observou-se que a frequência dos alelos HLA-DRB1\*03 e HLA-DQB1\*0201 foi maior nos pacientes franceses com cirrose hepática enquanto que nesses mesmos pacientes a presença do alelo HLA-DRB1\*11 foi reduzida. O alelo HLA-DRB1\*11 foi um fator protetor contra o curso da doença grave na infecção crônica pelo VHC nestes pacientes (HÜE *et al.*, 2002).

YOSHIZAWA e colaboradores, num estudo com pacientes japoneses, encontraram uma maior frequência dos alelos HLA-DRB1\*12 e HLA-DQB1\*0301 nos pacientes com infecção pelo VHC, porém assintomáticos, quando comparados com os pacientes com cirrose hepática (fator protetor) enquanto que a frequência do alelo HLA-DQB1\*0503 foi maior nos pacientes com cirrose hepática quando comparada com a observada nos pacientes assintomáticos (YOSHIZAWA *et al.*, 2003).

BARRETT e colaboradores não encontraram nenhuma correlação estatisticamente significativa entre doença grave do fígado e a frequência dos alelos HLA-DRB1 em pacientes irlandesas (BARRETT *et al.*, 1999).

Quando estudamos a frequência dos alelos HLA classe II (DRB1 e DQB1) nos 102 pacientes com infecção crônica pelo VHC (tabelas 2 e 3), observamos uma diferença estatisticamente significativa em relação aos alelos HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*13 e HLA-DQB1\*02 quando comparados com o grupo controle. Porém, quando fizemos a correção do valor de “p” somente o alelo HLA-DRB1\*07 permaneceu com frequência estatisticamente significativa.

VEJBAESYA e colaboradores encontraram em seus estudos, com pacientes da Tailândia, uma frequência diminuída dos alelos HLA-DRB1\*0701 e HLA-DQA1\*0201 em todos os pacientes infectados pelo VHC quando comparados com o grupo controle e concluiu-se que estes alelos se relacionariam com a proteção contra a HVC (VEJBAESYA *et al.*, 2000). Isto foi diferente do nosso estudo que mostrou uma frequência estatisticamente maior do alelo HLA-DRB1\*07 em todos os pacientes cronicamente infectados pelo VHC.

FANNING e colaboradores encontraram em seus estudos, com pacientes irlandesas, que apresentaram infecção persistente pelo VHC uma frequência maior do alelo HLA-DRB1\*0701 e uma ausência do alelo HLA-DQB1\*0501 (FANNING *et al.*, 2000). Uma outra associação entre o alelo HLA-DQB1\*0401 e a infecção persistente do VHC foi observada na população japonesa por KUZUSHITA e colaboradores (KUZUSHITA *et al.*, 1998). Neste estudo de FANNING e colaboradores, o clearance viral foi relacionado com o alelo HLA-DRB1\*01, o mesmo encontrado por BARRETT e colaboradores que também estudaram pacientes irlandesas com o VHC de genótipo 1b. Esses pesquisadores associaram os alelos HLA-DRB1\*0101 e HLA-DQB1\*0501 com o clearance viral (BARRETT *et al.*, 1999). No entanto, o clearance viral em diferentes populações européias foi associado com os alelos HLA-DRB1\*11 e HLA-DQB1\*0301 por outros autores (ALRIC *et al.*, 1997, MINTON *et al.*, 1998, THURSZ *et al.*, 1999, MANGIA *et al.*, 1999, CRAMP *et al.*, 1998).

No nosso estudo, os pacientes com infecção crônica pelo VHC foram tratados com diferentes formulações de IFN isolados ou combinados com ribavirina sendo classificados como respondedores ou não-respondedores ao tratamento. Observamos uma diferença estatisticamente significativa em relação ao alelo HLA-DRB1\*07 em pacientes com RVS e em pacientes sem RVS (tabelas 4 e 6). O alelo HLA-DRB1\*13 apareceu em uma frequência estatisticamente significante nos pacientes não-respondedores ao tratamento antes da correção de Bonferroni (tabela 6). O alelo HLA-DQB1\*02 apareceu em uma frequência estatisticamente significante nos pacientes não-respondedores ao tratamento mesmo após a correção de Bonferroni (tabela 7). Estas frequências significativas foram observadas ao compararmos pacientes respondedores e não-respondedores ao tratamento com o grupo controle.

