



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS E ANÁLISE DOS
POLIMORFISMOS DOS GENES DAS CITOCINAS *IL28B*,
***TNF α* , *IL6* E *IL10* EM PACIENTES POSITIVOS PARA O**
VÍRUS DA HEPATITE C

ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

MANAUS - AMAZONAS
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA**

ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS E ANÁLISE DOS
POLIMORFISMOS DOS GENES DAS CITOCINAS *IL28B*,
TNF α , *IL6* E *IL10* EM PACIENTES POSITIVOS PARA O
VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Universidade Federal do Amazonas como
parte do pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Imunologia na área
de concentração "*Imunologia Básica e
Aplicada*".

Orientadora: Prof^a Dra Adriana Malheiro

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Aya Sadahiro

**MANAUS - AMAZONAS
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Tarragô, Andréa Monteiro

T192a Avaliação do perfil de citocinas e análise dos polimorfismos dos genes das citocinas *IL28B*, *TNFa*, *IL6* e *IL10* em pacientes positivos para o vírus da hepatite c / Andréa Monteiro Tarragô. - Manaus: UFAM, 2013.

117 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Imunologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Prof^a. Dra. Adriana Malheiro

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Aya Sadahiro

1. Epidemiologia 2. Hepatite C 3. Genótipos - Análise 4. Citocinas 4. Polimorfismos I. Malheiro, Adriana (Orient.) II. Sadahiro, Aya (Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (2007): 575:616.36-002(043.3)

ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS E ANÁLISE DOS
POLIMORFISMOS DOS GENES DAS CITOCINAS *IL28B*,
TNF α , *IL6* E *IL10* EM PACIENTES POSITIVOS PARA O
VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada da
Universidade Federal do Amazonas como
parte do pré-requisito para obtenção do
título de Mestre em Imunologia na área
de concentração "*Imunologia Básica e
Aplicada*".

APROVADA EM: _____

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Adriana Malheiro, Presidente
Universidade Federal do Amazonas, UFAM**

**Prof. Dr. Luis André Moraes Mariúba, Membro Externo
Instituto Leônidas Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia**

**Prof. Dr. Antonio Carlos Vallinoto, Membro Externo
Universidade Federal do Pará, UFPA**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata da defesa de Dissertação da aluna
Andréa Monteiro Tarragô, em 19 de
abril de 2013.

Aos dezanove dias do mês de abril do ano de dois mil e treze, às nove horas, no auditório Paulo Buhrnheim, a discente deste Programa, **Andréa Monteiro Tarragô**, orientada pela Professora Doutora Adriana Malheiro (PPGIBA/ UFAM) e co-orientada pela Professora Doutora Aya Sadahiro (PPGIBA/ UFAM), apresentou à banca examinadora sua dissertação intitulado ***“Avaliação do Perfil de Citocinas e a Análise dos Polimorfismos de IL28B, TNFa, IL6 e IL10 em Pacientes Positivos para Vírus as Hepatite C”***. A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Professora Doutora Adriana Malheiro (Orientadora e Presidente), Professor Doutor Antonio Carlos Vallinoto (UFPA) e Professor Doutor Luis André Moraes Mariúba (ILMD-FIOCRUZ), decidiu, após a apresentação e arguição, pela aprovação (X) ou não aprovação () de sua dissertação.


Professora Doutora Adriana Malheiro (Orientadora e Presidente)


Professor Doutor Antonio Carlos Rosário Vallinoto (Membro)


Professor Doutor Luis André Moraes Mariúba (Membro)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais queridos, **Ademir** e **Fátima**, que no decorrer da minha vida, proporcionaram-me amor incondicional, além de me ensinar o valor de sempre buscar conhecimentos e acreditarem no meu potencial. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer à vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

Ao meu companheiro de todos os momentos, **Alexandre**, que além de me fazer feliz, ajudou-me durante todo o percurso do meu mestrado, compreendendo-me nas horas em que precisei me ausentar para que eu conseguisse concretizar mais este sonho.

