



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DAS  
CITOCINAS TGF-  $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$  EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DA INFECÇÃO PELO  
VÍRUS DA HEPATITE C**

**FERNANDA DE ALBUQUERQUE PEREIRA**

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2005**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



**UFBA**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**FIOCRUZ**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

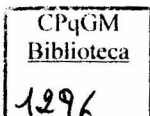
**ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DAS  
CITOCINAS TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 E TNF- $\alpha$  EM  
INDIVÍDUOS PORTADORES DA INFECÇÃO PELO VÍRUS  
DA HEPATITE C**

**FERNANDA DE ALBUQUERQUE PEREIRA**

**Orientador: MITERMAYER GALVÃO DOS REIS**

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia, área de concentração em Patologia Experimental.

Salvador - Bahia - Brasil  
2005



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Pereira, Fernanda de Albuquerque

P426e Estudo de polimorfismos nos genes das citocinas TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ ,  
IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em indivíduos portadores da infecção pelo  
vírus da hepatite C. \_ Salvador: Universidade Federal da Bahia,  
Faculdade de Medicina / Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz, 2005.  
112f. : ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade  
Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2005.

Orientador: Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Laboratório de  
Patologia e Biologia Molecular.

1. Hepatite C. 2. Genes. 3. Citocinas. 4. Polimorfismo. I. Título.

CDU 616.36-02:575.113

J D B S J

P-11  
000 1046  
001647

616.36-02:575.113  
P426e

ESTUDO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DAS CITOCINAS (TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, E TNF- $\alpha$ )  
EM INDIVÍDUOS PORTADORES DA INFECÇÃO CAUSADA PELO VÍRUS DA HEPATITE C

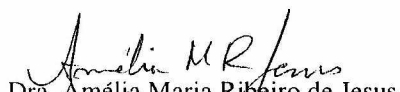
**FERNANDA DE ALBUQUERQUE PEREIRA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

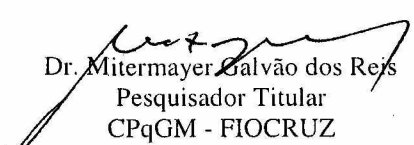
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Edecio Cunha Neto  
Professor  
INCOR-SP



Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus  
Pesquisadora Adjunta  
UFBA



Dr. Mitermayer Galvão dos Reis  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

*“Feliz daquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”*

*Cora Coralina*

## **Dedicatória**

Aos meus pais, pelo afeto e dedicação;

Ao meu irmão Fabio, pelo aconselhamento durante a execução deste trabalho;

Ao meu companheiro Hector, por todo amor, alegria e otimismo.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis pela orientação, amizade e incentivo.

Aos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C , razão deste trabalho.

A Dra. Denise Carneiro Lemaire pela generosidade em permitir a utilização dos resultados relativos ao grupo controle histórico.

Ao Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Patologia FAMED-UFBA/FIOCRUZ-BA, e demais professores por todo conhecimento transmitido durante nosso convívio.

À Rosália Oliveira, secretária do curso Pós-Graduação em Patologia, pela dedicação com a qual desempenha suas atividades e à bibliotecária Ana Maria Fiscina pelo auxílio na formatação final da dissertação.

À doutoranda Eliana Reis pelo apoio profissional, consultoria e amizade.

À bióloga Itatiana Rodart pela amizade e colaboração na realização deste trabalho.

À Mestre Theomira Carmo e mestrandas Gisele Lopes pela colaboração no diagnóstico molecular dos pacientes.

Ao estudante de Iniciação Científica Lúcio Barbosa pelo auxílio no processamento das amostras.

A Everaldo Santos da Purificação e Vanja Ferreira pela entrevista e coleta das amostras dos pacientes.

À Doutora Léa Castellucci pela disponibilidade e suporte no início do trabalho.

Ao Laboratório de Imunogenética do Instituto de Ciências da Saúde, local de desenvolvimento de parte do trabalho em especial à Maria Teresita Bendicho .

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela amizade, cumplicidade, e pelos momentos alegres compartilhados.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, pelo carinho e companheirismo.

A todos aqueles, que embora não citados, contribuíram de alguma forma para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	Introdução	18
2.	Revisão da Literatura	20
2.1.	O vírus da hepatite C (VHC)	20
2.2.	Papel de fatores do hospedeiro na resposta à infecção pelo vírus da hepatite C	23
2.2.1.	HLA	24
2.2.2.	Papel de outros genes não localizados no MHC	25
2.2.3.	Citocinas	26
2.3.	Polimorfismos em genes de citocinas	31
2.3.1	Fator de Transformação do Crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ )	36
2.3.2	Interferon gama (IFN- $\gamma$ )	40
2.3.3	Interleucina - 6 (IL-6)	43
2.3.4	Interleucina -10 (IL-10)	45
2.3.5	Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	50
3.	Hipótese	54
4.	Objetivos	55
5.	Materiais e métodos	56
5.1.	Seleção de pacientes	56
5.2.	Coleta de sangue	57
5.3.	Diagnóstico molecular do VHC	57
5.4.	Extração de DNA genômico	58
5.5.	Genotipagem de citocinas (TGF- $\beta 1$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ )	58
5.6.	Região amplificada	62
5.7.	Análise estatística	65



6.	Resultados	66
7.	Discussão	85
8.	Conclusões	97
9.	Perspectivas futuras	98
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXO	111

## Lista de Figuras e Gráficos

- Figura 1 - Fotografia de um gel de agarose 2,5% após eletroforese dos fragmentos de DNA amplificados por PCR. 61
- Figura 2 - Distribuição da frequência alélica do polimorfismo no gene *TGF-β1* (códon 25 G/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios. 71
- Figura 3 - Distribuição da frequência genotípica do polimorfismo no gene *TGF-β1* (códon 25 G/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios. 71
- Figura 4 - Distribuição da frequência dos fenótipos previstos do polimorfismo no gene *TGF-β1* (códon 10T/C e códon 25G/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios. 75

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características dos polimorfismos nos genes de citocinas.	64
Tabela 2 -	Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo no gene <i>TGF-β1</i> (códon 10 T/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios.	68
Tabela 3 -	Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo no gene <i>TGF-β1</i> (códon 25 G/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios.	70
Tabela 4 -	Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo no gene <i>TGF-β1</i> (códon 25 G/C) em pacientes infectados com diferentes genótipos do vírus da hepatite C.	72
Tabela 5 -	Freqüências genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo no gene <i>TGF-β1</i> (códon 10T/C e códon 25 G/C) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios.	74
Tabela 6 -	Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo + 874T/A no gene <i>IFN-γ</i> em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios.	77
Tabela 7 -	Freqüências alélicas e genótípicas do polimorfismo - 174G/C no gene <i>IL-6</i> em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos sadios.	79

- Tabela 8 - Freqüências alélicas , genóticas e dos fenótipos previstos do polimorfismo (-1082G/A, -819C/T e -592C/A) no gene *IL-10* em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos saudios. 82
- Tabela 9 - Freqüência alélicas , genóticas e dos fenótipos previstos do polimorfismo no *TNF- $\alpha$* -308G/A em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos saudios. 84

## Lista de Abreviaturas e Siglas

A	Adenina
anti-VHC	anticorpo contra o vírus da hepatite C
APC	célula apresentadora de antígeno
Arg	Arginina
dH <sub>2</sub> O	água destilada
C	Citosina
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	guanina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
HTLV	vírus t-linfotrópico humano
IFN- $\alpha$	interferon-alfa
IFN- $\gamma$	interferon- gama
IL-1	interleucina-1
IL-2	interleucina-2

IL-6	interleucina-6
IL-10	interleucina-10
IL-12	interleucina-12
Ile	isoleucina
LAP	peptídeo associado à latência
Leu	leucina
LPS	lipopolissacarídeo
MEC	matriz extracelular
MHC	complexo principal de histocompatibilidade (do inglês, major histocompatibility complex)
NC	Não codificantes
NK	do inglês, <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
NS	Não estrutural(is)
ORF	Fase aberta de leitura (do inglês, <i>open reading frame</i> )
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
PCR-SSP	reação em cadeia da polimerase com iniciadores de especificidade única (do inglês, <i>polymerase chain reaction with single specificity primers</i> )
Pro	prolina
RIBA	ensaio de imunoblot recombinante (do inglês, <i>recombinant immunoblot assay</i> )
RNA	ácido ribonucléico

RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SNP	polimorfismo de único nucleotídeo
STS	Serviço de Transfusão de Sangue
T	timina
Taq DNA pol	DNA polimerase do organismo <i>Thermus aquaticus</i>
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento-beta
Th1	linfócitos T auxiliar 1
Th2	linfócitos T auxiliar 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - alfa
Thr	treonina
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VHB	vírus da hepatite B
VHC/HCV	vírus da hepatite C (do inglês, <i>hepatitis C virus</i> )
VHC-RNA	ácido ribonucléico do vírus da hepatite C

## Resumo

As citocinas possuem um papel fundamental na regulação da resposta imunológica. Na infecção causada pelo vírus da hepatite C (VHC), os níveis de produção das citocinas podem interferir na progressão da doença, persistência viral e resposta terapêutica. Os genes de citocinas são polimórficos em sítios específicos, e determinados polimorfismos localizados em regiões codificadoras/regulatórias podem alterar a expressão e a secreção das citocinas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a frequência de alelos polimórficos nos genes do  $TNF-\alpha$ ,  $TGF-\beta 1$ ,  $IL-10$ ,  $IL-6$ , e  $IFN-\gamma$  em pacientes portadores da infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C. Foram avaliados 128 indivíduos, 34 mulheres e 94 homens, com o diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite C baseado em achados laboratoriais. A genotipagem das citocinas foi realizada através da PCR-SSP, utilizando o kit da One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray". Foram comparadas as distribuições dos seguintes polimorfismos:  $TNF-\alpha$  (-308G/A),  $TGF-\beta 1$  (códon 10 T/C, códon 25 G/C),  $IL-10$  (-1082 A/G; -819T/C; -592A/C),  $IL-6$  (-174G/C) e  $IFN-\gamma$  (+874T/A), entre estes indivíduos infectados pelo VHC e controles sadios doadores de sangue. Foi observada diferença estatisticamente significativa na frequência do polimorfismo do gene do  $TGF-\beta 1$  (códon 25) entre os indivíduos sadios e os indivíduos infectados com VHC. Não foi observada significância estatística nas frequências alélicas e genóticas dos genes que codificam  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-10$ ,  $TGF-\beta 1$  (códon 10) e  $IL-6$  entre indivíduos infectados com o VHC e controles sadios. Estes achados sugerem uma associação entre o polimorfismo do gene do  $TGF-\beta 1$  (códon 25) e a susceptibilidade para o desenvolvimento da infecção crônica causada pelo VHC. Estudos complementares de indivíduos expostos ao VHC que conseguiram eliminar o vírus e de pacientes portadores do VHC com avaliação do grau de lesão hepática são necessários para determinar o papel do polimorfismo do gene do  $TGF-\beta 1$  (códon 25) na susceptibilidade e no estadiamento/progressão da infecção causada pelo VHC.

Palavras-chaves: hepatite C, genes, citocinas, polimorfismo (genética).



## Abstract

Cytokines play a key role in the regulation of immune responses. In hepatitis C virus infection (HCV), the production of inappropriate cytokine levels appears to contribute to the progression of the disease, viral persistence and affects response to therapy. Cytokine genes are polymorphic at specific sites, and certain polymorphisms located within coding/regulatory regions have been shown to affect the overall expression and secretion of cytokines. The aim of this study was to characterize the frequency of genotypes associated with polymorphisms of *TNF- $\alpha$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-10*, *IL-6*, e *IFN- $\gamma$*  in patients with chronic hepatitis C virus infection. We enrolled 128 individuals, 34 females and 94 males, infected by hepatitis C virus. Genotyping was carried out by PCR-SSP using the kit One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray". We compared the distribution of the following polymorphisms: *TNF- $\alpha$*  (-308G/A), *TGF- $\beta$ 1* (codon10 T/C, codon 25 G/C), *IL-10* (-1082 A/G; -819T/C; -592A/C), *IL-6* (-174G/C) and *IFN- $\gamma$*  (+874T/A), between these subjects infected by HCV and a control group of blood donors. We demonstrated a statistically significant difference in the frequency of *TGF- $\beta$ 1* codon 25 polymorphism between healthy subjects and those infected with HCV. We did not detect any significant differences in the alleles and genotype frequencies of the polymorphisms in the genes that encode *TNF- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *IL-10*, *TGF- $\beta$ 1* codon 10 and *IL-6* between these groups. These findings suggest that *TGF- $\beta$ 1* codon 25 polymorphism could be associated with susceptibility to chronic HCV infection. Further studies, including HCV exposed individuals who have cleared the virus as a control and patients with moderate/severe hepatitis C, are required to determine the true role of *TGF- $\beta$ 1* codon 25 polymorphism in susceptibility and severity/progression of HCV.

Key words: hepatitis C, genes, cytokines, polymorphism (genetics).

## 1. Introdução

A infecção pelo vírus C da hepatite (VHC), inicialmente descrita como uma forma de transmissão parenteral de hepatite não-A não-B, corresponde à cerca de 90% das hepatites pós-transfusionais. A infecção pelo VHC é mais prevalente em indivíduos transplantados, transfundidos, pacientes dialisados, usuários de drogas intravenosas e tatuados.

A hepatite C aguda evolui, após um período de incubação médio de sete semanas, na maioria dos casos, de forma anictérica e assintomática. Cerca de 80% dos indivíduos infectados desenvolvem hepatite crônica, sendo que em torno de 20% destes casos evoluem para cirrose, com possível progressão a carcinoma hepatocelular. Após a infecção aguda, cerca de 1 em 5 casos, evolui para cura espontânea. O controle da infecção parece ser dependente de alguns fatores relacionados ao hospedeiro, como patrimônio genético, estados de saúde, nutricional e imunológico, assim como de fatores inerentes ao próprio vírus, como genótipo e carga viral.

Desde quando o vírus C da hepatite foi descoberto em 1989, tenta-se esclarecer a resposta imunológica contra este vírus e seu papel na determinação da progressão da doença.

A modulação da resposta imune, tanto celular como humoral, é controlada primariamente pela secreção de citocinas por vários tipos celulares. A capacidade máxima de produção *in vitro* de diferentes citocinas em resposta à estimulação por mitógenos, foi demonstrada como sendo variável entre diferentes indivíduos. Estas diferenças podem ser atribuídas a alguns mecanismos moleculares,

incluindo variações em transcrição, tradução e vias de secreção. Recentemente, um mecanismo potencial foi descrito envolvendo mutações conservadas dentro de regiões codificantes e variações de seqüências de resíduos de nucleotídeos dentro de regiões reguladoras (seqüências promotoras, repressoras ou estimuladoras da transcrição). Estes polimorfismos genéticos afetam a expressão e secreção de citocinas tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo aqui chamados “polimorfismos funcionais”.

Este trabalho buscou identificar marcadores genéticos potenciais para suscetibilidade ao desenvolvimento de infecção crônica em portadores do VHC provenientes da cidade de Salvador-BA. Para este fim foram analisados polimorfismos funcionais em cinco diferentes genes de citocinas (fator de transformação do crescimento  $\beta 1$  - TGF- $\beta 1$  [códono 10 T/C, código 25 G/C], interferon  $\gamma$  - IFN- $\gamma$  [+874T/A], interleucina 6 - IL-6 [-174G/C], interleucina 10 - IL-10 [-1082 A/G; -819T/C; -592A/C] e fator de necrose tumoral  $\alpha$  - TNF- $\alpha$  -308G/A)).

Estes polimorfismos foram escolhidos por interferirem na produção dessas citocinas e existirem associações descritas na literatura com outras doenças infecciosas e de herança complexa. Além disso, essas citocinas participam de mecanismos imunológicos importantes nas infecções virais, pois o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  estão envolvidas na destruição de células infectadas, a IL-6 estimula a produção de anticorpos, os quais são importantes para a defesa contra o vírus na sua fase extracelular, enquanto as citocinas IL-10 e TGF- $\beta 1$  participam na modulação negativa da resposta imune, além do TGF- $\beta 1$  também estar envolvido na estimulação da fibrose hepática.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1. O vírus da hepatite C (VHC)**

O vírus da hepatite C é um grande problema de saúde pública, sendo estimado que 3% da população mundial esteja contaminada, havendo ainda provavelmente um grande número de pessoas que desconhece o fato de albergar o vírus (STRAUSS, 2001). A infecção aguda causada pelo VHC é, na maioria dos casos, clinicamente inaparente e de difícil determinação.

A infecção pelo vírus da hepatite C representa uma causa comum de doença parenquimatosa crônica do fígado, caracterizada por inflamação, dano celular e reações fibróticas no tecido hepático. A infecção causada pelo vírus da hepatite C tem como principal consequência uma hepatite crônica persistente, podendo em alguns casos causar cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Além disso, a hepatite C tem tornado-se a principal causa de indicação para o transplante hepático (LAUER&WALKER, 2001).

O VHC pertence à família dos flavivírus e possui como alvo mais comum os hepatócitos. Sua taxa de replicação é extremamente elevada, estimando-se em mais de dez trilhões de partículas virais produzidas por dia, mesmo na fase crônica da infecção (LAUER&WALKER, 2001). O VHC é um vírus RNA de fita única e polaridade positiva de aproximadamente 9.600 resíduos de nucleotídeos que codifica uma única poliproteína viral (ORF- "open reading frame" - fase aberta de leitura) (REED&RICE, 2000). Flanqueando a ORF existem regiões não

codificantes (NC) 5' e 3' terminais. A região 5'NC possui sítio de entrada no ribossomo, por onde é iniciada a síntese protéica. Durante a expressão viral, a poliproteína precursora de aproximadamente 3.000 resíduos de aminoácidos é clivada no citosol dos hepatócitos, originando as proteínas estruturais, incluindo a proteína do nucleocapsídeo, as glicoproteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína p7, e proteínas não-estruturais, incluindo as proteases (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B), uma helicase e uma RNA-polimerase. As proteínas do nucleocapsídeo, NS3, NS4 e NS5 são comumente utilizadas para diagnóstico do VHC pelos métodos de ELISA e RIBA. A região 5'NC e os genes que codificam as proteínas do nucleocapsídeo, assim como outras regiões, são importantes para detecção do vírus e estudos de genotipagem (CLARKE, 1997).

A elevada taxa de mutação do VHC ( $1,44$  a  $1,92 \times 10^{-3}$  substituições de nucleotídeos/local no genoma/ano), determina a sua classificação em quatro grupos filogenéticos: genótipos, subtipos, isolados e quasispécies. Apesar de não haver um sistema de classificação padronizado para as variedades genéticas, a maioria dos pesquisadores concorda que existem pelo menos seis genótipos principais e uma série de mais de 50 subtipos (SIMMONDS *et al.*, 1993; SCHREIER *et al.*, 1996; FARCI&PURCELL, 2000).