Quando comparamos entre si pacientes com RVS e pacientes sem RVS não encontramos diferença estatisticamente significante destes, com os alelos DRB1 e DQB1 (tabelas 8 e 9). Por outro lado, ALRIC e colaboradores encontraram em seus estudos, em pacientes franceses, uma frequência estatisticamente significante do alelo HLA-DRB1\*07 em pacientes não-respondedores ao tratamento quando comparados com os pacientes respondedores ao tratamento, mas esta frequência não permaneceu significativa depois da correção de Bonferroni (ALRIC *et al.*, 1999).

SIM e colaboradores estudando resposta à terapia com IFN em pacientes canadenses encontraram o alelo HLA-DRB1\*0404 em uma frequência estatisticamente significativa nos pacientes com RVS quando comparados com os pacientes sem RVS (SIM *et al.*, 1998).

Estudando pacientes com infecção crônica pelo VHC e resposta ao tratamento com IFN-alfa na Polônia, WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA e colaboradores encontraram uma frequência reduzida do alelo HLA-DQB1\*0301 nos pacientes cronicamente infectados concluindo, assim, que este alelo é um fator protetor na aquisição do VHC. Neste estudo, o haplótipo HLA-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*02 se associou à infecção crônica pelo VHC e uma maior resposta ao tratamento com IFN-alfa (WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, os alelos HLA-DRB1\*07 e HLA-DQB1\*02 apareceram com uma frequência estatisticamente significativa nos pacientes que não-responderam ao tratamento, levando a acreditar que suas presenças, de alguma forma, podem indicar uma menor possibilidade de resposta.

Com este estudo esperamos ter contribuído para um melhor entendimento da participação do Sistema HLA na aquisição, na evolução e na resposta terapêutica dos pacientes com hepatite C crônica.

## ***6- CONCLUSÃO***

Este estudo permitiu concluir:

- 1- Encontramos uma frequência 2,7 vezes maior do alelo HLA-DRB1\*07 nos indivíduos infectados pelo VHC quando comparados com a população controle e uma maior frequência dos alelos HLA-DRB1\*13 e HLA-DQB1\*02 nos infectados pelo VHC quando comparada à frequência observada nos grupos controles;
- 2- Observamos uma maior frequência do alelo HLA-DRB1\*07 nos pacientes com RVS quando comparada à frequência observada no grupo controle;
- 3- Observamos uma maior frequência entre a presença dos alelos HLA-DRB1\*07, HLA-DRB1\*13 e HLA-DQB1\*02 nos pacientes sem RVS quando comparada à frequência observada nos grupos controles;
- 4- Nos pacientes com cirrose hepática, observamos uma maior frequência do alelo HLA-DRB1\*04 ao contrário do observado em relação aos alelos HLA-DQB1 que estiveram presentes em igual frequência nos cirróticos e não-cirróticos;
- 5- Nos pacientes com hepatite C crônica, infectados pelo genótipo 3, tratados com IFN houve associação entre a presença dos alelos HLA-DQB1\*03 e HLA-DQB1\*06 e menor porcentual de resposta virológica sustentada;

***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. – Complexo de Histocompatibilidade Principal. In: ABBAS, LICHTMAN, POBER. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Ed. Revinter, 1995, p.101-118.

ALBERT, E.D.; BAUR, M.P.; MAYR, W.R. – **Histocompatibility Testing** 1984. Springer-Verlag, 1984, 764 p.

ALRIC, L.; FORT, M.; IZOPET, J.; VINEL, J-P.; BUREAU, C.; SANDRE, K. et al. – Study of host- and virus-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. **Tissue Antigens**, 56: 151-158, 2000.

ALRIC, L.; IZOPET, J.; FORT, M.; VINEL, J-P.; FONTENELLE, P.; ORFILA, C. et al. – Study of the association between major histocompatibility complex class II genes and the response to interferon alpha in patients with chronic hepatitis C infection. **Human Immunology**, 60: 516-523, 1999.

ALRIC, L.; FORT, M.; IZOPET, J.; VINEL, J-P.; CHARLET, J-P.; SELVES, J. et al. Genes of the major histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, 113: 1675-1681, 1997.

ALTER, H.J. – To C or not to C: these are the questions. **Blood**, 85: 1681-1695, 1995.