À amada filha **Melissa**, por ser a minha motivação a fazer o meu melhor a cada dia.

As minhas irmãs **Vanessa e Déborah**, por permanecerem ao meu lado em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, dedico meu agradecimento maior, por nunca desistir de mim e por me fazer perceber o quanto meu trabalho é importante .

À minha querida orientadora e mentora **Profa. Dra. Adriana Malheiro**, que fez muito mais que orientar, me formou como profissional que me tornei e além de tudo confiou em meu trabalho.

À minha querida co-orientadora **Dra. Aya Sadahiro**, pela orientação na realização dos exames moleculares e manuscrito, pelos ensinamentos de vida e pela sua amizade.

À minha amiga e orientadora de PAIC, **Profa. MSc. Hedylamar Oliveira Marques**, por me apresentar a pesquisa no início da minha vida acadêmica.

Ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará, nas pessoas, Msc. Samara Gomes e Dr. Felipe Bonfim Freitas pela contribuição na realização de exames moleculares, **Dr. Ricardo Ishak** e **Dr. Antonio Carlos Vallinotto** por cederem o laboratório e reagentes para processamento das amostras do projeto.

Ao Laboratório de Micologia na pessoa do **Dr. Maurício Ogusko** pelo auxílio na realização dos exames e por ceder o laboratório para processamento das amostras do projeto.

Ao **Prof. Dr. Antonio Luiz Boechat** pelas contribuições nas análises dos resultados.

Ao **Prof. Dr. Pritesh Lalwani** pelas contribuições nas análises dos resultados e elaboração do artigo original.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e aplicada (UFAM)** e a todos os seus integrantes pela oportunidade de concretização deste trabalho.

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)**, por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

A **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** pela oportunidade de cursar o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa do HEMOAM: **MSc. João Paulo Pimentel, MSc.Nadja Garcia, Dra. Elisa de Leon e Soriane Cruz**, que de diversas formas contribuíram com esta pesquisa.

Aos amigos do Mestrado e Imunologia - Turma 2010/2: **Helaine Virgolino, Allyson Guimarães, Edilene Martins, Luciana Souza, Paula Taquita, Juliana Lameiras** pelo companheirismo e apoio incondicional.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq)** pelo apoio financeiro ao projeto.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho, meu muito obrigado.

RESUMO

Introdução: A hepatite C é um problema de saúde pública que afeta mais de 150 milhões de pessoas no mundo. É uma doença de prognóstico muito variável que pode evoluir para cura ou para o desenvolvimento de hepatite C crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte. A identificação de regiões polimórficas que interferem nas concentrações de citocinas é algo que tem sido estudado para justificar a suscetibilidade de determinados indivíduos em desenvolver hepatite C crônica. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos polimorfismos de *IL28B* (rs8103142) , *-308TNF α* , *-174IL6* e *-1082IL10* sobre o perfil de citocinas T_H1 , T_H2 e T_H17 , em amostras de pacientes com Hepatite C crônica antes do início do tratamento e candidatos a doadores de sangue. **Métodos:** As técnicas empregadas neste estudo foram: Citometria de Fluxo para a dosagem de citocinas, PCR-RFLP e qPCR para determinação dos polimorfismos. **Resultados:** No total de 116 indivíduos foram estudados, sendo 69 HCV⁺ e 47 controles. Foi observado maior prevalência em relação ao sexo masculino, em ambos os grupos, com média de idade acima de 40 anos para os HCV⁺. O genótipo de maior frequência para *IL28B* foi o CT, seguido do CC e TT, em ambos os grupos. Para o *TNF α* , o genótipo GG foi o de maior prevalência, tanto nos pacientes como nos controles. Foi observada diferença estatística significativa para o genótipo GA entre pacientes HCV⁺ e controles. Para *-174IL6*, o genótipo GG foi o mais prevalente nos dois grupos estudados, seguido de GC. O genótipo CC não foi encontrado no grupo controle. O genótipo AA foi o mais prevalente para a *-1082IL10*, em pacientes HCV⁺ e controles, seguido de AG e GG. As citocinas IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-17A, apresentaram-se aumentadas nos pacientes HCV⁺ quando comparado aos controles. A concentração de IL-10 foi maior em indivíduos do grupo controle em relação aos pacientes HCV⁺. Pacientes com genótipo GA para *-308TNF α* apresentaram concentrações mais elevadas de TNF- α em comparação com indivíduos controles. Também foi observado que pacientes HCV⁺ com os genótipos GG e GC para IL-6 apresentaram uma maior concentração de IL-6 em relação aos controles. Não foram observadas associações significativas entre as frequências genótípicas de *IL10* e as concentrações de citocinas em pacientes HCV⁺. **Conclusão:** Os resultados sugerem uma possível influência dos polimorfismos de TNF- α e IL-6 sobre a produção e liberação de citocinas.