Dados epidemiológicos sugerem que a distribuição dos genótipos do VHC varia entre diferentes regiões (DAVIDSON *et al.*, 1995; SCHREIER *et al.*, 1996). Os genótipos 1, 2 e 3 estão mais presentes no Japão, Europa Ocidental, América do Norte e América do Sul; o genótipo 4, na África Setentrional e Central e no Oriente Médio; o genótipo 5 na África do Sul e o 6 no Sudoeste Asiático

(NOUSBAUM, 1998). Além disso, foram descritas associações entre as variações genéticas e as vias de transmissão (DRIESEL *et al.*, 1994; PAWLITSKY *et al.*, 1995), entre as variações genéticas e a resposta clínica à terapia com o interferon (BELL *et al.*, 1997), como também com o desenvolvimento da doença (GARCIA-SAMANIEGO *et al.*, 1997), embora esta última associação seja ainda controversa (MANGIA *et al.*, 1997).

O genótipo 1b é mais prevalente em pacientes mais idosos, com cirrose e carcinoma hepatocelular (LOK&GUNARATNAM, 1997), e parece estar relacionado com maiores níveis de replicação viral (SHARARA, 1997). Esse genótipo também está associado a uma má resposta ao tratamento e maior recorrência da infecção após transplante hepático (SHARARA, 1997). Ele está associado a formas mais graves da doença, podendo essa associação ser explicada por sua presença por períodos mais longos em determinadas regiões (NOUSBAUM, 1998), ou a faixa etária dos indivíduos infectados. O genótipo 3a é mais freqüente em populações mais jovens dos países ocidentais, geralmente entre usuários de drogas (FARCI&PURCELL, 2000), entretanto esta associação não foi encontrada em nosso meio onde o genótipo 1 é mais prevalente neste grupo específico (SILVA, 2004).

O controle da infecção parece ser dependente de características do próprio vírus (genótipo, carga viral), do meio ambiente (coinfecções, ingestão de bebidas alcoólicas) e de fatores do hospedeiro (patrimônio genético, resposta imune humoral e celular, perfil de citocinas).

Em um número pequeno de casos a infecção tem um curso limitado com a eliminação do VHC-RNA. Os fatores que determinam a eliminação espontânea do vírus ou o desenvolvimento de uma infecção persistente não são bem esclarecidos. Um número crescente de estudos de associação genética, tem sugerido o papel de determinados genes como candidatos a marcadores de susceptibilidade ou como fatores que possam influenciar o curso da infecção (POWELL *et al.*, 2000; BARRETT *et al.*, 2003)

## **2.2. Papel de fatores do hospedeiro na resposta à infecção pelo vírus da hepatite C**

Inúmeros são os trabalhos publicados que buscam correlacionar fatores genéticos do hospedeiro e susceptibilidade à infecção causada pelo VHC, resposta terapêutica, presença de co-morbidades (manifestações extra-hepáticas) e progressão da doença. O progresso no desenvolvimento de métodos moleculares tem permitido detectar variações genéticas que interferem na resposta imune, ou polimorfismos do genoma humano (YEE, 2004), que podem influenciar nos comportamentos de diferentes indivíduos frente a infecções diversas, doenças neoplásicas e autoimunes. Essas doenças denominadas de herança complexa são influenciadas por fatores ambientais e por diversos segmentos gênicos, e consiste em um desafio para os geneticistas.

### 2.2.1. HLA

Os antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade(MHC) são glicoproteínas presentes na superfície das membranas celulares. O MHC em humanos é denominado antígeno leucocitário humano (HLA), sendo determinado por genes que se localizam no braço curto do cromossoma 6. Os antígenos de histocompatibilidade podem ser divididos em duas classes: HLA classe I e HLA classe II e as diferenças são baseadas na distribuição dos mesmos nos tecidos e suas funções. As principais proteínas de classe I do HLA são chamadas A, B e C, são expressas em quase todas as células nucleadas do organismo e são responsáveis pela ativação das células T CD8+. As principais proteínas do HLA classe II são chamadas DR, DP e DQ e são expressas principalmente pelas células imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas , linfócitos B e são responsáveis pela ativação das células T CD4+.

Existem evidências de que determinados perfis de HLA se correlacionam com susceptibilidade ou resistência à infecção, evolução da doença e melhor ou pior resposta terapêutica. Por exemplo, foi observada uma menor frequência dos alelos DQB1\*0302 e DQA1\*03 em pacientes do norte europeu portadores de infecção crônica causada pelo VHC quando comparados a controles saudáveis, sugerindo uma associação entre susceptibilidade à infecção pelo VHC e HLA-DQ (TIBBS *et al.*, 1996). Em outro estudo no Reino Unido, foi observado que três alelos HLA (-DRB1\*04, -DQA1\*03 e -DQB1\*0301) foram significativamente mais frequentes em pacientes que eliminaram espontaneamente o vírus, quando comparados com aqueles cronicamente infectados, sugerindo uma associação



destes com o controle da infecção. Quanto ao alelo DQB1\*0302, foi observada associação com proteção à infecção causada pelo VHC (CRAMP *et al.*, 1998).

THURSZ *et al.*, 1999, descreveram associação dos alelos HLA-DRB1\*1101 e HLA-DQB1\*0301 com eliminação espontânea do vírus em pacientes europeus. Neste mesmo trabalho, a persistência da infecção foi associada com os alelos DRB1\*0701 e DRB4\*0101.

Muitos estudos observaram associação dos alelos HLA de classe II DQB1\*0301 e DRB1\*11 com resolução espontânea da infecção pelo VHC, predominantemente em populações caucasianas. Quando realizada uma meta-análise destes estudos independentes, observou-se estimativas de 3,0 e 2,5 para os efeitos dos alelos DQB1\*0301 e DRB1\*11 na resolução espontânea da infecção, respectivamente (YEE, 2004).

Alguns estudos buscaram associar genes do MHC de classe I e sua relação com a infecção pelo VHC. Foi demonstrada associação dos alelos HLA-B\*57 e HLA-Cw\*0102 com eliminação do vírus e dos alelos HLA-A\*2301 e HLA-Cw\*04 com persistência da infecção em pacientes norte-americanos (THIO *et al.*, 2002).

### **2.2.2. Papel de outros genes não localizados no MHC**

O papel de outros genes não localizados no MHC tem sido estudado. Por exemplo, foi observada maior prevalência de indivíduos homocigotos para deleção de 32 pares de base no gene CCR5 (CCR5\*Δ32), receptor de quimiocinas, entre

pacientes alemães portadores da infecção pelo VHC, além da sua correlação com cargas virais mais elevadas (WOITAS *et al.*, 2002). O papel do polimorfismo do gene *MxA*, que codifica uma proteína induzida por interferon, foi estudado em uma população japonesa e observou-se que os genótipos G/G na posição -88 e C/C na posição -123, eram mais prevalentes em indivíduos não-respondedores a monoterapia com interferon (HIJIKATA *et al.*, 2001).

### **2.2.3. Citocinas**

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que podem ser produzidas por quase todos os tipos de células. As citocinas são uma família de proteínas ou glicoproteínas reguladoras que modulam o crescimento, a multiplicação, a migração e a diferenciação das células, mais significativamente das células do sistema hematopoiético. São potentes moléculas imunomoduladoras que regulam a inflamação e a resposta imune, desta forma influenciando a ativação e a função celular. De maneira geral, com exceção de certos fatores de crescimento, que são produzidas em condições fisiológicas, altos níveis de citocinas são produzidos em resposta a processos inflamatórios. As citocinas modulam as funções das células de forma autócrina, parácrina ou endócrina (AOKI&XING, 2004).

Em relação a suas ações fisiológicas e patofisiológicas, as citocinas e seus inibidores naturais têm um papel importante na defesa do hospedeiro contra doenças infecciosas, sendo potenciais agentes terapêuticos para tratamento de

infecções (AOKI&XING, 2004). A utilização das citocinas em terapias pode ter como objetivos aumentar, reconstituir ou diminuir a resposta imune do hospedeiro contra agentes infecciosos (HEYDTMANN *et al.*, 2001). As citocinas também podem ser usadas como adjuvantes em vacinações, aumentando os efeitos imunogênicos das vacinas (AOKI&XING, 2004). De uma outra forma, algumas citocinas e seus inibidores possuem ação antiinflamatória e podem ser utilizados no controle de reações imunes causadas pela produção exacerbada de citocinas pró- inflamatórias (HANADA&YOSHIMURA, 2002).

As citocinas têm grande pleiotropismo biológico e funções redundantes ou compensatórias entre si dificultando, muitas vezes, a separação de seus papéis individuais. Entretanto, está claro que as possíveis respostas são dependentes do balanço de citocinas. A descrição de subtipos diferentes de células TCD4, contribuiu para o entendimento desta regulação. Após a ativação de células TCD4 virgens, estas proliferam e diferenciam-se em Th1 ou Th2. As células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$  e IL-2 (citocinas pró-inflamatórias) e direcionam a resposta para um padrão celular. As células Th2 produzem IL-4, IL-10 e IL-13 que direcionam a resposta para um padrão humoral. A produção de IL-10 caracteriza também essa resposta como anti-inflamatória, pois esta citocina inibe diversas células da resposta imune, incluindo macrófagos e células Th1 (MOSMANN&COFFMAN, 1989).

A imunidade adaptativa é geralmente classificada de acordo com o padrão de secreção das citocinas e a função das células T, determinando respostas imunes do tipo Th1 ou Th2. Nos processos infecciosos, a resposta imune do

hospedeiro pode seguir um padrão celular (Th1) ou um padrão humoral (Th2) dependendo da natureza dos agentes infecciosos. Na resposta contra patógenos intracelulares, como os vírus, é desenvolvida uma resposta de padrão celular Th1, com produção principalmente de IL-2 e IFN- $\gamma$  (COFFMAN&MOSMANN, 1991).

As células apresentadoras de antígenos (APCs), incluindo macrófagos e células dendríticas (DCs), têm um papel fundamental para iniciar e direcionar a diferenciação das células T virgens para um fenótipo de resposta Th1 ou Th2 na fase inicial da ativação imune em conjunto com outras células da imunidade inata, como as células NK, mastócitos e granulócitos. Após o encontro com o patógeno, as APCs expressam moléculas ativadas em sua superfície e liberam certas citocinas que podem influenciar o desenvolvimento de um padrão Th1 ou Th2. O padrão de resposta determinado é dependente da natureza dos patógenos, do microambiente e da interação das células com as APCs (AOKI&XING, 2004). Por exemplo, células dendríticas ativadas ou macrófagos produzem IL-12 em resposta a patógenos intracelulares. Esta IL-12 é crucial para diferenciação para um padrão Th1 e importante para produção de IFN- $\gamma$  pelas células Th1, células NK e macrófagos (HEYDTMANN *et al.*, 2001). As células Th1 são responsáveis pela ativação das células T CD8+, que participam da resposta contra infecções intracelulares. O completo desenvolvimento da resposta Th1 assegura um controle efetivo do patógeno intracelular (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2005).

Recentemente, tem-se descrito o papel de células denominadas células T reguladoras (T<sub>regs</sub>) e sua contribuição nas doenças infecciosas. Estas células T<sub>regs</sub>, CD4+CD25+, surgem durante o processo normal de maturação no timo e

sobrevivem na periferia, representando 5 a 10% das células TCD4+. Além da função de manter a tolerância, suprimindo a ativação e expansão de linfócitos que possam causar desordens autoimunes, evidências sugerem que estas células também respondem a antígenos expressos por patógenos (BELKAID&ROUSE, 2005). As T<sub>regs</sub> são uma população celular altamente diferenciada com ação supressora sobre as células T CD4+ e CD8+ antígeno-específicas. Esta supressão é dose-dependente, requer o contato célula-célula e envolve a secreção das citocinas TGF- $\beta$  e IL-10 (NAKAMURA *et al.*, 2001; ZHENG *et al.*, 2004; FAHLEN *et al.*, 2005).

Observa-se que a redução ou a ausência desta população de células T<sub>regs</sub> pode melhorar a resposta contra alguns agentes infecciosos, pois limitam a magnitude das respostas efetoras, resultando em controle inadequado das infecções (BELKAID *et al.*, 2002; CABRERA *et al.*, 2004). Entretanto, estas células também são importantes na limitação da lesão aos tecidos causada pela resposta imune aos patógenos (BELKAID&ROUSE, 2005).

As citocinas exercem um papel fundamental na coordenação da resposta imune contra uma infecção viral. A secreção de citocinas que são associadas com o sistema imune inato, como os interferons  $\alpha$  e  $\beta$  e a interleucina-12 (IL-12), ocorre logo após a infecção, antes do desenvolvimento da resposta pelas células TCD8+ (HEYDTMANN *et al.*, 2001). Tem sido proposto que a resposta imune na hepatite C crônica seja compartimentalizada, com predomínio da resposta Th2 ou Th0 no sangue periférico (TSAI *et al.*, 1997), e resposta Th1 no fígado (NAPOLI *et al.*, 1996). Em contraste, pacientes que eliminam o vírus espontaneamente

apresentam uma forte resposta Th1 no sangue periférico (CRAMP *et al.*, 2000). A ineficiência de uma resposta Th1 parece resultar de muitos fatores, como por exemplo a capacidade debilitada das células dendríticas em estimular as células T na hepatite C crônica (KANTO *et al.*, 1999; PACHIADAKIS *et al.*, 2005). O envolvimento de células T reguladoras na hepatite C deve ser considerado como um possível mecanismo para persistência do vírus. Foi descrito que indivíduos cronicamente infectados pelo VHC possuem uma maior quantidade de células T<sub>regs</sub> no sangue periférico quando comparados a controles saudáveis (SUGIMOTO *et al.*, 2003). Neste trabalho, também foi observado que a depleção das células T<sub>regs</sub> favorece a resposta antígeno-específica dos linfócitos TCD8+ *ex vivo*, o que sugere que a persistência viral foi associada com a supressão das células TCD8+. Em outro estudo, ensaios *in vitro* mostraram que a depleção de células T<sub>regs</sub> aumenta a proliferação de células T CD4+ e CD8+ específicas para o VHC. Também foi observado que as T<sub>regs</sub> secretam TGF- $\beta$  e IL-10 e o papel do TGF- $\beta$  foi mostrado abolindo-se o efeito supressor das células T<sub>regs</sub>, através de anti-TGF- $\beta$  (CABRERA *et al.*, 2004). Neste mesmo estudo, a maior frequência de células T<sub>regs</sub> em pacientes cronicamente infectados pelo VHC quando comparados a controles e a correlação positiva entre estas células e a carga viral, suporta sua associação com persistência (CABRERA *et al.*, 2004). Foi observado que o TGF- $\beta$ , geralmente produzido em altas concentrações em infecções crônicas, é também um importante fator para sobrevivência e função das células T<sub>regs</sub> (GREEN *et al.*, 2003). Também foi demonstrado que células T CD4+, quando expostas a altas concentrações de TGF- $\beta$ , podem tornar-se células supressoras (CHEN *et al.*,

2003; ZHENG *et al.*, 2004). Além disso, grandes quantidades de TGF- $\beta$  podem promover atividade e retenção local das células T<sub>regs</sub> (BELKAID&ROUSE, 2005).

### 2.3. Polimorfismos em genes de citocinas

Diversos estudos foram realizados buscando analisar a correlação da variação genética encontrada em regiões codificantes ou reguladoras dos genes de citocinas e a infecção causada pelo VHC. Estas variações genéticas influenciam significativamente a capacidade de produção das citocinas, o que explica a diferença entre os indivíduos em relação a sua habilidade de produzir citocinas *in vitro* após estimulação dos leucócitos do sangue periférico (BIDWELL, J. *et al.*, 1999). Estes estudos foram realizados buscando correlações entre estes polimorfismos em genes de citocinas e a susceptibilidade a infecção viral, a resposta a terapias anti-VHC e a progressão da doença (YEE, 2004).

Os genes de citocinas são polimórficos em sítios específicos e certas mutações localizadas dentro de regiões codificantes ou reguladoras estão associadas com baixa ou alta produção de determinada citocina (WILSON *et al.*, 1997; FISHMAN *et al.*, 1998; PRAVICA *et al.*, 1999).

Existe uma variação individual na produção de cada citocina, onde podem ser observadas diferenças de 3-20 vezes na produção de determinada citocina após estimulação *in vitro* (TURNER *et al.*, 1995; AWAD *et al.*, 1998). No mecanismo de produção destas citocinas existem muitos pontos possíveis de controle da síntese e de suas funções. A produção de determinada citocina pode

dependem da atividade transcricional do seu gene, da estabilidade do RNA mensageiro, da tradução dos novos polipeptídios, das modificações pós-traducionais, da estabilidade intracelular da proteína e seu transporte e, finalmente, da sua exportação para o meio extracelular. Existem evidências de que a produção de citocinas é dependente da ativação transcricional dos seus genes e que os indivíduos possuem uma variabilidade genética que leva à produção mais alta ou mais baixa (PRAVICA *et al.*, 1999).

Essa variabilidade pode ser controlada por características específicas do genótipo, evidenciadas por polimorfismos nas regiões reguladoras de cada gene que ocasionam diferenças no padrão de expressão de atividade transcricional (BIDWELL, J. *et al.*, 1999).

A predisposição para o desenvolvimento de uma resposta Th1 ou Th2, em pequena ou grande parte, pode ser geneticamente determinada pelos genes que codificam as citocinas (BIDWELL *et al.*, 1998). Foi demonstrado que mesmo uma simples mudança de base na seqüência de DNA pode substancialmente aumentar ou diminuir a ligação de um particular fator de transcrição (PRAVICA *et al.*, 1999). Isto pode ocorrer mesmo quando o polimorfismo não altera a ligação de fatores ativadores na posição da base modificada e sim está relacionado a alterações na estrutura secundária do DNA que afeta o acesso dos fatores de transcrição (WILSON *et al.*, 1993).

Como estes polimorfismos estão independentemente segregados, grupos de indivíduos podem ter um padrão de expressão de citocinas diferente do outro (PYO *et al.*, 2003; UBOLDI DE CAPEI *et al.*, 2003). Alguns estudos relatam que os



polimorfismos de genes de citocinas podem influenciar a evolução clínica de algumas doenças multifatoriais, como complicações relacionadas a transplantes (TURNER, D. *et al.*, 1997; PERREY *et al.*, 1998; BABEL *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; UBOLDI DE CAPEI *et al.*, 2004), doenças auto-imunes (BRINKMAN *et al.*, 1997; SIMMONDS *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2005; OEN *et al.*, 2005), doenças causadas por vírus (TAMBUR *et al.*, 2001; BEN-ARI *et al.*, 2003; GENTILE *et al.*, 2003; OLEKSYK *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2005) e cânceres (DEMETER *et al.*, 1997; MIGITA *et al.*, 2005; PERRI *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). É importante ressaltar que existem diferenças na frequências alélicas e genotípicas de genes de citocinas em diferentes grupos que podem tornar evidentes diferenças na suscetibilidade genética a doenças (HAUKIM *et al.*, 2002).