ALTER, H.J.; SEEF, L.B. Transfusion-associated hepatitis. In: ZUCKERMAN, A. J. and THOMAS. H.C. **Viral Hepatitis**, 2<sup>nd</sup> Edition, London: CHURCHILL LIVINGSTONE, 1998. p.489-513.

ALTER, M.J.; MARGOLIS, H.S.; KRAWEZYNSKI, K.; JUDSON, F.N.; MARES, A.; ALEXANDER, W.J. et al. – The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. **New Engl. J. Med.**, 327: 1899-1905, 1992.

ANDRADE, D.R.; ANDRADE JR.; D.H. – Interações Imunológicas e Genéticas. Imunidade. HLA. Hepatite Crônica e o Genoma Humano. In: FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.425-441.

BARRETT, S.; RYAN, E.; CROWE, J. – Association of the HLA-DRB1\*01 allele with spontaneous viral clearance in an Irish cohort infected with hepatitis C virus via contaminated anti-D immunoglobulin. **Journal of Hepatology**, 30: 979-983, 1999.

BOTARELLI, P.; BRUNETTO, M.R.; MINUTELLO, M.A.; CALVO, P.; UNUTMAZ, D.; WEINER, A.J. et al. – T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. **Gastroenterology**, 104: 580-587, 1993.

BRADLEY, D.W.; MAYNARD, J.E. – Etiology and natural history of post-transfusional enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. **Semin. Liver dis.**, 6: 56-66, 1986.

BREWERTON, D.A.; CAFFREY, M.; HART, F.D.; JAMES, D.C.O.; NICHOLLS, A.; STURROCK, R.D. – Ankylosing Spondylitis and HLA-B27. **Lancet**, 1: 904-907, 1973.

BUKH, J.; PURCELL, R.H.; MILLER, R.H. – At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90: 8234-8238, 1993.

CHARMAN, L.G. – Genetic diversity of hepatitis C virus: implications for pathogenesis, treatment and prevention. **Lancet**, 345: 562-566, 1995.

CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; BRADLEY, D.W.; HOUGHTON, M. – Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, 244: 359-362, 1989.

CHOO, Q.L.; RICHMAN, K.H.; HAN, J.H.; BERGER, K.; LEE, C.; DONG, C. et al. Genetic organization and diversity of hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 88(6): 2451-2455, 1991.

CHOO, Q.L.; WEINER, A.J.; OVERBY, L.R.; KUO, G.; HOUGHTON, M.; BRADLEY, D.W. – Hepatitis C virus: The major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. **Br. Med. Bull.**, 46: 423-441, 1990.

CIVEIRA, M.P.; PRIETO, J. – Tratamento da Hepatite C – Fatores preditores de resposta. In FOCACCIA, R. **Tratado de Hepatites Virais**. São Paulo: Atheneu, 2003. p.588-592.

COLOMBANI, J. Évolution du CMPI, des gènes et des allèles. La superfamille des immunoglobulines. Génétique des populations. In **HLA**, 1992: 91-110b.

COLOMBANI, J. HLA class II, chaîne invariante (Ii), gènes et produits, structure et séquences. In **HLA**, 1992: 63-68a.

CONRY-CANTILENA, C.; VANRADEN, M.; GIBBLE, J.; MELPOLDER, J.; SHAKIL, A.O.; VILADOMIU, L. et al. – Routes of infection, viraemia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C infection. **New Engl. J. Med.**, 334(26): 1691-1696, 1996.

CRAMP, M.E.; CARUCCI, P.; UNDERHILL, J.; NAOUMOV, N.V.; WILLIAMS, R.; DONALDSON, P.T. – Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. **J. Hepatology**, 29: 207-213, 1998.

DESMET, V.J.; GERBER, M.; HOOFNAGLE, J.H.; MANNS, M.; SCHEUER, P. J. – Classification of chronic hepatitis diagnosis, grading and staging. **Hepatology**, 19: 1513-1520, 1994.

DI BISCEGLIE, A.M. – Foreword: Advances in treatment of chronic hepatitis C. **Sem. Liver Dis.**, 19(10): 1-2, 1999.

DI BISCEGLIE, A.M. – Optimal therapy of hepatitis C. In: NIH Consensus Development Conference, Bethesda, 2002, p67-69

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. **J. Hepatology**, 30:956-961, 1999.

ESTEBAN, J.I.; ESTEBAN, R.; VILADOMIU, L.; LOPEZ-TALAVERA, J.C.; GONZALES, -A.; HERNANDEZ, J.M. et al. – Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. **Lancet**, 2: 294-297, 1989.

FANNING, L.J.; LEVIS, J.; KENNY-WALSH, E.; WYNNW, F.; WHELTON, M.; SHANAHAN, F. – Viral clearance in hepatitis C (Ib) infection: Relationship with Human Leucocyte Antigen Class II in a homogeneous population. **Hepatology**, 31 (6): 1334-1337, 2000.

FERRARI, C.; VALLI, A.; GALATI, L.; PENNA, A.; SCACAGLIA, P.; GIUBERTI, T. et al. – T cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigen in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. **Hepatology**, 19: 286-295, 1994.

FLEISS, J.L. (1981), Statistical Methods for Rates and Proportions. New York: John Wiley & Sons, 2<sup>nd</sup> ed.

FRIED, M.W.; SHIFFMAN, M.L.; REDDY, R.K.; SMITH, C.; MARINO, G.; GONÇALES Jr, F.L. et al. – Pegylated (40kDa) interferon Alfa-2a (PEGASIS<sup>®</sup>) in combination with ribavirin: Efficacy and safety results from phase iii randomized, actively-controlled, multicenter study. **Gastroenterology**, 120:228, 2001.

FRIED, M.W.; SHIFFMAN, M.D.; REDDY, R.; SMITH, C.; MARINOS, G.; GONÇALES JR., F.L. et al. – Peginterferon Alfa-2a Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection. **New Engl. J. Med.**, 347: 975-982, 2002.

GARSON, J.A.; RING, C.; TUKE, P.; TEDDER, R.S. – Enhanced detection by PCR of hepatitis C virus RNA. **Lancet**, 336(8719): 878-879, 1990.

GAYOTTO, L.C.C.; Comitê SBP/SBH. - Visão histórica e consenso Nacional sobre classificação das hepatites crônicas. **GED.**, 19(3):137-140, 2000.

GONÇALES JR, F.L.; STUCCHI, R.S.B.; PAVAN, M.H.P.; ESCANHOELA, C.A.F.; YAMANAKA, A.; MAGNA, L.A.; GONÇALES, N.S.L. – A clinical, epidemiological, laboratorial, histological and ultrasonographical evaluation of anti-HCV EIA-2 positive blood donors. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. 42(3): 147-152, 2000.

GONÇALES JR, F.L.; BOCCATTO, R.S.B.S.; PEDRO, R.J.; PAPAORDANOU, P.M.O; SOUZA, C.A; GONÇALES, N.S.L.; PELLEGRINO Jr, J. – Prevalências do HBsAg do anti-HBc e do anti-HCV na população dos candidatos a doadores de sangue do Hemocentro-Campinas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 35(1): 45-51, 1993.

GONÇALES JR., F.L.; GONZALES, A.; GONÇALES, N.S.L.; COELHO, H.; PAIXÃO, J.; ROSA, H.; BORGES, A.; BARONE, A.A.; ARAÚJO, E.; FOCACCIA, R.; OLIVEIRA, U.; FERRAZ, M.L.; PEREZ, R.; LOBATO, C.; WEIRICH, J.; VILA, R.; GIANELLA, M.L. – Sustained virological response in naïve Brazilian HCV patients treated with peginterferon alpha-2b plus ribavirina. Biennial Scientific Meeting of the International Association for the Study of the Liver/18<sup>th</sup> Meeting of the Latin American Association for the Study of the Liver. Bahia, Brasil. *Liver International*, vol. 24, Suppl. 4, p.67, 2004.

HOOFNAGLE, J.H. – Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. **Hepatology**, 26 (suppl. 1): 15S-20S, 1997.

HORS, J. – HLA et maladies. In: Dausset, J e Pla, M. (ed), HLA complexe majeur d'histocompatibilité de l'homme, Flammarion Médecine-Sciences, Paris, 1985, pp. 227-256.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S.L. (1989), *Applied Logistic Regression*. New York: John Wiley & Sons.

HOWELL, C.; JEFFERS, L.; HOFFNAGLE, J.H. – Hepatitis C in African Americans: summary of a workshop. **Gastroenterology**, 119 (5): 1385-1396, 2000.