Estudos de associação de genes de citocinas são instrumentos na identificação de estados específicos das doenças ou manifestações clínicas que são provavelmente causadas pela expressão de citocinas geneticamente determinadas (VANDENBROECK&GORIS, 2003). Os estudos de genes de citocinas em doenças multifatoriais são também instrumentos para compreensão das funções das citocinas. Alterações nos níveis de expressão de citocinas comumente acompanham a resposta imune aberrante que é freqüentemente observada antes ou concomitantemente com o estabelecimento da progressão da doença em muitas condições patológicas (BIDWELL *et al.*, 2001).

As análises das associações entre polimorfismos em genes de citocinas e doenças humanas têm sido realizadas em estudos do tipo caso-controle, nos quais a frequência dos alelos polimórficos é comparada em grupos de controle e

pacientes. Um importante critério que deve ser estabelecido quando se faz um estudo de associação de doenças envolvendo a análise de polimorfismo de mutação simples é o estudo das freqüências alélicas em uma população controle (BIDWELL, J. L. *et al.*, 1999). Vários estudos de freqüências de alelos de citocinas foram realizadas em diferentes populações mundiais (UM&KIM, 2003; CHO *et al.*, 2004; DELANEY *et al.*, 2004; NESS *et al.*, 2004; TRAJKOV *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de mapas detalhados de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) do genoma humano associados com tecnologias de genotipagem permite a realização de estudos de associação que auxiliam a desvendar o papel das características genéticas nas doenças multifatoriais ou a importância destes polimorfismos nas respostas a drogas. Entre as doenças multifatoriais encontram-se doenças inflamatórias e cardiovasculares, osteoporose, diabetes, desordens psiquiátricas, cânceres e doenças infecciosas. De maneira geral, a natureza das doenças complexas claramente indica um componente genético significativo (GRAY *et al.*, 2000).

Este é o primeiro trabalho que descreve polimorfismos em genes de citocinas em indivíduos brasileiros infectados pelo VHC. Desta forma, uma abordagem molecular na tentativa de identificar fatores genéticos relacionados com o desenvolvimento da infecção pelo VHC, neste grupo específico, é extremamente relevante. A utilização dos genes de citocinas como candidatos baseia-se na sua função de mediadores da resposta imune, e pela sua capacidade de regular a intensidade e a duração desta resposta imunológica por inibir ou estimular a ativação, proliferação e ou diferenciação de várias células, e

por regular a secreção de anticorpos e outras citocinas. Esta abordagem trará uma possibilidade para melhor entendimento da patogênese no desenvolvimento de diferentes formas clínicas decorrentes da infecção pelo VHC, na identificação de potenciais marcadores de suscetibilidade e a possibilidade de utilização dessa mesma abordagem para o estudo de outras doenças infecciosas de interesse em nosso meio.

Além disso, esta informação sobre polimorfismo nos genes de citocinas, pode direcionar novos alvos para imunoterapia e, em particular, facilitar a identificação de subgrupos clínicos de pacientes que, devido a sua constituição genética nesses *loci* dos genes das citocinas, podem se beneficiar de uma terapia agonista ou antagonista com citocinas (VANDENBROECK&GORIS, 2003).

### 2.3.1 Fator de Transformação do Crescimento- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

O TGF- $\beta$ 1 é uma proteína pleiotrópica que possui um papel importante na modulação, no crescimento celular e diferenciação de uma grande variedade de tipos celulares e na produção e degradação de matrix extracelular. É produzida por leucócitos, incluindo linfócitos, macrófagos, célula dendríticas, atuando de maneira autócrina ou parácrina para controlar a diferenciação, a proliferação e o estado de ativação destas células imunes (LETTERIO&ROBERTS, 1997). O TGF- $\beta$  pode modular a expressão de moléculas de adesão e desenvolve um gradiente quimiotático para os leucócitos e outras células participantes da resposta inflamatória, e as inibe uma vez que tenham se tornado ativadas . A produção aumentada do TGF- $\beta$ 1 e a ativação de sua forma latente tem sido associada com desordens autoimunes, susceptibilidade a infecções oportunistas, e a complicações fibróticas associadas com condições inflamatórias crônicas (LETTERIO&ROBERTS, 1998).

São encontradas três isoformas altamente homólogas do TGF- $\beta$  nos tecidos de mamíferos: TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Estas isoformas são reguladas por genes específicos localizados nos cromossomos humanos nos *loci* 19q13, 1q41 e 14q24, respectivamente. O TGF- $\beta$ 1 é a isoforma com papel mais importante no processo de reparo tecidual e na imunoregulação, tanto do ponto de vista quantitativo como qualitativo (LETTERIO&ROBERTS, 1997).

Todas as três isoformas humanas do TGF- $\beta$  são sintetizadas como moléculas precursoras que são processadas proteoliticamente para produção das

formas ativas do TGF- $\beta$ , formadas de duas cadeias idênticas de polipeptídeos que consistem de 112 aminoácidos da porção C-terminal da proteína precursora. A seqüência de aminoácidos da forma ativa é altamente conservada nos mamíferos (LETTERIO&ROBERTS, 1997). Esta forma ativa, que corresponde a um homodímero de 24 kDa, está associada de maneira não-covalente a uma proteína denominada LAP (Peptídeo Associado à Latência). O LAP é um componente importante do TGF- $\beta$ , necessário para que seja secretado de maneira eficiente, prevenindo sua ligação a receptores inespecíficos nas superfícies celulares e mantendo sua disponibilidade imediata em um grande reservatório extracelular (GOVINDEN&BHOOLA, 2003).

Os níveis de expressão da proteína são consequência da variabilidade do seu gene e podem levar a diferentes efeitos do TGF- $\beta$ 1 no crescimento celular e na formação da matriz extracelular. O TGF- $\beta$ 1 induz a formação de depósitos de matriz extracelular (MEC) e fibrose através de (1) estímulo da quimiotaxia do fibroblasto, (2) estímulo da síntese de colágeno e de fibronectina e (3) inibição da degradação de colágeno. É produzido por plaquetas, células endoteliais, células T e macrófagos.

Recentemente, o TGF- $\beta$ 1 tem sido associado com o desenvolvimento de doenças importantes como cânceres, aterosclerose, doenças fibróticas e doenças auto-imunes (GRAINGER *et al.*, 1999; BENDICHO *et al.*, 2005). O TGF- $\beta$ 1 possui um importante papel no desenvolvimento da fibrose hepática, através do estímulo da produção de colágeno pelas células estelares do fígado. TSUSHIMA *et al.*, 1999, observaram que os níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 correspondem aos níveis de TGF- $\beta$ 1 encontrados no fígado em pacientes com infecção crônica causada

pelo VHC e após terapia IFN- $\alpha$  estes níveis plasmáticos decresceram, simultaneamente com a regressão da fibrose hepática. Os níveis séricos do TGF- $\beta$ 1 não se correlacionam com a atividade inflamatória da doença, mas se correlacionam com o grau de fibrose hepática, o que sugere que o TGF- $\beta$ 1 está mais relacionado à fibrogênese hepática do que ao dano hepatocelular. A fibrose hepática é induzida pela excessiva secreção de proteínas da matriz pelas células estelares hepáticas após o dano e ativação destas células. Embora o TGF- $\beta$ 1 não tenha efeito na proliferação das células estelares hepáticas, parece manter as células estelares ativadas pelo decréscimo da apoptose, permitindo que estas células continuem produzindo proteínas da matrix extracelular e conseqüentemente fibrogênese (KOUNTOURAS *et al.*, 2003).

Através dos estudos sobre a regulação genética na produção de TGF-  $\beta$ 1, foram identificados alguns polimorfismos genéticos importantes: nas posições -988 (C/A), -800 (G/A) e -509 (C/T) à montante do primeiro nucleotídeo transcrito; uma inserção (C) na posição +72 da região não traduzida; dois polimorfismos nas posições +869 e +915 na seqüência sinal, que alteram o códon 10 (T/C - Leu→Pro) e o códon 25 (G/C - Arg→Pro), respectivamente, e um outro polimorfismo no códon 263 (C/T - Thr→Ile), na região do gene que codifica parte da proteína precursora não presente na forma ativa (CAMBIEN *et al.*, 1996; AWAD *et al.*, 1998; GRAINGER *et al.*, 1999).

Foi descrita a associação da variação interindividual nos níveis de produção do TGF- $\beta$ 1 e o polimorfismo na posição +915, pois linfócitos estimulados *in vitro* de indivíduos que possuíam o genótipo homozigoto (arginina/arginina) produziam

níveis significativamente mais elevados de TGF- $\beta$ 1 quando comparados aos de indivíduos heterozigotos (arginina/prolina) (AWAD *et al.*, 1998).

Os polimorfismos que afetam os códons 10 e 25 estão localizados na seqüência sinal que é clivada do precursor do TGF- $\beta$ 1 ao nível do códon 29. A seqüência sinal permite o transporte da proteína sintetizada através da membrana do retículo endoplasmático. Este peptídeo sinal possui três regiões: uma região N-terminal positivamente carregada, uma região central hidrofóbica, e uma região polar C-terminal. O polimorfismo no aminoácido 10 corresponde ao centro hidrofóbico. De maneira oposta, o polimorfismo no aminoácido 25 está localizado próxima à porção 3' que codifica o centro hidrofóbico e leva a mudança de um aminoácido polar para um aminoácido menor apolar (CAMBIEN *et al.*, 1996).

As conseqüências funcionais destes polimorfismos não são bem compreendidas, embora a transição de T→C, que resulta na mudança de uma leucina para prolina no códon 10, pareça afetar a exportação eficiente de uma nova proteína sintetizada, enquanto a transição G→C que resulta na mudança de uma arginina para prolina no códon 25, tem sido associada com níveis menores de TGF- $\beta$ 1 *in vitro* (YAMADA *et al.*, 1998; GRAINGER *et al.*, 1999).

VIDIGAL *et al.*, 2002, observaram que o genótipo C/C no códon 10 encontrava-se associado com resistência à terapia e a susceptibilidade a infecção pelo VHC. A transição de T para C no códon 10, que parece afetar os níveis circulantes de TGF- $\beta$ 1, pode ser também um fator genético indicador da possível resposta inadequada à terapia antiviral combinada para infecção pelo VHC. Um estudo recente demonstrou que o genótipo G/G no códon 25 é significativamente

associado com o estágio da fibrose hepática em pacientes crônicos para o VHC (POWELL *et al.*, 2000). O genótipo heterozigoto (Arg/Pro), nessa mesma posição, indicou uma progressão significativamente mais rápida da fibrose hepática nos pacientes portadores de VHC (GEWALTIG *et al.*, 2002). TSUSHIMA *et al.*, 1999, descreveram que em pacientes cronicamente infectados, os níveis plasmáticos de TGF- $\beta$ 1 foram significativamente menores em pacientes após a terapia com IFN- $\alpha$  e a queda destes níveis estavam associados com a regressão de fibrose hepática. O polimorfismo no códon 25 (Arg/Pro), também se encontra associado a um aumento de risco para infarto agudo do miocárdio (CAMBIEN *et al.*, 1996)

### **2.3.2. Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )**

O IFN- $\gamma$  é uma citocina muito importante produzida pelos linfócitos T auxiliares (Th1), pelos linfócitos T citotóxicos, pelas células NK e pelos macrófagos. O papel mais importante do IFN- $\gamma$  encontra-se nas respostas inflamatórias (PRAVICA *et al.*, 1999). Sua atividade principal é a ativação dos macrófagos levando a inibição da replicação de um amplo espectro de agentes infecciosos, particularmente de patógenos intracelulares como os vírus. O IFN- $\gamma$  também suprime a ativação das células T auxiliares (Th2) e favorece a diferenciação das células T CD4+ virgens para um padrão Th1 de resposta em cooperação com a IL-12.

O receptor do IFN- $\gamma$  é uma proteína heterodimérica composta de duas subunidades: IFN- $\gamma$ -R1 e IFN- $\gamma$ -R2 (AOKI&XING, 2004). O gene do IFN- $\gamma$  é



localizado no cromossomo 12q24.1 em humanos, composto de quatro exons e três íntrons e possui um estimulador localizado no primeiro íntron. No gene do IFN- $\gamma$  é encontrada uma repetição de dinucleotídeo CA no primeiro íntron, localizada 875 bp à jusante do início do primeiro exon. Este microssatélite é polimórfico apresentando extensão variável. Foram descritos cinco alelos deste microssatélite na população do Reino Unido, que mostraram diferença no número de repetições CA. Foi demonstrado que o alelo #1 corresponde a onze repetições CA, o alelo #2 corresponde a doze repetições, e os alelos # 3- #5 correspondem a treze e quinze repetições, respectivamente. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que uma produção mais elevada de IFN- $\gamma$  é encontrada após a estimulação *in vitro* de células polimorfonucleares com mitógeno sendo este fato atribuído a indivíduos que sejam homocigotos para o alelo #2 (PRAVICA *et al.*, 1999).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina implicada no desenvolvimento de fibrose em tecidos acometidos por processos inflamatórios, levando a um aumento na síntese de colágeno e aumento da transcrição de genes de outros componentes da matrix extracelular (MEC) como a fibronectina. Em um estudo consecutivo, o alelo #2 foi associado à fibrose de enxerto após transplante de pulmão, o que confirmou seu papel como marcador de alta produção de IFN- $\gamma$ , tanto *in vivo* (AWAD *et al.*, 1999).

Posteriormente PRAVICA *et al.*, 2000, descreveram um polimorfismo de único nucleotídeo, T para A na posição +874, na porção 5' da região CA que se correlaciona com a presença do alelo #2, alto produtor de IFN- $\gamma$ . Foi demonstrada correlação entre a presença do alelo T e a presença do microssatélite

representado pelo alelo #2 . Este polimorfismo T/A coincide com o sítio de ligação do NF- $\kappa$ B o que pode levar a alterações no processo de transcrição do gene do IFN- $\gamma$ , desta forma influenciando o seu nível de produção.

Este polimorfismo está associado a doenças auto-imunes, como artrite reumatóide e esclerose múltipla (MCNICHOLL *et al.*, 2000). Foi demonstrada uma reduzida frequência do genótipo + 874T/T (altos produtores) no gene do IFN- $\gamma$  em um grupo de pacientes com tuberculose crônica, sugerindo que o determinante genético para baixa produção de IFN- $\gamma$  pode predispor ao desenvolvimento de tuberculose crônica pulmonar (LIO *et al.*, 2002).

Foi sugerida uma associação entre o genótipo A/A na posição +874 do gene do IFN- $\gamma$  e a susceptibilidade ao desenvolvimento da infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B (VHB) (BEN-ARI *et al.*, 2003). TAMBUR *et al.*, 2001, não observaram correlação entre este polimorfismo e a recorrência da infecção pelo VHC em transplantados hepáticos, nem correlação com rejeição do transplante. BARRET *et al.*, 2003, não observaram correlação do polimorfismo na posição +874 do gene do IFN- $\gamma$  com persistência ou eliminação do VHC.

### 2.3.3. Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina (IL-6) é uma citocina multifuncional que possui um papel central na defesa do hospedeiro devido ao seu amplo espectro de atividades no sistema hematopoiético e imune, como diferenciação de células B para plasmócitos e de monócitos para macrófagos, além da habilidade de induzir a resposta de fase aguda (VANDEN BERGHE *et al.*, 2000; DIEHL&RINCON, 2002). É produzida por variados tipos de células incluindo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, células endoteliais, células gliais e queratinócitos em resposta a estímulos diversos (DIEHL&RINCON, 2002).

A IL-6 é uma citocina altamente regulada e sua expressão ocorre normalmente em níveis baixos, exceto durante processos infecciosos, traumas e situações de estresse fisiológico. Sob estas circunstâncias, a expressão aumentada da IL-6 leva a uma série de eventos típicos da inflamação, incluindo leucocitose, trombocitose, ativação de linfócitos e indução da síntese de proteínas de fase aguda nos hepatócitos (VANDEN BERGHE *et al.*, 2000).

O gene da IL-6 está localizado no locus 7p21 do cromossomo humano. São descritos quatro polimorfismos na região promotora do gene da IL-6 (597G/A, -572G/C, -373A (9n)T(n), -174G/C) (TERRY *et al.*, 2000; ISHIHARA&HIRANO, 2002).

Para investigar a possibilidade dos níveis plasmáticos da IL-6 encontrados na artrite crônica juvenil serem resultados de uma diferença de controle de expressão desta citocina (FISHMAN *et al.*, 1998), foi estudada a região flanqueadora 5' do gene da IL-6 e, desta forma, foi possível detectar este

polimorfismo na posição -174G/C que parece afetar a sua transcrição, sendo demonstrado que o alelo C está associado com níveis plasmáticos significativamente mais baixos da IL-6. Neste estudo foi observada uma frequência mais elevada dos fenótipos alto produtores GG e GC nos pacientes portadores de artrite juvenil crônica (FISHMAN *et al.*, 1998). Neste mesmo trabalho, foi demonstrada variação nas frequências dos polimorfismos em diferentes grupos étnicos, sendo observado uma menor frequência do alelo -174C em indígenas e afros-descendentes quando comparados a um grupo de caucasianos. Neste trabalho foram demonstrados dados *in vitro* e *in vivo* que sugerem que a presença do alelo C resulta em níveis mais baixos da IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998). Estudo funcional na população coreana, mostrou que o alelo G está associado a níveis plasmáticos mais elevados de IL-6 quando comparado ao alelo C (PYO *et al.*, 2003).

Outro estudo mostrou que a mudança do alelo G para C resulta em supressão da transcrição gênica da IL-6 em resposta ao LPS ou IL-1 em células HeLa (FISHMAN *et al.*, 1998).

Alguns trabalhos foram realizados buscando associações principalmente entre o polimorfismo na posição -174G/C e determinadas condições patológicas. Não foi possível determinar correlação entre este polimorfismo e pacientes com doença intestinal inflamatória ou indivíduos caucasianos portadores de lúpus eritematoso sistêmico. Portanto, foi demonstrado que existia associação entre os indivíduos homozigotos G/G na posição -174 e a susceptibilidade ao desenvolvimento de diabetes melitus tipo I (ISHIHARA&HIRANO, 2002). Em trabalho publicado por OLIVIERI *et al.*, 2002, as células mononucleares do sangue

periférico (PBMC) de indivíduos homozigotos para o alelo C e heterozigotos GC produziram menores níveis de IL-6 *in vitro*. Nos mesmos indivíduos em questão, os níveis de IL-6 no plasma encontravam-se menores do que em indivíduos homozigotos para o alelo G.

Estudos têm tentado correlacionar a presença de polimorfismos no gene da IL-6 na região -174 e desenvolvimento de infarto do miocárdio, entretanto com resultados inconsistentes (BENNET *et al.*, 2003). Em estudo realizado na Irlanda uma associação significativa foi observada entre o genótipo CC, baixo produtor, nos indivíduos que apresentaram eliminação espontânea do vírus da hepatite C quando comparados aos indivíduos que apresentaram infecção persistente. O fenótipo alto produtor (GG/GC) foi associado com o desenvolvimento de infecção persistente (BARRETT *et al.*, 2003).