HU, K.Q.; VIERLING, J.M.; REDEKER, A.G. – Viral, host and Interferon related factors modulating the effect of Interferon therapy for hepatitis C virus infection. **J. Viral Hepatitis**, 8: 1-18, 2001.

HÜE, S.; CACOUB, P.; RENOUE, C.; HALFON, P.; THIBAUT, V.; CHARLOTTE, F. et al. – Human leucocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease. **The Journal of Infection Diseases**, 186: 106-109, 2002.

KAITO, M.; WATANABE, S.; TSUKIYAMA KOHARA, K.; YAMAGUCHI, K.; KOBAYASHI, Y.; KONISHI, M. et al. – Hepatitis C virus particle detected immunoelectron microscopic study. **J Gen Virol.**, 75: 1755-1760, 1994.

KATO, N.; HIJIKATA, M.; OOTSUYAMA, Y.; NAKAGAWA, M.; OHKOSHI, S.; SIGIMURA, T.; SHIMOTOHNO, K. – Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 9524-9528, 1990.

KIYOSAWA, K.; SODEMAYA, T.; TANAKA, E.; GIBO, Y.; YOSHIKAWA, K.; NAKANO, Y.; FURUTA, S. et al. – Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis C and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. **Hepatology**, 14: 381-388, 1990.

KUO, G.; CHOO, Q. L.; ALTER, H.J.; GITNICK, G.L.; REDEKER, A.G.; PURCELL, R.H. et al. – An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, 224: 352-364, 1989.

KUZUSHITA, N.; HAYASHI, N.; MORIBE, T.; KATAYAMA, K.; KANTO, T.; NAKATANI, S. et al. – Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. **Hepatology**, 27: 240-244, 1998.

LINDSAY, K.L – Introduction to therapy of hepatitis C. In NIH Consensus Development Conference. Bethesda, Maryland, 2002, p 61-66.

MANGIA, A.; GENTILE, R.; CASCAVILLA, I.; MARGAGLIONE, M.; VILLANI, M.R.; STELLA, F. et al. – HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. **J. Hepatology**, 30: 984-989, 1999.

MANNING, M.P.; McHUTCHISON, J.G.; GORDON, S.C.; RUSTGI, V.K.; SHIFFMAN, M.; REINDOLLAR, R. AND THE INTERNATIONAL HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUPS et al. – Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. **Lancet**, 358: 958-963, 2001.

MATTIUZ, P. L.; IHDE, D.; PIAZZA, A.; CEPPELLINI, R.; BODMER, W.F. – New approaches to the analysis of the HLA-system. **Histocompatibility Testing**, Munksgaard, Copenhagen, 1970, pp. 192-205.

McALLISTER, J.; CASINO, C.; DAVIDSON, F.; POWER, J.; LAWLOR, E.; YAP, P.L. et al. – Long term evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus in a common-source infected cohort. **Journal of Virology**, 72(6): 4893-4905, 1998.

McHUTCHISON, J.G.; GORDON, S.C.; SCHIFF, E.R; SHIFFMAN, M.L.; LEE, W.M.; RUSTGI, V.K. et al. – Interferon alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. **New Engl. J. Med**; 339: 1485-1492, 1998.

McHUTCHISON, J.G.; POYNARD, T. – Combination therapy with interferon plus ribavirin for the initial treatment of chronic hepatitis C. **Sem. Liver Dis.**, 19(1): 57-65, 1999.

McHUTCHISON, J.G.; POYNARD, T.; ESTEBAN-MUR, R.; DAVIS, G.L.; GOODMAN, Z.D.; HARVEY, J.; LING, M-H. et al. FOR THE INTERVENTIONAL HEPATITIS INTERVENTIONAL THERAPY GROUPS. Hepatic HCV RNA before and after treatment with interferon alone or combined with ribavirin. **Hepatology**, 35: 688-693, 2002.

McHUTCHISON, J.G.; POYNARD, T.; PIANKO, S.; GORDON, S.C.; REID, A.E.; DIENSTAG, J. et al. – The impact of interferon plus ribavirin on response to therapy in black patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, 119(5): 1317-1323, 2000.