#### **2.3.4. Interleucina 10 (IL-10)**

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina homodimérica de 36-kDa que possui atividades biológicas complexas, apresentando funções tanto imunoestimulatórias como imunossupressoras (LAZARUS *et al.*, 2002; VICARI&TRINCHIERI, 2004). É produzida por macrófagos, células B, células T e uma variedade de outras células como mastócitos, queratinócitos e algumas linhagens de células tumorais, normalmente em resposta a algum estímulo (CONTI *et al.*, 2003).

A interleucina-10 (IL-10) , conhecida inicialmente pela sua propriedade de inibir a ativação e a ação efetora das células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina multifuncional com efeitos diversos nas diferentes células hematopoiéticas. Uma de suas principais funções é limitar a resposta inflamatória. Além disso, a IL-10 regula o crescimento e a diferenciação das células B, células NK, células T citotóxicas e auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (MOORE *et al.*, 2001; PESTKA *et al.*, 2004; VICARI&TRINCHIERI, 2004).

A IL-10 pode suprimir diretamente a proliferação das células T, especificamente inibindo sua produção de IL-2 (ZELLER *et al.*, 1999) e pode inibir a produção de citocinas das células T e NK indiretamente, atuando através da inibição da atividade das células acessórias (macrófagos/monócitos). Seus efeitos inibitórios sobre essas células encontram-se na síntese de monocinas, na produção de óxido nítrico (NO), e na expressão do MHC classe II e moléculas coestimulatórias como IL-12 e CD80/CD86 (ESKDALE *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 2001; PESTKA *et al.*, 2004). Entre as citocinas pró-inflamatórias que têm sua síntese inibida pela ação da IL-10 estão IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$  (LAZARUS *et al.*, 2002; CONTI *et al.*, 2003). A IL-10 também altera a expressão de receptores de quimiocinas e aumenta a expressão de ligantes da  $\beta_2$  -integrina (PESTKA *et al.*, 2004).

A transcrição do gene da IL-10 pode ser regulada por alguns fatores como Sp1 e Sp3, que são expressos constitutivamente por diversos tipos celulares. Além do controle da estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) em nível pós-transcricional, é sugerido que seu gene seja, de alguma forma, transcrito

constitutivamente e sujeito a controle pela alteração de mecanismos de degradação do RNA. Esta situação pode vir a facilitar um controle mais rápido da expressão da IL-10, que pode ser alcançado mediante a ativação da transcrição (MOORE *et al.*, 2001).

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1 dos humanos, precisamente entre 1q31 e 1q32. Cerca de três quartos da variabilidade na produção de IL-10 entre os indivíduos está associada com variações genéticas (LAZARUS *et al.*, 2002). O fato da diferença dos níveis de IL-10 ser proporcional à síntese do RNA mensageiro e não a sua meia-vida, sugerem a existência de variações individuais na estrutura da região promotora da IL-10 (VICARI&TRINCHIERI, 2004).

Alguns polimorfismos foram descritos na região 5' do gene da IL-10 em humanos. Inicialmente foram descritos seis sítios polimórficos nas posições -1082, -819, -652, -592, -127 e -41 (TURNER, D. M. *et al.*, 1997). Foram descritas duas regiões de microssatélites polimórficos, que correspondem à repetição de dinucleotídeos (CA), aproximadamente 1.2 kb e 4.0 kb a montante do sítio de início da transcrição, e três das mutações pontuais se encontram associadas : -1082(G/A), -819(C/T), e -592(C/A) (ESKDALE *et al.*, 1998; MOORE *et al.*, 2001). As possíveis combinações destes polimorfismos formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. O haplótipo GCC, quando em homozigose, confere o fenótipo previsto de alto produtor; quando em heterozigose com os haplótipos ACC e ATA, confere o fenótipo previsto de produtor intermediário. Quanto aos haplótipos ACC e ATA, quando em homozigose ou heterozigose conferem o fenótipo previsto de baixo

produtor. Estes polimorfismos ocorrem provavelmente dentro da região promotora do gene da IL-10.

A presença do alelo G na posição -1082 é associada com alta produção de IL-10, e o alelo A com baixa produção de IL-10, tanto *in vitro* como *in vivo*. Células mononucleares do sangue periférico obtidas de indivíduos que apresentam um genótipo G/G na região promotora produzem quantidades duas vezes maiores de IL-10 quando comparadas com células de indivíduos que exibiam genótipos A/A ou G/A na mesma posição (TURNER, D. M. *et al.*, 1997). Polimorfismos nas posições -819 e -592 parecem não influenciar independentemente a produção de IL-10.

Alguns estudos têm descrito associações entre o polimorfismo do gene da IL-10 e algumas patologias, como doenças auto-imunes, asma, lúpus eritematoso sistêmico, artrite e, também, a indução da tolerância a transplantes (LAZARUS *et al.*, 2002; PYO *et al.*, 2003).

Em relação à infecção causada pelo vírus da hepatite C, resultados contraditórios têm sido publicados baseados na erradicação espontânea do vírus. CONSTANTINI *et al.*, 2002, não observaram diferenças na distribuição destes polimorfismos na região promotora do gene da IL-10(-1082, -819, -592) entre o grupo que erradicou a infecção espontaneamente e o grupo que erradicou a infecção após o tratamento com IFN- $\alpha$ . Já em trabalho publicado por MANGIA *et al.*, 2004, foi demonstrado que o haplótipo ATA pode estar associado com a erradicação espontânea da infecção causada pelo vírus da hepatite C.



O papel da IL-10 na infecção pelo HCV é frequentemente discutido. O efeito da IL-10 no desequilíbrio da resposta celular e na inibição da produção de IFN- $\alpha$  pode causar persistência viral. Pacientes com infecção crônica pelo VHC geneticamente predispostos a uma alta produção de IL-10, apresentaram associação com resposta não sustentada ao tratamento com interferon  $\alpha$ , avaliada após 12 semanas de terapia (EDWARDS-SMITH *et al.*, 1999). YEE *et al.*, 2001, observaram que indivíduos homozigotos nas posições -592A, -819T, ou a presença do haplótipo (108pb) – (-2575T) - (-2763C) – (-1082A) – (-819T) – (-592A) está associado com resposta sustentada ao tratamento com interferon e ribavirina. VIDIGAL *et al.*, 2002, observaram que o genótipo G/G, associado com o polimorfismo na posição -1082 da região promotora da IL-10, encontrava-se associada com a infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C e foi também observado que o haplótipo GCC/GCC, fenótipo previsto de alto produtor, encontrava-se mais freqüente em indivíduos portadores do VHC em relação aos controles sadios.

POWELL *et al.*, 2000, não observaram associação dos polimorfismos nas posições -592 e -1082 do gene da IL-10 com os estágios de fibrose hepática. NELSON *et al.*, 2000, observaram que a IL-10, citocina relacionada com o padrão de resposta Th2, possui atividade antifibrinogênica em lesões crônicas no fígado. Desta forma, o genótipo -1082 G/G, fenótipo alto produtor, pode ter um efeito protetor contra a cronificação da hepatite C.

### **2.3.5. Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos e monócitos, mas também por uma variedade de outras células como neutrófilos, linfócitos, células NK, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. O TNF é uma proteína homotrimérica sintetizada como uma proteína integral de membrana que após clivagem produz a forma solúvel de 17Kd (HAJEER&HUTCHINSON, 2001; AOKI&XING, 2004). A forma solúvel do TNF exerce uma série de atividades inflamatórias e imunomodulatórias que são importantes na defesa do hospedeiro. O TNF é uma citocina pró-inflamatória com um amplo espectro de atividade biológicas. O TNF estimula a ativação e a diferenciação de muitos tipos de células e possui um papel fundamental na patogênese de muitas condições inflamatórias, infecciosas e auto-imunes como sepse, artrite reumatóide e infecções causadas por micobactérias (AOKI&XING, 2004). Os níveis circulantes do TNF são regulados em diferentes estágios: transcrição gênica, controle pós-transcricional da estabilidade do RNA mensageiro, clivagem da sua forma de proteína integral de membrana para liberação da forma solúvel do TNF e a expressão dos receptores (HAJEER&HUTCHINSON, 2001).

A cascata de sinalização mediada pela ligação do TNF a seus receptores leva a proliferação das células T e a resposta pro-inflamatória. Os receptores mais estudados do TNF são o TNF-R-1 e TNF-R-2. O TNF-R-1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, enquanto o TNF-R-2 é preferencialmente expresso no sistema imune sendo altamente regulado.

O gene do TNF está localizado dentro da região altamente polimórfica de Classe III do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), no cromossomo 6p21, entre os genes da linfotóxina  $\alpha$  e linfotóxina  $\beta$ .

Existem muitos polimorfismos no gene do TNF. Atualmente seis microsátélites polimórficos foram descritos; TNF a-f. TNF a, b, d são multialélicos e altamente polimórficos, TNFc e TNFe são marcadores microsátélites bialélicos e trialélicos respectivamente, e o TNFf representa o sexto microsátélite à montante do gene da linfotóxina  $\beta$ , correspondendo a uma repetição de dinucleotídeos (CA) com dez alelos, altamente polimórfica, encontrada na população nipônica (UDALOVA *et al.*, 1993; TSUKAMOTO *et al.*, 1998; HAJEER&HUTCHINSON, 2001). Polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) foram descritos na região promotora nas posições (relacionadas ao sítio de início da transcrição) -1031T/C, -863C/A, -857C/A, -851C/T, -419G/C, -376G/A, -308G/A, -238C/A, -163G/A e -49G/A. Ainda podem ser encontrada uma inserção de uma citosina na posição +70 no primeiro exon, uma substituição G→A na posição +488 no primeiro intron e a deleção de uma guanina na posição +691 no primeiro intron do gene do TNF $\alpha$ .

O polimorfismo bialélico da posição -308 envolve a substituição de uma guanina por uma adenosina no alelo denominado TNF2 (WILSON *et al.*, 1993). Neste estudo de WILSON *et al.*, 1993, o alelo TNF2 apresentou forte associação com os alelos HLA A1, B8 e D3. WILSON *et al.*, 1997, descreveram que o alelo TNF2 é um ativador transcricional muito mais forte que o alelo comum.

Foi demonstrada a importância deste polimorfismo genético, representado pela presença do alelo A, na suscetibilidade a doença coronariana em pacientes com diabetes tipo 2 (VENDRELL *et al.*, 2003). O alelo TNF2 tem sido associado

com um aumento de quatro vezes no risco de desenvolver comprometimento cerebral devido à malária e sete vezes no risco de desenvolver conseqüências neurológicas sérias (MCGUIRE *et al.*, 1994). Foi descrita a associação da presença do alelo -308 A com doença celíaca, deficiência seletiva de IgA (CATALDO *et al.*, 2003) e leishmaniose mucocutânea (CABRERA *et al.*, 1995). Foram também reportados na infecção pelo vírus da hepatite B e pelo vírus da hepatite C, onde o alelo -238A tem sido associado com o desenvolvimento de hepatite crônica enquanto isto não ocorre com o alelo -308A, em ambos os casos (HOHLER, KRUGER, GERKEN, SCHNEIDER, MEYER ZUM BUSCHENFELDE *et al.*, 1998; HOHLER, KRUGER, GERKEN, SCHNEIDER, MEYER ZUM BUSCHENFELDE *et al.*, 1998).

O polimorfismo da posição -308G/A no gene do TNF- $\alpha$  tem sido o mais estudado, mas resultados divergentes são encontrados quando da correlação com determinadas patologias. Algumas explicações para o encontro dessas discrepâncias seria o polimorfismo elevado da região 5' do TNF $\alpha$ , levando a desequilíbrios de ligação com os genes HLA e com SNPs entre si, o que pode dificultar estudos do papel de um SNP isolado (HAJEER&HUTCHINSON, 2001).

As citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF, estão envolvidas na patogênese da infecção causada pelo vírus da hepatite C. YEE *et al.*, 2000, observaram que os alelos -238 A e -308 A aumentavam 3,2 e 5,1 vezes, respectivamente, o risco de desenvolvimento de cirrose em pacientes portadores de infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C. Em trabalho realizado por BITTENCOURT *et al.*, 2001, foi demonstrado que o polimorfismo da posição -308 na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  não está associado com susceptibilidade

ao desenvolvimento de hepatite autoimune em indivíduos brasileiros e sugere que relatos anteriores de associação encontrados no Reino Unido e América do Norte podem ser secundários a um desequilíbrio de ligação dos alelos do TNF- $\alpha$  com o *loci* HLA-DRB1.

### **3. Hipótese**

Indivíduos infectados pelo VHC apresentam diferenças na frequência de alelos polimórficos em genes candidatos em relação a controles não infectados.

## 4. Objetivos

### Geral

Identificar marcadores genéticos potenciais para suscetibilidade ao desenvolvimento de infecção crônica pelo vírus da hepatite C em Salvador-BA.

### Específico

- Comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas de polimorfismos nos genes das citocinas (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) entre portadores do VHC e controles sadios, utilizando a reação em cadeia da polimerase com iniciadores (*primers*) específicos para seqüências (PCR-SSP).

## **5. Materiais e Métodos**

### **5.1. Seleção de pacientes**

O grupo de estudo foi composto por uma amostra de conveniência de 128 indivíduos encaminhados ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz –CPqGM-Fiocruz/BA, no período de março de 2004 a outubro de 2004, para confirmação diagnóstica devido ao fato de todos apresentarem sorologias positivas para anticorpos anti-VHC por ELISA de terceira geração.

O grupo de indivíduos controles foi constituído de 94 doadores voluntários no Serviço de Transfusão de Sangue – STS, dos quais 11 eram do sexo feminino e 83 do sexo masculino, com a idade variando de 18 a 54 anos. Os doadores foram entrevistados no momento da doação no banco de sangue e atenderam aos pré-requisitos estabelecidos pela portaria de número 1.376 do Ministério da Saúde (SILVA, 2003).

A distribuição de freqüências dos polimorfismos do grupo de controles foi objeto de estudo em trabalho anterior realizado no laboratório de Imunogenética e Transplante de Órgãos no Hospital Universitário Professor Edgar Santos da UFBA, e resultou em trabalho de Dissertação de mestrado (SILVA, 2003).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Foi critério de inclusão a autorização formal com assinatura do



termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos do estudo indivíduos com suspeita de coinfeção por outros vírus, como VHB, HIV e HTLV.

## **5.2. Coleta de sangue**

Foram coletados de cada indivíduo dois tubos de sangue, um de 10 mL e outro de 5 mL, sem anticoagulante e com anticoagulante – EDTA, respectivamente. Dentro de duas horas depois da punção venosa todas as amostras de soro foram aliquotadas e conservadas imediatamente a -20°C, até o momento do uso. As alíquotas não foram descongeladas mais do que uma vez para evitar degradação do RNA. Com o soro foram realizadas detecção e genotipagem do VHC-RNA. O tubo com anticoagulante foi destinado à extração do DNA genômico para realização dos ensaios de detecção de polimorfismos nos genes de citocinas - Sistema One Lambda® (PCR-SSP). O DNA genômico foi extraído no LPBM de acordo com as instruções do fabricante do Kit QiAmp Mini® (Qiagen nc., Valencia, CA, USA).

## **5.3. Diagnóstico Molecular do VHC**

A extração e a genotipagem do VHC- RNA foram realizadas de acordo com metodologias anteriormente descritas (CHOMCZYNSKI&SACCHI, 1987; DAVIDSON *et al.*, 1995).

#### **5.4. Extração de DNA genômico**

O sangue coletado em EDTA foi centrifugado para separação da camada rica em leucócitos e, posteriormente, o DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico de acordo com as instruções do Kit QiAmp DNA Mini® (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA). As amostras de DNA foram ressuspensas em 100µL de dH<sub>2</sub>O e suas concentrações e purezas determinadas pela leitura das densidades ópticas a 260 e 280 nm, sendo as amostras posteriormente congeladas a -70°C.

#### **5.5. Genotipagem de citocinas (TGF-β1, IFN-γ, IL-6, IL-10 e TNF-α)**

Foi utilizado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda Incorporation - "Cytokine Genotyping Tray". Cada kit contém 16 tubos que correspondem a um tubo controle negativo e 15 tubos com dois pares de iniciadores: um par com seqüências específicas que amplificam seletivamente regiões reguladoras polimórficas dentro de genes que codificam TNF-α (-308G/A), TGF-β1 (10C/T, 25C/G), IL-10 (-1082A/G, -819T/C, -592A/C), IL-6 (-174C/G) e IFN-γ (874T/A); o segundo par de iniciadores amplifica uma seqüência controle.

O controle negativo e os tubos com os dois pares de iniciadores foram dispensados em microplacas de PCR com 96 tubos (Axygen Scientific, Union City,

CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante (One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

A mistura para as reações de PCR (*Mix*) foi preparada conforme as instruções do fabricante: 140  $\mu\text{L}$  de D-Mix (solução fornecida pelo fabricante, contendo dNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Tris.HCl), aos quais foram adicionados cerca de 1,9  $\mu\text{g}$  de DNA teste e 5UI de Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). Após misturar os reagentes com auxílio de um agitador de tubos, 8  $\mu\text{L}$  do *Mix* foi distribuído em cada um dos tubos, exceto no tubo controle negativo, ao qual tinha sido adicionado 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{dH}_2\text{O}$  e 7  $\mu\text{L}$  do *Mix* sem o DNA teste. Os tubos foram, então, selados com filme termo-resistente (Axygen Scientific, Union City, CA, USA) e colocados no termociclador (Perkin Elmer 9700), o qual foi previamente programado com os seguintes parâmetros: um ciclo de 96°C por 130 segundos seguidos de 63°C por 60 segundos; nove ciclos de 96°C por 10 segundos e 63°C por 60 segundos; vinte ciclos de 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos; e o ciclo final de 4°C.

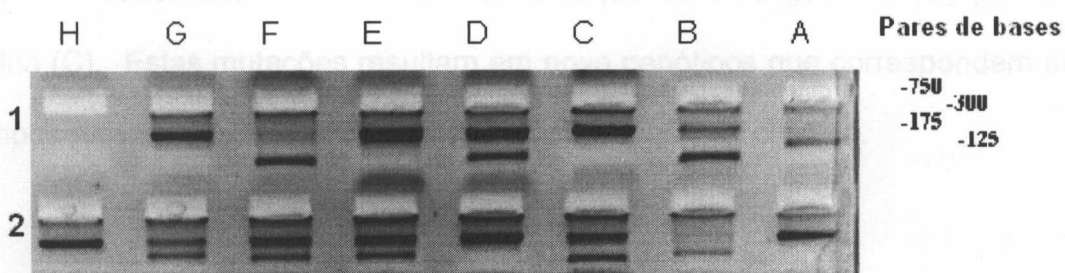
Depois da PCR, os produtos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Gibco BRL, Gaithersburg, USA ) e 30 mL de tampão TBE 1X (Tris-Borato 89mM; EDTA 2mM pH 8.0) e 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio. A cuba de eletroforese utilizada foi desenvolvida pela One Lambda (Micro SSP Gel System) de forma a permitir a análise concomitante de 96 produtos de PCR em

um curto tempo de migração; assim, em cada gel, foram analisados os resultados de PCR de seis diferentes amostras de DNA (16 reações para cada amostra). O gel foi recoberto com 10,0 mL de TBE 1X contendo 0,05 µg/mL de brometo de etídio e todo conteúdo de cada reação de PCR (10 µL) foi transferido para o poço correspondente. A corrida eletroforética foi então realizada a 120-130V (~30 mA) durante 4 a 5 minutos, ou até que o corante (vermelho de fenol) migrasse cerca de dois terços da distância entre duas linhas de poços no gel.