McOMISH, F.; YAP, P.L.; DOW, B.C.; FOLLETT, E.A.; SEED, C.; KELLER, A.J. et al. – Geographical distribution of hepatitis C genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J. Clin. Microbiol.**, 32(4): 884-892, 1994.

MINTON, E.J.; SMILLIE, D.; NEAL, K.R.; IRVING, W.L.; UNDERWOOD, J.C.; JAMES, V. – Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Group. **Journal of Infection Disease**, 178: 39-44, 1998.

MONDELI, M.U.; SILINI, E. – Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **J. Hepatol.**, 31: 65-70, 1999.

NEPOM, B.S.; NEPOM, G.T. – Polyglot and Polymorphism. An HLA update. **Arthritis & Rheumatism**, 38: 1715-1721, 1995.

OKAMOTO, H.; OKADA, S.; SUGIYAMA, Y.; TANAKA, T.; SUGAI, Y.; AKAHANE, Y. et al. – Detection of hepatitis C virus RNA by a two stage polymerase chain reaction with two pair of primers deduced from the 5'- noncoding region. **Jpn J. Exp. Med.**, 60(4): 215-222; 1990.

POYNARD, T.; MARCELLIN, P.; LEE, S.S.; NIEDERAU, C.; MINUK, G.S.; IDEO, G. et al. – Randomized trial of interferon alpha 2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha 2b placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection hepatitis C virus. **Lancet**, 352: 1426-1432, 1998.

PRIETO, M.; OLASO, V.; VERDU, C.; CORDOBA, S.; GISBERT, C.; RAYON, M. et al. – Does the healthy hepatitis C virus carrier state really exist? An analysis using polymerase chain reaction. **Hepatology**, 22(2): 413-417, 1995.

PRINCE, A.M.; BROTMAN, B.; INCHAUSPE, G.; PASCUAL, D.; NASOFF, M.; HOSEIN, B.; WANG, C.Y. – Patterns and prevalence hepatitis C virus infection in post transfusions non-A, non-B hepatitis. **J. Infect. Disease**, 167: 1296-1301, 1993.

REDDY, K.R.; HOOFNAGLE, J.H.; TONG, M.J., LEE, W.M.; POCKROS, P.; HEATHCOTE, E.J. et al. – Racial differences in responses to therapy with interferon in chronic hepatitis C. **Hepatology**, 30(3): 787-793, 1999.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. – Major Histocompatibility Complex. In. **Immunology**, Gower Medical Publishing, Middlesex-House, London-New York, 1989.p

ROSEN, H.R.; GRETCH, D.R. – Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Molecular Medicine Today**, 5: 393-399, 1999.

SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P.I.; BLUESTOWE, R.; PEARSOW, G.M. – High association of an HLA antigen, W27, with Ankylosing Spondylitis. **New Engl. J. Med.**, 288: 704-706, 1973.

SERFATY, L.; NOUSBAUN, J.B.; ELGHOZZI, M.H.; GIRAL, P.; LEGENDRE, C.; POUPON, R. – Prevalence, severity and risk factors of liver disease in blood donors positive in a second-generation anti-hepatitis C virus screening test. **Hepatology**, 21(3): 725-729, 1995.

SHAKIL, A.O.; CONRY-CANTILENA, C.; ALTER, H.J.; HAYASHI, P.; KLEINER, D.E.; TEDESCHI, V. et al. – Volunteer blood donor with antibody to hepatitis C virus: clinical, biochemical, virologic and histologic features. **Ann. intern. Med.**, 123: 330-337, 1995.

SHUKLA, D.D., HOYNE, P.A., WARD, C.W. - Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. **Arch Virol.**, 140(10): 1747-1761, 1995.

SIM, H.; WOJCIK, J.; MARGULIES, M.; WADE, J.A.; HEATHCOTE, J. – Response to interferon therapy: influence of human leucocyte antigen alleles in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Viral Hepatitis**, 5: 249-253, 1998.

SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H.J. – A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**, 19: 1321-1324, 1994.

SIMMONDS, P.; McOMISH, F.; YAP, P.L.; CHAN, S.W.; LIN, C.K.; DUSHEIKO, G. et al. – Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restriction on sequence diversity. **J. Gen. Virol.**, 74: 661-668, 1993.