A interpretação dos resultados de PCR-SSP é baseada na presença ou ausência de um fragmento de DNA específico amplificado. Desde que a amplificação durante a PCR pode ser afetada por vários fatores (erro de pipetagem, baixa qualidade do DNA, presença de inibidores, etc.) um par de iniciadores-controle é incluído em cada reação de PCR. O par de iniciadores-controle amplifica uma região conservada do gene da β-globina humana, a qual está presente em todas as amostras de DNA humano e é usado como controle positivo da PCR. Na presença de uma banda positiva de tipagem (amplificação de uma seqüência específica de um alelo da citocina), o produto dos iniciadores-controle pode ser mais fraco ou ausente devido à diferença na concentração e temperatura de hibridização entre o par de iniciadores específicos e o par de iniciadores do controle interno. Os fragmentos de DNA amplificados do par de iniciadores específicos da citocina são menores do que o produto do par de iniciadores do controle interno, mas maiores que a banda do par de iniciadores quando não incorporados. Desta forma a reação positiva para um alelo ou grupo de alelos de citocina específico foi visualizada no gel como um produto de DNA

amplificado entre a banda produto do controle interno e a banda de iniciadores não incorporados.

Após a eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados usando luz ultravioleta e fotografados com auxílio de um transluminador, conforme figura 1. Os resultados foram interpretados usando mapas das placas de genotipagem de citocinas fornecidas pelo fabricante do kit de PCR (anexo).



IFN- $\gamma$

Foi realizada a amplificação de uma região de 250 pb no intron 1 do gene, na qual

Figura 1 - Imagem de gel de agarose a 2,5% mostrando a genotipagem de um indivíduo: *TNF- $\alpha$*  G/G (1: G-F); *TGF- $\beta$ 1* C/C G/G (1:E-B); *IL-10* ACC/ATA (1:A, 2: H-E); *IL-6* G/G (2:D-C); *IFN- $\gamma$*  T/T (2:B-A); controle negativo (1:H) .

citocina

## **5.6. Região amplificada**

Foram analisadas mutações de único nucleotídeo em cinco diferentes genes de citocinas (tabela 1):

### **TGF- $\beta$ 1**

Foi realizada a amplificação de duas regiões, uma de 175 pb no códon 10 do gene, na qual há substituição de uma timina (T) por uma citosina (C), e outra de 125 pb no códon 25, onde ocorre a substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C). Estas mutações resultam em nove genótipos que correspondem aos fenótipos previstos: alto, intermediário e baixo produtor da citocina.

### **IFN- $\gamma$**

Foi realizada a amplificação de uma região de 250 pb no intron 1 do gene, na qual pode ocorrer a substituição de uma timina (T) por uma adenina (A) no par de bases da posição +874. São descritos três possíveis genótipos, que correspondem aos fenótipos previstos: alto, intermediário e baixo produtor da citocina.

## **IL-6**

Foi realizada a amplificação de um produto de 175 pb na região promotora do gene que corresponde à posição –174 identificando a substituição da citosina (C) por uma guanina (G), resultando em três possíveis genótipos, que correspondem aos fenótipos previstos: alto e baixo produtor da citocina.

## **IL-10**

Foi realizada a amplificação de dois produtos na região promotora do gene. Um de 300 pb que comporta a posição –1082 identificando a substituição da adenina (A) por uma guanina (G), e a posição –819 onde ocorre a substituição da timina (T) por citosina (C). O segundo produto amplificado consiste numa região de 250 pb repetindo a posição –819, e a posição –592 na qual há substituição de uma adenina (A) por uma citosina (C). Estas mutações resultam em três possíveis genótipos, que correspondem aos fenótipos previstos: alto, intermediário e baixo produtor da citocina.

## **TNF- $\alpha$**

Foi realizada a amplificação de um produto de 125 pb na região promotora do gene que corresponde à posição –308, identificando a substituição da adenina (A) por uma guanina (G) resultando em três possíveis genótipos, que correspondem aos fenótipos previstos: alto e baixo produtor da citocina.

Tabela 1. Características dos Polimorfismos nos Genes de Citocinas

Gene	Posição dos Polimorfismos	Alelos/Haplótipos	Genótipos/Haplótipos	Fenótipos previstos de produção das citocinas
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Região Promotora -308	A,G	A/A	Alto
			G/A	Alto
			G/G	Baixo
<i>TGF-<math>\beta</math></i>	Códons 10 (+869) 25 (+915)	T,C e C,G	T/T G/G	Alto
			T/C G/G	Alto
			T/C G/C	Intermediário
			C/C G/G	Intermediário
			T/T G/C	Intermediário
			C/C G/C	Baixo
			C/C C/C	Baixo
			T/T C/C	Baixo
T/C C/C	Baixo			
<i>IL-10</i>	Região Promotora -1082; -819 e -592	A,G; T,C e A,C/ ACC; ATA e GCC	GCC/GCC	Alto
			GCC/ACC	Intermediário
			GCC/ATA	Intermediário
			ACC/ACC	Baixo
			ACC/ATA	Baixo
			ATA/ATA	Baixo
<i>IL-6</i>	Região Promotora -174	C,G	G/G	Alto
			G/C	Alto
			C/C	Baixo
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	Intron 1 +874	T,A	T/T	Alto
			T/A	Intermediário
			A/A	Baixo

Modificado de Barrett et al. (2003)



## 5.7. Análise estatística

A frequência genotípica foi obtida com a contagem direta dos alelos identificados no PCR. A frequência alélica foi calculada pela divisão do número de alelos encontrados pelo número total de genes analisados por loco.

Para os fenótipos previstos de produção de cada citocina foram utilizados os padrões do fabricante do kit de genotipagem que seguem os descritos na literatura (TURNER, D. M. *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 1997; PRAVICA *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2001).

A comparação entre as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas entre os diferentes grupos, foi realizada utilizando o Teste do Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher, quando uma das frequências foi inferior a cinco. Foi estabelecido um nível  $\alpha$  de 5% de significância.

O programa "SAS 8.01" foi utilizado em todas as análises.

## **6. Resultados**

Neste estudo foram avaliados 128 indivíduos com infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C, sendo 34 (26,56%) do sexo feminino e 94 (73,44%) do sexo masculino. Destes indivíduos 87 (67,97%) estão infectados pelo genótipo 1, 05 (3,91%) pelo genótipo 2 e 36 (28,12%) pelo genótipo 3. A média de idade dos pacientes foi de  $45,84 \pm 10,61$  anos. Os pacientes não relataram nenhum grau de parentesco entre si.

## **Polimorfismos (códon 10T/C; códon 25G/C) do gene de TGF- $\beta$ 1**

### **Códon 10 (T/C)**

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo no códon 10 T/C do gene do TGF- $\beta$ 1 observada nos grupos de pacientes com hepatite C e de indivíduos sadios é mostrada na tabela 3. A freqüência observada do alelo T foi 0,5430 e do alelo C foi 0,4570 no grupo de pacientes com hepatite C. A análise destes dados através do teste Qui-quadrado não revelou diferença significativa entre as freqüências observadas nos dois grupos [ $p=0,2195$ ; OR=1,2664; Intervalo de confiança (0,8684 a 1,8466)].

O número de indivíduos com os genótipos TT, TC e CC no grupo de pacientes com hepatite C foi: 37, 65 e 26, respectivamente. As freqüências observadas para os genótipos TT, TC e CC foram 0,2891, 0,5078 e 0,2031 no grupo de pacientes com hepatite C. A análise estatística através do teste Qui-quadrado mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos não são significantes [ $p=0,4563$ ; OR=1,3282; Intervalo de confiança (0,6925 a 2,5476)].

As freqüências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo do gene do TGF-  $\beta$ 1 (códon 10T/C ).

(N) Frequência do alelo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	P
T	(139) 0,5430	(91) 0,4840	
C	(117) 0,4570	(97) 0,5160	0,2195
(N) Frequência do genótipo			
TT	(37) 0,2891	(21) 0,2234	0,3925 <sup>a</sup>
TC	(65) 0,5078	(49) 0,5213	0,5517 <sup>b</sup>
CC	(26) 0,2031	(24) 0,2553	0,2151 <sup>c</sup>
			0,4563 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> TT/TC; <sup>b</sup> TC/CC; <sup>c</sup> TT/CC; <sup>d</sup> TT/TC/CC.

\*(SILVA, 2003)

## **Códon 25 (G/C)**

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene do TGF- $\beta$ 1 no códon 25 (G/C) observada nos dois grupos é mostrada na tabela 4 e figuras 2 e 3. As freqüências observadas para os alelos G e C foram 0,9375 e 0,0625 no grupo de pacientes com hepatite C. A análise destes dados através do teste Qui-quadrado revelou diferença significativa entre as freqüências observadas nos dois grupos [ $p=0,0005$ ; OR=2,9618; Intervalo de confiança (1,5680 a 5,5945)].

O número de indivíduos com os genótipos GG, GC e CC, observados nos dois grupos estudados foram 113, 14 e 01 no grupo de pacientes com hepatite C , respectivamente. As freqüências genóticas observadas foram 0,8828, 0,1094 e 0,0078 no grupo de pacientes com hepatite C para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente. A análise estatística através do teste Exato de Fisher mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos são significantes ( $p=0,0004$ ). A comparação das freqüências dos genótipos GG e GC revelou que a diferença observada entre os dois grupos é significativa [ $p=0,0002$ ; OR=3,6574; Intervalo de confiança (1,8022 a 7,4221); teste Qui-quadrado].

As freqüências alélicas e genóticas do polimorfismo no gene *TGF- $\beta$ 1* (códon 25 G/C) em pacientes infectados com diferentes genótipos do vírus da hepatite C é mostrada na tabela 5, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (teste Exato de Fisher).

As freqüências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 3 - Distribuição das freqüências alélicas e genóticas para o polimorfismo do gene do TGF-  $\beta$ 1 (códon 25G/C ).

(N) Freqüência do alelo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
G	(240) 0,9375	(157)0,8351	
C	(16) 0,0625	(31)0,1649	0,0005
(N) Freqüência do genótipo			
GG	(113) 0,8828	(64) 0,6809	0,0002 <sup>a</sup>
GC	(14) 0,1094	(29) 0,3085	1,0000 <sup>b</sup>
CC	(01) 0,0078	(01) 0,0106	1,0000 <sup>c</sup>
			0,0004 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> GG/GC; <sup>b</sup> GC/CC; <sup>c</sup> GG/CC; <sup>d</sup> GG/GC/CC.

\*(SILVA, 2003)

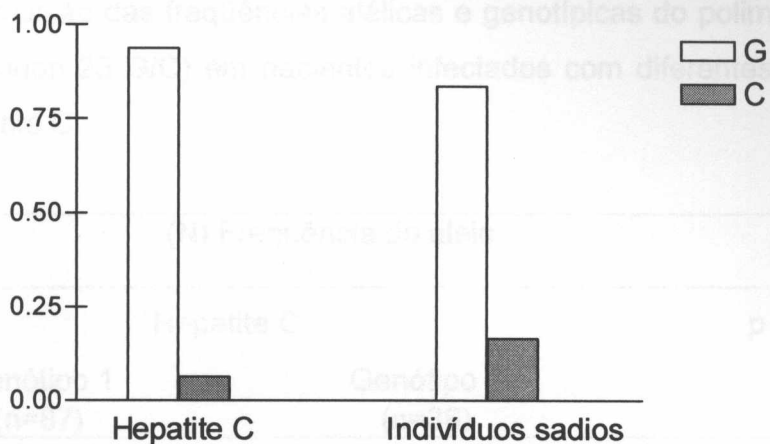


Figura 2 - Distribuição da freqüência dos alelos G e C do gene do TGF-  $\beta$ 1 (códon 25) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos saudios [p=0,0005; OR=2,9618; Intervalo de confiança (1,5680 a 5,5945); teste Qui-quadrado].

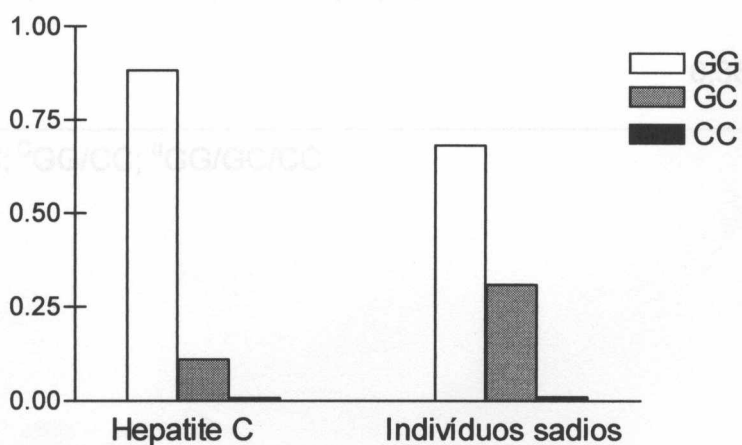


Figura 3 – Distribuição da freqüência dos genótipos observados do gene do TGF-  $\beta$ 1 (códon 25) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos saudios (p=0,0002; OR=3,6574; Intervalo de confiança (1,8022 a 7,4221); teste Qui-quadrado).

Tabela 4 – Distribuição das frequências alélicas e genóticas do polimorfismo no gene *TGF-β1* (códon 25 G/C) em pacientes infectados com diferentes genótipos do vírus da hepatite C.

(N) Frequência do alelo			
	Hepatite C		p
	Genótipo 1 (n=87)	Genótipo 3 (n=36)	
G	(164) 0,9425	(67) 0,9305	
C	(10) 0,0575	(05) 0,0695	0,7716
(N) Frequência do genótipo			
	Genótipo 1	Genótipo 3	
GG	(77) 0,8851	(32) 0,8889	0,7555 <sup>a</sup>
GC	(10) 0,1149	(03) 0,0833	0,2857 <sup>b</sup>
CC	(00) 0,0000	(01) 0,0278	0,3000 <sup>c</sup>
			0,3631 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>GG/GC; <sup>b</sup>GC/CC; <sup>c</sup>GG/CC; <sup>d</sup>GG/GC/CC .



## **Distribuição das freqüências fenotípicas**

A distribuição das freqüências dos fenótipos previstos para o polimorfismo da hepatite C e de indivíduos sadios é mostrada na tabela 4 e figura 6.

As freqüências fenotípicas inferidas de acordo com na análise dos genótipos foram 0,7344, 0,2031 e 0,0952 para o grupo de pacientes com hepatite C , para alto, intermediário e baixo produtor de TGF- $\beta$ 1, respectivamente.

A freqüência de indivíduos com fenótipo previsto de alto produtor desta citocina é significativamente maior no grupo de pacientes ( $p=0,0043$ ; teste Qui-quadrado). A comparação das freqüências dos fenótipos previstos de alto produtor e produtor intermediário demonstra que as diferenças observada entre os dois grupos é significativa [ $p=0,0015$ ; OR=2,6562; Intervalo de confiança (1,4413 a 4,8950); teste Qui-quadrado].

Tabela 5 - Distribuição das freqüências genótípicas e fenótipos previstos para o polimorfismo do gene do TGF- $\beta$ 1 (códon 10T/C; códon 25G/C ).

(N) Freqüência do genótipo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
T/T G/G <sup>1</sup>	(37) 0,2891	(18) 0,1915	
T/C G/G <sup>1</sup>	(57) 0,4453	(31) 0,3298	
T/C G/C <sup>2</sup>	(07) 0,0547	(18) 0,1915	
C/C G/G <sup>2</sup>	(19) 0,1484	(15) 0,1596	
T/T G/C <sup>2</sup>	(0) 0,0000	(03) 0,0318	
C/C G/C <sup>3</sup>	(07) 0,0547	(08) 0,0851	
C/C C/C <sup>3</sup>	(0) 0,0000	(01) 0,0105	
T/T C/C <sup>3</sup>	(0) 0,0000	(0) 0,0000	
T/C C/C <sup>3</sup>	(01) 0,0078	(0) 0,0000	
Freqüências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(94) 0,7344	(49) 0,5213	0,0015 <sup>a</sup>
Intermediário	(26) 0,2031	(36) 0,3830	0,7055 <sup>b</sup>
Baixo produtor	(08) 0,0625	(09) 0,0957	0,1300 <sup>c</sup>
			0,0043 <sup>d</sup>

<sup>1</sup> Alto produtor; <sup>2</sup> Intermediário; <sup>3</sup> Baixo produtor

<sup>a</sup> Alto produtor/Intermediário; <sup>b</sup> Intermediário/Baixo produtor

<sup>c</sup> Alto produtor/ Baixo produtor; <sup>d</sup> Alto produtor/Intermediário/Baixo produtor.

\*(SILVA, 2003)

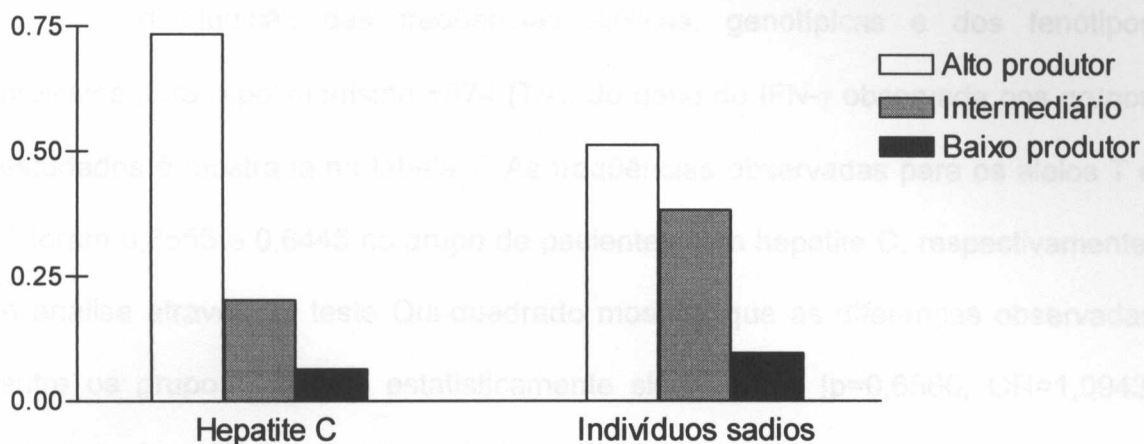


Figura 4 - Distribuição da freqüência dos fenótipos previstos do gene do TGF- $\beta$ 1 (códon 10 e códon 25) em pacientes com hepatite C e em grupo de indivíduos saudios [p=0,0015; OR=2,6562; Intervalo de confiança (1,4413 a 4,8950); teste Qui-quadrado].

mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos não são significativas (p=0,3049; OR=1,9606; Intervalo de confiança (0,8109 a 4,7412); teste Qui-quadrado).

As freqüências dos fenótipos previstos foram 0,1563, 0,1984 e 0,4453 para o grupo de pacientes com hepatite C, para altos, intermediários e baixos produtores de IFN- $\gamma$ , respectivamente. A diferença observada entre os grupos não é estatisticamente significativa (p=0,3049; OR=1,9606; Intervalo de confiança (0,8109 a 4,7412); teste Qui-quadrado).

As freqüências observadas apresentam distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

### **Polimorfismo +874T/A do gene do IFN- $\gamma$**

A distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo +874 (T/A) do gene do IFN- $\gamma$  observada nos grupos estudados é mostrada na tabela 7. As frequências observadas para os alelos T e A foram 0,3555 e 0,6445 no grupo de pacientes com hepatite C, respectivamente. A análise através do teste Qui-quadrado mostrou que as diferenças observadas entre os grupos não são estatisticamente significantes [p=0,6560; OR=1,0943; Intervalo de confiança (0,7361 a 1,6267)].

As frequências de indivíduos com os genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 20, 51 e 57 no grupo de pacientes com hepatite C. As frequências observadas dos genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 0,1563, 0,3984 e 0,4453 em pacientes com hepatite C. A análise estatística mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos não são significantes [p=0,3049; OR=1,9608; Intervalo de confiança (0,8109 a 4,7412); teste Qui-quadrado].

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,1563, 0,3984 e 0,4453 para o grupo de pacientes com hepatite C, para altos, intermediários e baixos produtores de IFN- $\gamma$ , respectivamente. A diferença observada entre os grupos não é estatisticamente significativa [p=0,3049; OR=1,9608; Intervalo de confiança (0,8109 a 4,7412); teste Qui-quadrado].

As frequências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 6 - Distribuição das freqüências alélicas, genóticas e fenótipos previstos para o polimorfismo +874 T/A do gene do IFN- $\gamma$ .

(N) Freqüência do alelo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
T	(91)0,3555	(63)0,3350	
A	(165)0,6445	(125)0,6650	0,6560
(N) Freqüência do genótipo			
TT	(20) 0,1563	(09) 0,0957	0,1313 <sup>a</sup>
TA	(51) 0,3984	(45) 0,4787	0,4302 <sup>b</sup>
AA	(57) 0,4453	(40) 0,4256	0,3227 <sup>c</sup>
			0,3049 <sup>d</sup>
Freqüências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(20) 0,1563	(09) 0,0957	0,1313 <sup>a</sup>
Intermediário	(51) 0,3984	(45) 0,4787	0,4302 <sup>b</sup>
Baixo Produtor	(57) 0,4453	(40) 0,4256	0,3227 <sup>c</sup>
			0,3049 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> TT/TA (Alto produtor/Intermediário);

<sup>b</sup> TA/AA (Intermediário/Baixo produtor);

<sup>c</sup> TT/AA (Alto/Baixo produtor);

<sup>d</sup> TT/TA/AA (Alto produtor/Intermediário/Baixo Produtor).

\*(SILVA, 2003)

## **Polimorfismo -174G/C do gene da IL-6**

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo - 174G/C do gene da IL-6 observada nos diferentes grupos estudados é mostrada na tabela 8. As freqüências observadas para os alelos G e C foram, respectivamente, 0,7930 e 0,2070 no grupo de pacientes com hepatite C. A análise através do teste Qui-quadrado mostrou que as diferenças observadas entre as freqüências alélicas dos grupos estudados não são estatisticamente significantes [ $p=0,8994$ ;  $OR=0,9703$ ; Intervalo de confiança (0,6083 a 1,5479)].

As freqüências absolutas de indivíduos com os genótipos GG, GC e CC observadas nos grupos foram, respectivamente, 80, 43 e 05 no grupo de pacientes com hepatite C. As freqüências genóticas observadas nos dois grupos foram 0,6250, 0,3359 e 0,0391 em pacientes com hepatite C, para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente. As diferenças observadas entre os dois grupos não são estatisticamente significantes [ $p=0,9618$ ;  $OR=0,9302$ ; Intervalo de confiança (0,5240 a 1,6514) teste Qui-quadrado].

As freqüências dos fenótipos previstos foram 0,9609 e 0,0391 para o grupo de pacientes com hepatite C, para altos e baixos produtores de IL-6, respectivamente. As diferenças observadas entre os dois grupos não são estatisticamente significantes [ $p=1,0000$ ;  $OR=1,0933$ ; Intervalo de confiança (0,2855 a 4,1864); teste Exato de Fisher].

As freqüências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 7 - Distribuição das freqüências alélicas, genóticas e fenótipos previstos para o polimorfismo -174 G/C do gene da IL-6.

(N) Freqüência do alelo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
G	(203)0,7930	(150)0,7979	
C	(53)0,2070	(38)0,2021	0,8994
(N) Freqüência do genótipo			
GG	(80) 0,6250	(60) 0,6383	0,8049 <sup>a</sup>
GC	(43) 0,3359	(30) 0,3191	1,0000 <sup>b</sup>
CC	(05) 0,0391	(04) 0,0426	1,0000 <sup>c</sup>
			0,9618 <sup>d</sup>
Freqüências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(123) 0,9609	(90) 0,9574	
Baixo produtor	(05) 0,0391	(04) 0,0426	1,0000

<sup>a</sup> GG/GC; <sup>b</sup> GC/CC; <sup>c</sup> GG/CC; <sup>d</sup> GG/GC/CC.

\*(SILVA, 2003)

## **Polimorfismos (-1082G/A; -819C/T; -592C/A) do gene da IL-10**

As combinações possíveis dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. As frequências absolutas de indivíduos com os genótipos possíveis GCC/GCC, GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA foram, respectivamente, 17, 22, 33, 11, 27 e 18 no grupo de indivíduos com hepatite C. Para a análise estatística, os genótipos foram agrupados de acordo com os fenótipos previstos. Assim, foram agrupadas as frequências correspondentes aos genótipos GCC/ACC e GCC/ATA (produtores intermediários) e as frequências correspondentes aos genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA (baixos produtores). O genótipo GCC/GCC corresponde aos altos produtores. A análise mostrou não haver diferenças significantes entre os fenótipos previstos de alto, intermediário e baixo produtor nos grupos comparados [ $p=0,8833$ ;  $OR=1,0224$ ; Intervalo de confiança (0,4480 a 2,3330); teste Qui-quadrado]. Os dados estão representados na tabela 9.

Considerando-se os polimorfismos em cada posição separadamente foram observadas as frequências alélicas e genotípicas a seguir: na posição -1082G/A, no grupo de pacientes com hepatite C, para os genótipos GG, GA e AA e alelos G e A foram 0,1328, 0,4298 e 0,4374 e 0,3476 e 0,6524, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas frequências genotípicas para o polimorfismo -1082G/A ( $p=0,8833$ ; teste Qui-quadrado), nem na análise das frequências dos alelos G e A ( $p=0,6737$ ; teste Qui-quadrado).



Na posição -819C/T, as freqüências no grupo de pacientes com hepatite C, para os genótipos CC, CT e TT e alelos C e T foram 0,3907, 0,4687 e 0,1406 e 0,6250 e 0,3750, respectivamente. Na posição -592C/A, as freqüências no grupo de pacientes com hepatite C, para os genótipos CC, CA e AA e alelos C e A foram 0,3907, 0,4687 e 0,1406 e 0,6250 e 0,3750, respectivamente. A análise das freqüências alélicas nas posições -819 e -592 nos dois grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,7742$ ; teste Qui-quadrado), e nem a análise das freqüências genotípicas ( $p=0,7020$ ; teste Qui-quadrado).

As freqüências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 8 – Distribuição das freqüências alélicas, genóticas e fenótipos previstos para os polimorfismos –1082G/A, -819C/T e –592C/A do gene da IL-10.

(N) Freqüência do alélica			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
-1082G	(89) 0,3476	(69) 0,3670	
-1082A	(167) 0,6524	(119) 0,6330	0,6737
-819 C	(160) 0,6250	(120) 0,6383	
-819 T	(96) 0,3750	(68) 0,3617	0,7742
-592 C	(160) 0,6250	(120) 0,6383	
-592 A	(96) 0,3750	(68) 0,3617	0,7742
(N) Freqüência do genótipo			
GCC/GCC	(17) 0,1328	(13) 0,1383	
GCC/ACC	(22) 0,1720	(17) 0,1809	
GCC/ATA	(33) 0,2578	(26) 0,2766	
ACC/ACC	(11) 0,0859	(06) 0,0638	
ACC/ATA	(27) 0,2109	(22) 0,2340	
ATA/ATA	(18) 0,1406	(10) 0,1064	
Freqüências dos fenótipos previstos			
Alto produtor	(17) 0,1328	(13) 0,1383	0,9581 <sup>a</sup>
Intermediário	(55) 0,4298	(43) 0,4575	0,6283 <sup>b</sup>
Baixo produtor	(56) 0,4374	(38) 0,4042	0,7781 <sup>c</sup>
			0,8833 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Alto produtor/Intermediário; <sup>b</sup> Intermediário/Baixo produtor;

<sup>c</sup> Alto/Baixo produtor; <sup>d</sup> Alto produtor/Intermediário/Baixo produtor.

\*(SILVA, 2003)

### **Polimorfismo no gene do TNF – $\alpha$ na posição -308**

A distribuição das freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo no gene do TNF-  $\alpha$  na posição -308G/A, nos grupos de pacientes com hepatite C e de indivíduos sadios, são mostradas na tabela 10. As freqüências observadas para os alelos G e A foram, respectivamente, de 0,8477 e 0,1523 no grupo de pacientes com hepatite C. As diferenças entre as freqüências alélicas nos dois grupos não são estatisticamente significantes [p=0,2158; OR=0,6997; Intervalo de confiança (0,3966 a 1,2342); teste Qui-quadrado].

As freqüências absolutas de indivíduos com os genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 94, 29 e 05 no grupo de pacientes com hepatite C. As freqüências observadas dos genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 0,7344, 0,2265 e 0,0391 em pacientes com hepatite C. A análise estatística mostra que as diferenças observadas entre os dois grupos não são significantes [p=0,1637; OR=0,9325; Intervalo de confiança (0,4920 a 1,7674); teste Exato de Fisher].

As freqüências dos fenótipos previstos de alto e baixo produtores são 0,2656 e 0,7344 no grupo de pacientes com hepatite C. A comparação das freqüências entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa [p=0,3877; OR=0,7575; Intervalo de confiança (0,4029 a 1,4241); teste Qui-quadrado].

As freqüências observadas apresentaram distribuição semelhante àquelas esperadas no equilíbrio de Hardy-Weinberg (dados não mostrados).

Tabela 9 - Distribuição das freqüências alélicas, genóticas e fenótipos previstos para o polimorfismo -308 G/A do gene do TNF-  $\alpha$  .

(N) Freqüência do alelo			
	Hepatite C (n=128)	Indivíduos sadios* (n=94)	p
G	(217)0,8477	(167)0,7776	
A	(39)0,1523	(21)0,2234	0,2158
(N) Freqüência do genótipo			
GG	(94) 0,7344	(73) 0,7776	0,8302 <sup>a</sup>
GA	(29) 0,2265	(21) 0,2234	0,1443 <sup>b</sup>
AA	(5) 0,0391	(0) 0,0000	0,0732 <sup>c</sup>
			0,1637 <sup>d</sup>
Freqüências dos fenótipos previstos			
Baixo produtor	(94) 0,7344	(73) 0,7776	
Alto produtor	(34) 0,2656	(20) 0,2234	0,3887

<sup>a</sup> GG/GA; <sup>b</sup> GA/AA; <sup>c</sup> GG/AA; <sup>d</sup> GG/GA/AA.

\*(SILVA, 2003)

## 7. Discussão

A infecção pelo VHC além de apresentar uma prevalência elevada, apresenta alta morbidade e mortalidade devido ao desenvolvimento de fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular.

A história natural da infecção pelo VHC é altamente variável no que se refere a fatores inerentes do próprio vírus (carga viral, genótipo, quasiespécies), fatores relacionados ao hospedeiro (idade, sexo, etnia, resposta imune, determinantes genéticos) e fatores externos (consumo de álcool, drogas), que representam fatores de risco independentes.

A epidemiologia genética progrediu para análise de doenças complexas, ou seja, aquelas que são influenciadas por um grande número de fatores, a maioria das quais de difícil identificação.

Fatores genéticos do hospedeiro podem ser determinantes no curso natural das infecções virais. Na última década, alguns genes e suas variações alélicas foram apontados como candidatos potenciais à determinação da história natural de doenças hepáticas crônicas. Nestes estudos, a seleção dos genes investigados foi principalmente baseada na plausibilidade biológica (BATALLER *et al.*, 2003).

Diversos são os trabalhos na literatura científica que buscam demonstrar a importância dos polimorfismos em genes de citocinas como marcadores genéticos potenciais na infecção pelo vírus da hepatite C. Em nosso meio, ainda não haviam sido estudadas as frequências de polimorfismos em genes de citocinas em portadores do VHC, sendo de fundamental importância o desenvolvimento de um

banco de dados para investigações a respeito da influência desses polimorfismos na resposta imune e susceptibilidade a essa infecção.

No presente trabalho foi realizada uma comparação entre as freqüências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos de polimorfismos nos genes de citocinas (fator de transformação do crescimento  $\beta 1$  [TGF- $\beta 1$ ], interferon  $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ], interleucina 6 [IL-6], interleucina 10 [IL-10] e fator de necrose tumoral  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ]) em uma amostra de indivíduos portadores de infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C e doadores de sangue na população da cidade de Salvador - Bahia.

Foi observada diferença estatisticamente significativa entre as freqüências dos alelos G e C para o polimorfismo do códon 25 do gene do TGF- $\beta 1$ , quando comparados indivíduos portadores de VHC com indivíduos saudáveis, com uma maior freqüência do alelo G ( $p=0,0005$ ) Também foi observada diferença estatisticamente significativa entre os genótipos GG e GC ( $p=0,0002$ ) em relação ao CC.

A combinação do polimorfismos no códon 10 e no códon 25 determinam nove genótipos diferentes, distribuídos em três fenótipos previstos: alto produtor, produtor intermediário e baixo produtor de TGF- $\beta 1$ (HOFFMANN *et al.*, 2001).

Em relação à distribuição das freqüências dos fenótipos previstos, foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o fenótipo de alto produtor e produtor intermediário ( $p=0,0015$ ) e, também, entre o fenótipo de alto produtor comparado ao de produtor intermediário mais baixo produtor ( $p=0,0043$ ), quando comparados indivíduos portadores de VHC a indivíduos saudáveis.

KANTO *et al.*, 1997, observaram que a inibição do TGF- $\beta$  *in vitro* aumenta a atividade dos linfócitos T citotóxicos. O TGF- $\beta$ 1 possui efeitos imunossupressores e, na maioria das células, efeitos antiproliferativos (SCHUPPAN *et al.*, 2003). Teoricamente, é possível que a supressão da resposta imunológica pelo TGF- $\beta$ 1, em indivíduos que possuam o fenótipo previsto de alto produtor, seja mais pronunciada e que esta modulação aumente a susceptibilidade ou a persistência do vírus. O TGF- $\beta$ 1 é conhecido como supressor da atividade antiviral do interferon, o que talvez favoreça a replicação e persistência viral. É importante discutir também o papel das células T reguladoras na persistência a agentes infecciosos. Foi descrito que as T<sub>regs</sub> secretam TGF- $\beta$  e que a utilização de anti-TGF- $\beta$  *in vitro*, foi capaz de anular o efeito supressor das células T<sub>regs</sub> (CABRERA *et al.*, 2004). O TGF- $\beta$ , geralmente produzido em altas concentrações em infecções crônicas, é descrito como um importante fator para sobrevivência e função das células T<sub>regs</sub> (GREEN *et al.*, 2003). Também foi observado que células T CD4<sup>+</sup> podem tornar-se células supressoras quando expostas a altas concentrações de TGF- $\beta$ , além da ativação e retenção que esta citocina pode exercer sobre as células T<sub>regs</sub> (CHEN *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2004; BELKAID&ROUSE, 2005). Pode-se especular que indivíduos que possuam o fenótipo previsto de alto produtor de TGF- $\beta$ , apresentem maior predisposição a persistência do VHC, por favorecerem uma maior indução das células T<sub>regs</sub>, bem como através desta maior produção, favorecerem a sua ação supressora sobre as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Esta hipótese está de acordo com nossos achados que demonstram diferenças significantes nas frequências dos genótipos do TGF-

$\beta 1$  entre pacientes cronicamente infectados pelo VHC e indivíduos saudáveis. Estudos futuros são necessários para avaliar melhor esta hipótese.

Polimorfismos genéticos podem explicar as diferenças encontradas entre os níveis de progressão da fibrose hepática nos indivíduos infectados pelo VHC (SCHUPPAN *et al.*, 2003). Sendo assim, é possível que variantes polimórficas do gene do TGF- $\beta 1$ , que estejam relacionadas diretamente com os níveis de produção dessa citocina, possam contribuir para o desenvolvimento de fibrose hepática. Entretanto, alguns estudos demonstram resultados contraditórios quanto à influência dos polimorfismos no gene do TGF- $\beta 1$  na indução da fibrogênese hepática pelo VHC. Este fato pode refletir a heterogeneidade das populações estudadas ou outros fatores de riscos independentes e desconhecidos. Trabalhos anteriores observaram que indivíduos caucasianos heterozigotos para o polimorfismo no códon 25 desenvolviam uma progressão mais rápida e grau mais elevado de fibrose hepática (GEWALTIG *et al.*, 2002; TAG *et al.*, 2003). No trabalho desenvolvido por GEWALTIG *et al.*, 2002, também foram detectados níveis plasmáticos mais elevados do TGF- $\beta 1$  total em pacientes que apresentavam fibrose e carregavam o genótipo Arg25Arg. WANG *et al.*, 2005, observaram que pacientes caucasianos portadores de VHC, que possuíam ao menos uma prolina no códon 10, apresentavam risco de desenvolver fibrose hepática mais pronunciada. Nesse mesmo trabalho, o estágio da fibrose foi correlacionado com a presença de uma prolina no códon 25.

Um outro trabalho demonstrou que indivíduos com o genótipo alto produtor (Arg25Arg) eram mais propensos ao desenvolvimento de fibrose hepática progressiva quando comparados com indivíduos que apresentavam o genótipo



baixo produtor (POWELL *et al.*, 2000). BEN-ARI *et al.*, 2004, observaram que o fenótipo previsto de alto produtor do TGF- $\beta$ 1 correlaciona-se com o escore de fibrose em pacientes não submetidos a terapia antiviral e com a expressão *in situ* da citocina em pacientes que apresentaram recorrência da infecção pelo VHC após transplante hepático.