STRACHAN, T. – Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. **Br. Med. Bull.** 43: 1-14, 1987.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. – HLA and disease associations: detecting the strongest associations. **Tissue-Antigens**, 43: 18, 1994.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. – Disease associations. In: *Histocompatibility Techniques*, Kissmeyer-Nielsen, F. (ed.), pp. 185-205, 1979.

TABOR, E.; GERETY, R.S.; DRUCKER, J.A.; SEEFF, L.B.; HOOFNAGLE, J.H.; JACCKSON, D.R. et al. – Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzee. **Lancet**, 1: 463-466, 1978.

THORSBY, E.; RONNINGEN, K.S. – Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, 36: 371-377, 1993.

THURSZ, M.; YALLOP, R.; GOLDIN, R.; TREPO, C.; THOMAS, H.C. – Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The Hepatitis C European Network for Cooperative Research. **Lancet**, 354: 2119-2124, 1999.

TIWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. – Malignancy. In: Tiwari, J. L. & Terasaki, P. I. (ed.), Springer-Verlag, 1985, p. 472.

TROWSDALE, J. – Genetics and polymorphism: class II antigens. **Br. Med. Bull.**, 43: 15-36, 1987a.

TROWSDALE, J. – Still more genes in the MHC. **Immunol. Today** 8: 35-36, 1987b.

TSUKUMA, H.; HIYAMA, T.; TANAKA, S.; NAKAO, M.; YABUUCHI, T.; KITAMURA, T. et al. – Risk factors for hepatocellular carcinoma among patients with chronic liver diseases. **New Engl. J. Med.**, 328: 1797-1801, 1993.

VAN DER POEL, C.L.; CUYPERS, H.T.; REESINK, H.W. – Hepatitis C virus six years on. **Lancet**, 344: 1475-1479, 1994.

VEJBAESYA, S.; SONGSIVILAI, S.; TANWANDEE, T.; RACHAIBUN, S.; CHANTANGPOL, R.; DHARAKUL, T. – HLA association with hepatitis C virus infection. **Human Immunology**, 61: 348-353, 2000.

WAWRZYNOWICZ-SYEZEWSKA, M.; UNDERHILL, J.A.; CLARE, M.A.; BORONKAEZMARSKA, A.; McFARLANE, I.G.; DONALDSON, P.T. – HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to  $\alpha$ -interferon treatment in Poland. **Liver**, 20: 234-239, 2000.

YENIGÜN, A.; DURUPINAR, B. – Decreased frequency of the HLA-DRB1\*11 allele in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Virology**, 76: 1787-1789, 2002.

YOSHIZAWA, K.; OTA, M.; SAITO, S.; MARUYAMA, A.; YAMAURA, T.; ROKUHARA, A. et al. – Long-term follow-up of hepatitis C virus infection: HLA class II loci influences the natural history of the disease. **Tissue Antigens**, 61: 159-165, 2003.

ZEUZEM, M.S. – Treatment of chronic hepatitis C virus infection in patients with cirrhosis. **J. Viral Hepatitis**, 7: 327-334, 2001.

ZEUZEM, S.; FEINMAN, V.; RASENACK, J.; HEATHCOTE, E.J.; LAI, M.Y.; GANE, E. et al. – Peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. **New Engl. J. Med.**, 343: 1666-1672, 2000.

## *8- APÊNDICES*

Trabalhos apresentados em Congresso:

- 1- “Biennial Scientific Meeting of the International Association for the Study of the Liver”, Salvador – BA, Março de 2004.

“Distribution of the Major Histocompatibility Complex Class II Genes in Brazilian Patients with Chronic Hepatitis C Infection”. (autora)

- 2- “VII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea”, Belo Horizonte – MG, Outubro de 2003.

“Estudo dos Alelos HLA Classe II em Pacientes com Infecção Crônica pelo Vírus da Hepatite C (VHC)”. (autora)

- 3- “XIV Encontro Nacional de Virologia”, Florianópolis – SC, Setembro de 2003.

“Major Histocompatibility Complex Class II Alleles (HLA) in Chronic Hepatitis C Disease”. (autora)

- 4- “XIII Congresso Brasileiro de Infectologia”, Goiânia – GO, Setembro de 2003.

“Estudo da Correlação entre os Alelos HLA Classe II e Resposta ao Tratamento Antiviral em Pacientes com Hepatite Crônica pelo Vírus C (VHC)”. (autora)