Desde que não existem explicações diretas de como as substituições de aminoácidos nos códons 10 e 25 contribuem para fibrogênese hepática, estudos adicionais serão necessários para determinar como estas alterações contribuem na modulação das atividades biológicas do TGF- $\beta$ 1. Será necessário avaliar as manifestações fenotípicas do polimorfismo no códon 25 do gene do TGF- $\beta$ 1 no fígado de pacientes cronicamente infectados pelo VHC. Devido ao fato dos níveis séricos de TGF- $\beta$ 1 muitas vezes não serem representativos, seria necessária a análise do RNAm do TGF- $\beta$ 1 e a expressão da proteína no tecido hepático dos pacientes com esses polimorfismos genéticos específicos.

Foi demonstrado por CRIBIER *et al.*, 1998, que níveis mais baixos de IFN- $\gamma$  eram encontrados em indivíduos infectados pelo VHC, quando comparados aos controles sadios. O IFN- $\gamma$  como uma citocina que estimula o processamento e a apresentação de antígenos virais pelas moléculas do MHC classe I. Além disso, o IFN- $\gamma$  pode inibir a replicação dos vírus em células infectadas, levando a redução da carga viral.

Em nosso estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas do polimorfismo na posição +874 do gene do IFN- $\gamma$  entre o grupo de pacientes

infectados pelo VHC e os controles sadios. TAMBUR *et al.*, 2001, não observaram associação entre este polimorfismo e a recorrência da infecção pelo VHC em transplantados hepáticos. Apesar disso, foi observada uma tendência de produzir níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  entre os pacientes que não apresentaram recorrência da infecção. Em estudo conduzido por BARRET *et al.*, 2003, também não foi possível descrever associação do polimorfismo na posição +874 do gene do IFN- $\gamma$  com persistência ou eliminação do VHC.

Conforme os dados obtidos no nosso estudo, não foi possível demonstrar associação entre o polimorfismo -174 G/C do gene da IL-6 e infecção causada pelo VHC. O polimorfismo na posição -174 tem sido associado com susceptibilidade a um amplo espectro de doenças, como por exemplo a artrite crônica juvenil (FISHMAN *et al.*, 1998). OYANAGI *et al.*, 1999, observaram níveis elevados da IL-6 no soro de pacientes portadores da infecção pelo VHC, e a produção hepática, examinada através de hibridização *in situ* e imunohistoquímica, encontrava-se localizada nas células de Kupffer do parênquima hepático e macrófagos localizados no trato portal. Relatos experimentais descrevem o alelo -174C como um ativador transcricional mais fraco que o alelo comum -174G, levando conseqüentemente a níveis plasmáticos mais baixos da IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998). Um estudo desenvolvido na Irlanda demonstrou que o genótipo CC na posição -174 estava associado com a eliminação do VHC (BARRETT *et al.*, 2003). Já em estudo conduzido em pacientes ingleses, a presença deste alelo não pode ser associado com a eliminação viral (MINTON *et al.*, 2005). TAMBUR *et al.*, 2001, observaram que

entre transplantados hepáticos que não sofreram rejeição aguda, o fenótipo previsto de baixo produtor apresentava-se mais prevalente quando comparados aos controles sadios. Da mesma forma, MAS *et al.*, 2004, observaram que a presença do genótipo alto produtor era mais freqüente em pacientes transplantados hepáticos com episódios de rejeição aguda.

No presente trabalho, não foram demonstradas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de pacientes com hepatite C e o grupo de indivíduos sadios em relação ao polimorfismo no gene do IL-10.

Em trabalho realizado por TAMBUR *et al.*, 2001, foi observada uma tendência aos fenótipos previstos de altos produtores da IL-10 entre os indivíduos que não apresentaram rejeição após o transplante hepático. Nesse mesmo estudo foi observada uma tendência aos fenótipos previstos de baixo produtores entre os indivíduos transplantados que não apresentaram recorrência da infecção pelo VHC. MAS *et al.*, 2004, publicaram dados concordantes que descreviam associação dos fenótipos baixos produtores com indivíduos que apresentaram episódios de rejeição aguda, mas não conseguiram demonstrar associação entre os genótipos da IL-10 e a recorrência do VHC após transplante.

A IL-10 possui a capacidade de inibir a expressão do MHC em células apresentadoras de antígenos. Sendo assim, os pacientes que possuem uma tendência a produzir uma menor quantidade de IL-10, podem apresentar uma habilidade maior de apresentar antígenos, como peptídeos virais, no contexto das moléculas do MHC, favorecendo a eliminação da infecção pelo VHC.

EDWARDS-SMITH *et al.*, 1999, descreveram que pacientes infectados pelo VHC, genotipados como altos produtores de IL-10, não apresentavam resposta

sustentada ao tratamento com interferon alfa. No trabalho realizado por VIDIGAL *et al.*, 2002, essas observações não foram confirmadas, pois não foram observadas diferenças significantes entre as freqüências dos genótipos associados com o polimorfismo da IL-10 entre pacientes respondedores e não-respondedores à terapia antiviral com interferon alfa e ribavirina. Estas diferenças podem ser justificadas pelas diferenças entre os estudos em relação à terapia e os critérios de definição de paciente como respondedores. No primeiro, a avaliação dos pacientes quanto à resposta terapêutica foi realizada após 12 semanas e no segundo, após 48 semanas.

No trabalho de VIDIGAL *et al.*, 2002, foi descrita uma associação do genótipo -1082 G/G com a infecção crônica causada pelo VHC, quando comparados pacientes com controles sadios, sugerindo seu papel como marcador de suscetibilidade. KNAPP *et al.*, 2003, observaram associação do genótipo G/G na posição -1082 com infecção persistente em uma coorte de pacientes do Reino Unido. De maneira oposta, LIO *et al.*, 2003, observaram associação do genótipo G/G na posição -1082 com eliminação espontânea do vírus em pacientes italianos.

CONSTANTINI *et al.*, 2002, não observaram associação dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 com eliminação espontânea do vírus ou resposta à terapia com interferon alfa. BARRET *et al.*, 2003, analisando pacientes que eliminaram o vírus frente àqueles que desenvolveram infecção persistente, não observaram diferenças estatisticamente significantes entre os genótipos da IL-10 nos grupos estudados. Da mesma forma, MINTON *et al.*, 2005, não observaram associação do polimorfismo na posição -1082 com persistência ou eliminação do VHC.

Alguns polimorfismos na região promotora do gene do TNF- $\alpha$  têm sido associados com susceptibilidade a, ou progressão de, doenças autoimunes e infecciosas, incluindo a infecção pelo VHC, embora a significância funcional destas mutações não esteja esclarecida. No presente trabalho, não foi possível demonstrar associação do polimorfismo na posição -308 do gene do TNF- $\alpha$  com a infecção causada pelo VHC.

HOHLER *et al.*, 1998, observaram associação com susceptibilidade à infecção pelo VHC com o polimorfismo na região promotora do TNF- $\alpha$ . Nesse trabalho, duas mutações foram analisadas. Foi observada associação entre o polimorfismo na posição -238 com susceptibilidade à infecção, enquanto nenhuma associação foi demonstrada com a mutação na posição -308. VIDIGAL *et al.*, 2002, analisando os polimorfismos nas posições -376, -308, -238 e -163, não identificaram associação entre esses possíveis genótipos do TNF- $\alpha$  e a persistência à infecção pelo VHC após terapia combinada de IFN- $\alpha$  e ribavirina. BARRET *et al.*, 2003, também não observaram associação do polimorfismo na posição -308 e a infecção persistente pelo VHC. Nossos dados estão de acordo com o achado destes autores que também não encontraram correlação entre o polimorfismo na posição -308 do gene do TNF- $\alpha$  e a infecção pelo VHC.

YEE *et al.*, 2000, observaram que os alelos -238 A e -308 A aumentavam o risco de desenvolvimento de cirrose em pacientes portadores de infecção crônica causada pelo vírus da hepatite C. Entretanto, ROSEN *et al.*, 2002, não conseguiram associar os polimorfismos nas posições -238 e -308 do gene do TNF- $\alpha$  com o grau de lesão histológica no fígado e resposta à terapia antiviral.

BATHGATE *et al.*, 2000, observaram que pacientes homozigotos na posição -308, genótipo A/A, estão mais propensos à rejeição após transplante hepático. Em trabalho semelhante desenvolvido por MAS *et al.*, 2004, estudando-se as posições -238 e -308, foi demonstrado que os genótipos do TNF- $\alpha$  associados com o fenótipo previsto de alto produtor encontravam-se mais freqüentes em pacientes que apresentaram rejeição aguda após transplante hepático, comparando-os com grupo de pacientes que não apresentaram rejeição. Nesse mesmo trabalho, foi observado aumento das freqüências dos fenótipos previstos de alto produtores no grupo de indivíduos que apresentaram recorrência da infecção pelo VHC. Apesar dessas diferenças não apresentarem significância estatística, o polimorfismo na posição -238 demonstrou uma associação mais forte com recorrência quando comparado ao polimorfismo na posição -308.

De maneira contrária, TAMBUR *et al.*, 2001, analisando o polimorfismo na posição -308, não encontrou associação com rejeição ou recorrência da infecção pelo VHC em transplantados. ROSEN *et al.*, 1999, estudaram o polimorfismo em doadores e o seu papel na determinação da recorrência do VHC em transplantados hepáticos e, descreveram associação entre a recorrência da infecção nos transplantados e o presença do alelo A na posição -308 no gene do TNF- $\alpha$  dos doadores.

É importante ressaltar que muitos estudos realizados buscando encontrar marcadores de susceptibilidade ou resistência para infecção causada pelo vírus da hepatite C estabelecem comparações de indivíduos infectados cronicamente pelo VHC com indivíduos sadios. Isto pode vir a causar um problema no desenho do estudo, pois se estima que de 54 a 86% dos indivíduos considerados

controles, se expostos ao VHC, desenvolveriam infecções crônicas, enquanto os outros conseguiriam eliminar o vírus (YEE, 2004). Desta forma, idealmente deveriam ser comparados indivíduos que conseguiram eliminar o vírus com indivíduos portadores de infecções crônicas, quando se busca determinar o papel de marcadores genéticos na susceptibilidade ao VHC.

Um conceito importante é que a demonstração de uma associação com determinado alelo, não significa necessariamente que este alelo é funcionalmente responsável pela susceptibilidade ou resistência a doenças complexas como a hepatite C. As variantes alélicas pontuais encontram-se em segmentos de DNA que provavelmente contêm outros polimorfismos. Desta forma, estas variantes alélicas podem ser herdadas como haplótipos. Portanto, é pertinente considerar a possibilidade de desequilíbrio de ligação entre *loci* polimórficos, apesar da complexidade deste tipo de abordagem. Além disso, as interações entre esses genes e o meio ambiente podem contribuir significativamente para o entendimento dessas características.

É importante ressaltar que estudos de associação genética na saúde e na doença consistem de diferentes partes: a identificação de novos polimorfismos, a associação destes polimorfismos com doenças, e a compreensão dos efeitos funcionais das variantes polimórficas. Estes fatores não precisam ser analisados necessariamente ao mesmo tempo, e a importância dos estudos que abordam apenas um deste três aspectos não deve ser negligenciada. É fundamental que toda evidência neste campo seja considerada, mesmo quando associações não sejam demonstradas.

Outra observação relevante é que trabalhos realizados em populações distintas podem apresentar frequências genotípicas diferentes, devido à heterogeneidade dos grupos étnicos estudados.

É improvável que um polimorfismo em uma determinada posição de um gene represente de maneira isolada a susceptibilidade para o desenvolvimento de determinada patologia. Estes polimorfismos devem interagir com outros fatores genéticos e ambientais para determinar a susceptibilidade a determinadas patologias e as diferenças nas respostas do hospedeiro ao vírus. Interações com outros fatores genéticos, ambientais, comportamentais e do próprio vírus podem contribuir para a progressão da infecção causada pelo vírus da hepatite C. No futuro será importante o desenvolvimento de trabalhos não apenas com ajustes para variáveis de confundimento potenciais, mas com análises de interações de genes putativos com outros fatores. Os estudos dos determinantes genéticos do hospedeiro na infecção pelo VHC precisam abordar de maneira integrada além da genética molecular, a epidemiologia, a biologia funcional e a medicina clínica. Desta forma, estudos epidemiológicos apropriados serão de extrema importância para um melhor entendimento da história natural da infecção causada pelo VHC.



## 8. Conclusões

- O estudo demonstrou uma associação entre o alelo G do polimorfismo no gene do TGF- $\beta$ 1 (códon 25 – G/C) com a infecção pelo VHC, sugerindo que este seja um marcador genético potencial para susceptibilidade à infecção causada pelo VHC. Estes dados sugerem um papel do TGF- $\beta$ 1 na infecção ou persistência do VHC no hospedeiro.
- As frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos dos genes do TGF- $\beta$ 1 (códon 10 – T/C), IFN- $\gamma$  (+874T/A), IL-6 (-174G/C), IL-10 (-1082G/A, -819T/C e -592C/A) e TNF- $\alpha$  (-308G/A) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre pacientes infectados com o VHC e controles sadios.

## **9. Perspectivas futuras**

- Avaliar a associação entre o polimorfismo no gene do TGF- $\beta$ 1 e formas clínicas da hepatite C.
- Realizar estudos funcionais, verificando se há influência dos genótipos do TGF- $\beta$ 1 na produção desta citocina.
- Verificar se há relação entre os genótipos do TGF- $\beta$ 1 e o número de células T reguladoras nos pacientes estudados.
- Investigar a associação de polimorfismos nos genes que codificam TGF- $\beta$ 1, IL-13, metaloproteinases e inibidores de metaloproteinases na evolução da fibrose causada pelo VHC.
- Avaliar a influência do polimorfismo nos genes de citocinas na resposta terapêutica ao VHC.

## Referências Bibliográficas

AOKI, N. e Z. XING. Use of cytokines in infection. **Expert Opin Emerg Drugs**, v.9: 223-36, 2004.

AWAD, M., V. PRAVICA, *et al.* CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allograft fibrosis. **Hum Immunol**, v.60: 343-6, 1999.

AWAD, M. R., A. EL-GAMEL, *et al.* Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, v.66: 1014-20, 1998.

BABEL, N., G. CHEREPNEV, *et al.* Nonimmunologic complications and gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines in long-term renal transplants. **Kidney Int**, v.66: 428-32, 2004.

BARRETT, S., M. COLLINS, *et al.* Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. **J Med Virol**, v.71: 212-8, 2003.

BATALLER, R., K. E. NORTH, *et al.* Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. **Hepatology**, v.37: 493-503, 2003.

BATHGATE, A. J., V. PRAVICA, *et al.* The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in acute hepatic allograft rejection. **Transplantation**, v.69, n.7, Apr 15, p.1514-7. 2000.

BELKAID, Y., C. A. PICCIRILLO, *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420: 502-7, 2002.

BELKAID, Y. e B. T. ROUSE. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v.6: 353-60, 2005.

BELL, H., K. HELLUM, *et al.* Genotype, viral load and age as independent predictors of treatment outcome of interferon-alpha 2a treatment in patients with chronic hepatitis C. Construct group. **Scand J Infect Dis**, v.29: 17-22, 1997.

BEN-ARI, Z., O. PAPPO, *et al.* Role of cytokine gene polymorphism and hepatic transforming growth factor beta1 expression in recurrent hepatitis C after liver transplantation. **Cytokine**, v.27, n.1, Jul 7, p.7-14. 2004.

BEN-ARI, Z., E. MOR, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. **Am J Gastroenterol**, v.98: 144-50, 2003.

BENDICHO, M. T., J. C. GUEDES, *et al.* Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, IFN-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis. **Pancreas**, v.30: 333-6, 2005.

BENNET, A. M., J. A. PRINCE, *et al.* Interleukin-6 serum levels and genotypes influence the risk for myocardial infarction. **Atherosclerosis**, v.171: 359-67, 2003.

BIDWELL, J., L. KEEN, *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun**, v.1: 3-19, 1999.

BIDWELL, J., L. KEEN, *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. **Genes Immun**, v.2: 61-70, 2001.

BIDWELL, J. L., N. A. WOOD, *et al.* Human cytokine gene nucleotide sequence alignments: supplement 1. **Eur J Immunogenet**, v.26: 135-223, 1999.

BIDWELL, J. L., N. A. WOOD, *et al.* Human cytokine gene nucleotide sequence alignments, 1998. **Eur J Immunogenet**, v.25: 83-265, 1998.

BITTENCOURT, P. L., S. A. PALACIOS, *et al.* Autoimmune hepatitis in Brazilian patients is not linked to tumor necrosis factor alpha polymorphisms at position -308. **J Hepatol**, v.35, n.1, Jul, p.24-8. 2001.

BRINKMAN, B. M., T. W. HUIZINGA, *et al.* Tumour necrosis factor alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis: association with susceptibility to, or severity of, disease? **Br J Rheumatol**, v.36: 516-21, 1997.

CABRERA, M., M. A. SHAW, *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v.182: 1259-64, 1995.

CABRERA, R., Z. TU, *et al.* An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v.40: 1062-71, 2004.

CAMBIEN, F., S. RICARD, *et al.* Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v.28: 881-7, 1996.

CATALDO, F., D. LIO, *et al.* Cytokine genotyping (TNF and IL-10) in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. **Am J Gastroenterol**, v.98: 850-6, 2003.

- CHEN, W., W. JIN, *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J Exp Med**, v.198: 1875-86, 2003.
- CHO, S. M., J. KIM, *et al.* Identification of single nucleotide polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor superfamily in the Korean population. **Hum Immunol**, v.65: 710-8, 2004.
- CHOMCZYNSKI, P. e N. SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v.162: 156-9, 1987.
- CLARKE, B. Molecular virology of hepatitis C virus. **J Gen Virol**, v.78 ( Pt 10): 2397-410, 1997.
- COFFMAN, R. L. e T. R. MOSMANN. CD4+ T-cell subsets: regulation of differentiation and function. **Res Immunol**, v.142: 7-9, 1991.
- CONSTANTINI, P. K., M. WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA, *et al.* Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. **Liver**, v.22, n.5, Oct, p.404-12. 2002.
- CONTI, P., D. KEMPURAJ, *et al.* IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. **Immunol Lett**, v.86: 123-9, 2003.
- CORREA, P. A., L. M. GOMEZ, *et al.* Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. **J Rheumatol**, v.32: 219-24, 2005.
- CRAMP, M. E., P. CARUCCI, *et al.* Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. **J Hepatol**, v.29: 207-13, 1998.
- CRAMP, M. E., S. ROSSOL, *et al.* Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.118: 346-55, 2000.
- CRIBIER, B., C. SCHMITT, *et al.* Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus. **J Med Virol**, v.55, n.2, Jun, p.89-91. 1998.
- CUI, X., I. SHIMIZU, *et al.* Inhibitory effect of a soluble transforming growth factor beta type II receptor on the activation of rat hepatic stellate cells in primary culture. **J Hepatol**, v.39, n.5, Nov, p.731-7. 2003.

DAVIDSON, F., P. SIMMONDS, *et al.* Survey of major genotypes and subtypes of hepatitis C virus using RFLP of sequences amplified from the 5' non-coding region. **J Gen Virol**, v.76 ( Pt 5): 1197-204, 1995.

DELANEY, N. L., V. ESQUENAZI, *et al.* TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6, and INF-gamma alleles among African Americans and Cuban Americans. Report of the ASHI Minority Workshops: Part IV. **Hum Immunol**, v.65: 1413-9, 2004.

DEMETER, J., F. PORZSOLT, *et al.* Polymorphism of the tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin-alpha genes in chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol**, v.97: 107-12, 1997.

DIEHL, S. e M. RINCON. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Mol Immunol**, v.39: 531-6, 2002.

DRIESEL, G., D. WIRTH, *et al.* Hepatitis C virus (HCV) genotype distribution in German isolates: studies on the sequence variability in the E2 and NS5 region. **Arch Virol**, v.139: 379-88, 1994.

EDWARDS-SMITH, C. J., J. R. JONSSON, *et al.* Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, v.30: 526-30, 1999.

ESKDALE, J., G. GALLAGHER, *et al.* Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.95: 9465-70, 1998.

ESKDALE, J., D. KUBE, *et al.* Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, v.46: 120-8, 1997.

FAHLEN, L., S. READ, *et al.* T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **J Exp Med**, v.201: 737-46, 2005.

FARCI, P. e R. H. PURCELL. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Semin Liver Dis**, v.20: 103-26, 2000.

FISHMAN, D., G. FAULDS, *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v.102: 1369-76, 1998.

GARCIA-SAMANIEGO, J., V. SORIANO, *et al.* Influence of hepatitis C virus genotypes and HIV infection on histological severity of chronic hepatitis C. The Hepatitis/HIV Spanish Study Group. **Am J Gastroenterol**, v.92: 1130-4, 1997.

GENTILE, D. A., W. J. DOYLE, *et al.* Cytokine gene polymorphisms moderate illness severity in infants with respiratory syncytial virus infection. **Hum Immunol**, v.64: 338-44, 2003.

GEWALTIG, J., K. MANGASSER-STEPHAN, *et al.* Association of polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. **Clin Chim Acta**, v.316: 83-94, 2002.

GOVINDEN, R. e K. D. BHOOLA. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. **Pharmacol Ther**, v.98: 257-65, 2003.

GRAINGER, D. J., K. HEATHCOTE, *et al.* Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**, v.8: 93-7, 1999.

GRAY, I. C., D. A. CAMPBELL, *et al.* Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. **Hum Mol Genet**, v.9: 2403-8, 2000.

GREEN, E. A., L. GORELIK, *et al.* CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100: 10878-83, 2003.

HAJEER, A. H. e I. V. HUTCHINSON. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. **Hum Immunol**, v.62: 1191-9, 2001.

HANADA, T. e A. YOSHIMURA. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13: 413-21, 2002.

HAUKIM, N., J. L. BIDWELL, *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 2. **Genes Immun**, v.3: 313-30, 2002.

HEYDTMANN, M., P. SHIELDS, *et al.* Cytokines and chemokines in the immune response to hepatitis C infection. **Curr Opin Infect Dis**, v.14: 279-87, 2001.

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

HOFFMANN, S. C., E. M. STANLEY, *et al.* Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**, v.72: 1444-50, 2001.

HOHLER, T., A. KRUGER, *et al.* A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. **Clin Exp Immunol**, v.111: 579-82, 1998.

HOHLER, T., A. KRUGER, *et al.* Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection. **J Med Virol**, v.54: 173-7, 1998.

- ISHIHARA, K. e T. HIRANO. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.13: 357-68, 2002.
- KANTO, T., N. HAYASHI, *et al.* Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. **J Immunol**, v.162: 5584-91, 1999.
- KANTO, T., T. TAKEHARA, *et al.* Neutralization of transforming growth factor beta 1 augments hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte induction in vitro. **J Clin Immunol**, v.17, n.6, Nov, p.462-71. 1997.
- KOUNTOURAS, J., C. ZAVOS, *et al.* Apoptosis in hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.10: 335-42, 2003.
- LAUER, G. M. e B. D. WALKER. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v.345: 41-52, 2001.
- LAZARUS, R., W. T. KLIMECKI, *et al.* Single-nucleotide polymorphisms in the interleukin-10 gene: differences in frequencies, linkage disequilibrium patterns, and haplotypes in three United States ethnic groups. **Genomics**, v.80: 223-8, 2002.
- LEE, H., B. CLARK, *et al.* Influence of recipient and donor IL-1alpha, IL-4, and TNFalpha genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. **J Clin Pathol**, v.57: 101-3, 2004.
- LETTERIO, J. J. e A. B. ROBERTS. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. **Clin Immunol Immunopathol**, v.84: 244-50, 1997.
- LETTERIO, J. J. e A. B. ROBERTS. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu Rev Immunol**, v.16: 137-61, 1998.
- LIO, D., C. CARUSO, *et al.* IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. **Hum Immunol**, v.64, n.7, Jul, p.674-80. 2003.
- LIO, D., V. MARINO, *et al.* Genotype frequencies of the +874T-->A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon-gamma gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis. **Eur J Immunogenet**, v.29: 371-4, 2002.
- LOK, A. S. e N. T. GUNARATNAM. Diagnosis of hepatitis C. **Hepatology**, v.26: 48S-56S, 1997.
- MANGIA, A., R. SANTORO, *et al.* IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **Cytokine**, v.25, n.3, Feb 7, p.103-9. 2004.



MANGIA, A., I. CASCAVILLA, *et al.* HCV genotypes in patients with liver disease of different stages and severity. **J Hepatol**, v.26: 1173-8, 1997.

MAS, V. R., R. A. FISHER, *et al.* Polymorphisms in cytokines and growth factor genes and their association with acute rejection and recurrence of hepatitis C virus disease in liver transplantation. **Clin Genet**, v.65, n.3, Mar, p.191-201. 2004.

MCGUIRE, W., A. V. HILL, *et al.* Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. **Nature**, v.371: 508-10, 1994.

MCNICHOLL, J. M., M. V. DOWNER, *et al.* Host-pathogen interactions in emerging and re-emerging infectious diseases: a genomic perspective of tuberculosis, malaria, human immunodeficiency virus infection, hepatitis B, and cholera. **Annu Rev Public Health**, v.21: 15-46, 2000.

MIGITA, K., S. MIYAZOE, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in Japanese patients with hepatitis B virus infection--association between TGF-beta1 polymorphisms and hepatocellular carcinoma. **J Hepatol**, v.42: 505-10, 2005.

MINTON, E. J., D. SMILLIE, *et al.* Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. **Hum Immunol**, v.66: 127-32, 2005.

MOORE, K. W., R. DE WAAL MALEFYT, *et al.* Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v.19: 683-765, 2001.

MOSMANN, T. R. e R. L. COFFMAN. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v.7: 145-73, 1989.

NAKAMURA, K., A. KITANI, *et al.* Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. **J Exp Med**, v.194: 629-44, 2001.

NAPOLI, J., G. A. BISHOP, *et al.* Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Hepatology**, v.24: 759-65, 1996.

NELSON, D. R., G. Y. LAUWERS, *et al.* Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. **Gastroenterology**, v.118, n.4, Apr, p.655-60. 2000.

NESS, R. B., C. L. HAGGERTY, *et al.* Differential distribution of allelic variants in cytokine genes among African Americans and White Americans. **Am J Epidemiol**, v.160: 1033-8, 2004.

NEUMANN-HAEFELIN, C., H. E. BLUM, *et al.* T cell response in hepatitis C virus infection. **J Clin Virol**, v.32: 75-85, 2005.

NOUSBAUM, J. B. [Genomic subtypes of hepatitis C virus: epidemiology, diagnosis and clinical consequences]. **Bull Soc Pathol Exot**, v.91: 29-33, 1998.

OEN, K., P. N. MALLESON, *et al.* Cytokine genotypes correlate with pain and radiologically defined joint damage in patients with juvenile rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v.44: 1115-21, 2005.

OLEKSYK, T. K., C. L. THIO, *et al.* Single nucleotide polymorphisms and haplotypes in the IL10 region associated with HCV clearance. **Genes Immun**, v.6: 347-57, 2005.

OLIVIERI, F., M. BONAFE, *et al.* The -174 C/G locus affects in vitro/in vivo IL-6 production during aging. **Exp Gerontol**, v.37, n.2-3, Jan-Mar, p.309-14. 2002.

OYANAGI, Y., T. TAKAHASHI, *et al.* Enhanced expression of interleukin-6 in chronic hepatitis C. **Liver**, v.19, n.6, Dec, p.464-72. 1999

PACHIADAKIS, I., G. POLLARA, *et al.* Is hepatitis C virus infection of dendritic cells a mechanism facilitating viral persistence? **Lancet Infect Dis**, v.5: 296-304, 2005.

PAWLOTSKY, J. M., L. TSAKIRIS, *et al.* Relationship between hepatitis C virus genotypes and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. **J Infect Dis**, v.171: 1607-10, 1995.

PERREY, C., V. PRAVICA, *et al.* Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. **Transpl Immunol**, v.6: 193-7, 1998.

PERRI, F., A. PIEPOLI, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in gastric cancer patients from two Italian areas at high and low cancer prevalence. **Cytokine**, v.30: 293-302, 2005.

PESTKA, S., C. D. KRAUSE, *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu Rev Immunol**, v.22: 929-79, 2004.

POWELL, E. E., C. J. EDWARDS-SMITH, *et al.* Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v.31: 828-33, 2000.

PRAVICA, V., A. ASDERAKIS, *et al.* In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **Eur J Immunogenet**, v.26: 1-3, 1999.

PRAVICA, V., C. PERREY, *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Hum Immunol**, v.61: 863-6, 2000.

PYO, C. W., S. S. HUR, *et al.* Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population. **Hum Immunol**, v.64: 979-89, 2003.

REED, K. E. e C. M. RICE. Overview of hepatitis C virus genome structure, polyprotein processing, and protein properties. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.242: 55-84, 2000.

ROSEN, H. R., J. J. LENTZ, *et al.* Donor polymorphism of tumor necrosis factor gene: relationship with variable severity of hepatitis C recurrence after liver transplantation. **Transplantation**, v.68, n.12, Dec 27, p.1898-902. 1999.

ROSEN, H. R., J. G. MCHUTCHISON, *et al.* Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. **Am J Gastroenterol**, v.97, n.3, Mar, p.714-20. 2002.

SCHREIER, E., M. ROGGENDORF, *et al.* Genotypes of hepatitis C virus isolates from different parts of the world. **Arch Virol Suppl**, v.11: 185-93, 1996.

SCHUPPAN, D., A. KREBS, *et al.* Hepatitis C and liver fibrosis. **Cell Death Differ**, v.10 Suppl 1: S59-67, 2003.

SHARARA, A. I. Chronic hepatitis C. **South Med J**, v.90: 872-7, 1997.

SILVA, M. B. S. Prevalência e genotipagem do vírus da hepatite C em usuários de droga intravenosa na cidade de Salvador - BA. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia - Fundação Osvaldo Cruz**, 2004.

SILVA, N. N. P. Estudo do polimorfismo de genes das citocinas (TNF- , IFN- , IL-6, IL-10 E TGF- ) em uma amostra da população de Salvador. **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia - ICS - PPgIM**, 2003.

SIMMONDS, M. J., J. M. HEWARD, *et al.* A systematic approach to the assessment of known TNF-alpha polymorphisms in Graves' disease. **Genes Immun**, v.5: 267-73, 2004.

SIMMONDS, P., E. C. HOLMES, *et al.* Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J Gen Virol**, v.74 ( Pt 11): 2391-9, 1993.

STRAUSS, E. [Hepatitis C]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.34: 69-82, 2001.

SUGIMOTO, K., F. IKEDA, *et al.* Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. **Hepatology**, v.38: 1437-48, 2003.

TAG, C. G., S. MENGSTEAB, *et al.* Analysis of the transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) codon 25 gene polymorphism by LightCycler-analysis in patients with chronic hepatitis C infection. **Cytokine**, v.24: 173-81, 2003.

TAMBUR, A. R., J. W. ORTEGEL, *et al.* Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. **Transplantation**, v.71: 1475-80, 2001.

TERRY, C. F., V. LOUKACI, *et al.* Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **J Biol Chem**, v.275: 18138-44, 2000.

THIO, C. L., X. GAO, *et al.* HLA-Cw\*04 and hepatitis C virus persistence. **J Virol**, v.76: 4792-7, 2002.

THURSZ, M., R. YALLOP, *et al.* Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. The HENCORE group. Hepatitis C European Network for Cooperative Research. **Lancet**, v.354, n.9196, Dec 18-25, p.2119-24. 1999.

TIBBS, C., P. DONALDSON, *et al.* Evidence that the HLA DQA1\*03 allele confers protection from chronic HCV-infection in Northern European Caucasoids. **Hepatology**, v.24: 1342-5, 1996.

TRAJKOV, D., T. ARSOV, *et al.* Cytokine gene polymorphisms in population of ethnic Macedonians. **Croat Med J**, v.46: 685-92, 2005.

TSAI, S. L., Y. F. LIAW, *et al.* Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. **Hepatology**, v.25: 449-58, 1997.

TSUKAMOTO, K., N. OHTA, *et al.* A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus. **J Hum Genet**, v.43: 278-9, 1998.

TSUSHIMA, H., S. KAWATA, *et al.* Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. **J Hepatol**, v.30, n.1, Jan, p.1-7. 1999.

TURNER, D., S. C. GRANT, *et al.* Cytokine gene polymorphism and heart transplant rejection. **Transplantation**, v.64: 776-9, 1997.

TURNER, D. M., S. C. GRANT, *et al.* A genetic marker of high TNF-alpha production in heart transplant recipients. **Transplantation**, v.60: 1113-7, 1995.

TURNER, D. M., D. M. WILLIAMS, *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v.24: 1-8, 1997.

UBOLDI DE CAPEI, M., E. DAMETTO, *et al.* Cytokines and chronic rejection: a study in kidney transplant long-term survivors. **Transplantation**, v.77: 548-52, 2004.

UBOLDI DE CAPEI, M. U., E. DAMETTO, *et al.* Genotyping for cytokine polymorphisms: allele frequencies in the Italian population. **Eur J Immunogenet**, v.30: 5-10, 2003.

UDALOVA, I. A., S. A. NEDOSPASOV, *et al.* Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. **Genomics**, v.16: 180-6, 1993.

UM, J. Y. e H. M. KIM. Frequencies of the tumor necrosis factor gene polymorphisms in the Korean population. **Hereditas**, v.139: 184-8, 2003.

VANDEN BERGHE, W., L. VERMEULEN, *et al.* Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. **Biochem Pharmacol**, v.60: 1185-95, 2000.

VANDENBROECK, K. e A. GORIS. Cytokine gene polymorphisms in multifactorial diseases: gateways to novel targets for immunotherapy? **Trends Pharmacol Sci**, v.24: 284-9, 2003.

VENDRELL, J., J. M. FERNANDEZ-REAL, *et al.* A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis**, v.167: 257-64, 2003.

VICARI, A. P. e G. TRINCHIERI. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? **Immunol Rev**, v.202: 223-36, 2004.

VIDIGAL, P. G., J. J. GERMER, *et al.* Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. **J Hepatol**, v.36, n.2, Feb, p.271-7. 2002.

WANG, H., S. MENGSTEAB, *et al.* Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. **World J Gastroenterol**, v.11, n.13, Apr 7, p.1929-36. 2005.

WILSON, A. G., N. DE VRIES, *et al.* An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. **J Exp Med**, v.177: 557-60, 1993.

WILSON, A. G., J. A. SYMONS, *et al.* Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94: 3195-9, 1997.

WOITAS, R. P., G. AHLENSTIEL, *et al.* Frequency of the HIV-protective CC chemokine receptor 5-Delta32/Delta32 genotype is increased in hepatitis C. **Gastroenterology**, v.122: 1721-8, 2002.

XU, X. W., M. H. LU, *et al.* Association between tumour necrosis factor gene polymorphisms and the clinical types of patients with chronic hepatitis B virus infection. **Clin Microbiol Infect**, v.11: 52-6, 2005.

YAMADA, Y., A. MIYAUCHI, *et al.* Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. **J Bone Miner Res**, v.13: 1569-76, 1998.

YEE, L. J. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. **Genes Immun**, v.5: 237-45, 2004.

YEE, L. J., J. TANG, *et al.* Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. **Hepatology**, v.33, n.3, Mar, p.708-12. 2001.

YEE, L. J., J. TANG, *et al.* Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. **Genes Immun**, v.1, n.6, Aug, p.386-90. 2000.

ZELLER, J. C., A. PANOSKALTSIS-MORTARI, *et al.* Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. **J Immunol**, v.163: 3684-91, 1999.

ZHANG, W. H., X. L. WANG, *et al.* Association of interleukin-1B (IL-1B) gene polymorphisms with risk of gastric cancer in Chinese population. **Cytokine**, v.30: 378-81, 2005.

ZHENG, S. G., J. H. WANG, *et al.* Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. **J Immunol**, v.172: 5213-21, 2004.

## **Anexo**



Name \_\_\_\_\_  Patient  Male  
 Donor  Female

Sample I.D. \_\_\_\_\_ Race \_\_\_\_\_ Birthdate \_\_\_\_\_ ABO/Rh \_\_\_\_\_

Disease \_\_\_\_\_ Relationship to Patient \_\_\_\_\_

TNF- $\alpha$  ResultsTGF- $\beta$ 1 Results

IL-10 Results

IL-6 Results

IFN- $\gamma$  Results

Tray Exp. Date \_\_\_\_\_

Tray Dot # \_\_\_\_\_

D-mix Lot #/Batch # \_\_\_\_\_

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
<b>RESULTS</b> (mark positive locations)																
<b>PRODUCT SIZE (bp)</b>	750	125	125	175	175	125	125	300	300	300	250	250	175	175	250	250
<b>SPECIFICITY</b>	Neg Ctrl	TNF- $\alpha$ promoter -308A	TNF- $\alpha$ promoter -308G	TGF- $\beta$ 1 codon 10T	TGF- $\beta$ 1 codon 10C	TGF- $\beta$ 1 codon 25C	TGF- $\beta$ 1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN- $\gamma$ intron 1 +874T	IFN- $\gamma$ intron 1 +874A
TNF- $\alpha$	G/G (low)															
	G/A (high)															
	A/A (high)															
TGF- $\beta$ 1	T/T G/G (high)															
	T/C G/G (high)															
	T/C G/C (intermediate)															
	C/C G/G (intermediate)															
	T/T G/C (intermediate)															
	C/C G/C (low)															
	C/C C/C (low)															
T/T C/C (low)																
T/C C/C (low)																
IL-10	GCC/GCC (high)															
	GCC/ACC (intermediate)															
	GCC/ATA (intermediate)															
	ACC/ACC (low)															
	ACC/ATA (low)															
	ATA/ATA (low)															
IL-6	G/G (high)															
	G/C (high)															
	C/C (low)															
IFN- $\gamma$	T/T (high)															
	T/A (intermediate)															
	A/A (low)															

Test Performed by \_\_\_\_\_

Date \_\_\_\_\_

Read by \_\_\_\_\_

Date \_\_\_\_\_