Palavras-chaves: IL-28B; TNF- α , IL-6, IL-10; Polimorfismos; Hepatite C

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C is a public health problem that affects over 150 million people worldwide. It is a very variable disease prognosis that may progress to healing or the development of chronic hepatitis C, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death. Identification of polymorphic regions that influence the concentrations of cytokines is something that has been studied to justify the susceptibility of certain individuals in developing hepatitis C crônica. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms: *IL28B* (rs8103142), *-308TNFα*, *-174IL6* and *-1082IL10* on the cytokine profile T_H1 , T_H2 and T_H17 , in samples from patients with chronic hepatitis C before treatment begins and blood donors candidates. **Méthods:** The techniques used in this study were: Flow Cytometry for the cytokine dosages, PCR-RFLP and qPCR to determine polymorphisms. **Results:** A total of 116 subjects were studied, 69 HCV⁺ and 47 controls. We observed a higher prevalence males in both groups, with an average age above 40 years for HCV⁺. The most frequent genotype for the *IL28B* was *CT*, *TT* and *CC* followed in both groups. For *-308TNFα*, the *GG* genotype was the most prevalent, both in patients and in controls. We observed statistically significant differences in genotype *GA* HCV⁺ among patients and controls. To *-174IL6*, the *GG* genotype was the most prevalent in both groups, followed by *GC*. The *CC* genotype was not found in the control group. The *AA* genotype was more prevalent for *-1082IL10*, HCV⁺ patients and controls, followed by *AG* and *GG*. The cytokines IL-2, IL-6, IFN-γ, IL-17A, showed to be increased in HCV⁺ patients compared to controls. The concentration of IL-10 was higher in the control group compared to HCV⁺ patients. Patients with genotype *GA* for *-308TNFα* showed higher concentrations of TNF-α compared with control subjects. It was also observed that patients HCV⁺ with genotypes *GG* and *GC* for IL-6 had a higher concentration of IL-6 compared to controls, were not observed significant associations between genotype frequencies of *-1082IL10* and the concentrations of cytokines in patients HCV⁺. **Conclusion:** The results suggest a possible influence of polymorphisms of TNF-α and IL-6 on the production and release of cytokines.

Keywords: IL-28B, TNF-α, IL-6, IL-10; polymorphisms; Hepatitis C

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição da Hepatite C a nível mundial.....	17
Figura 02: Vírus da Hepatite C	20
Figura 03: Genoma do vírus da Hepatite C	21
Figura 04: Distribuição dos genótipos do HCV nas diferentes regiões do Brasil apresenta o numero absoluto de cada genótipo encontrado na região.....	23
Figura 05: Apresentação dos antígenos do HCV aos CTLs.....	25
Figura 06: Destruição dos hepatócitos infectados pelos CTLs.....	26
Figura 07: Modelo de entrada do HCV na célula hospedeira	26
Figura 08: Fluxograma demonstrativo das etapas desenvolvidas no projeto	36
Figura 09: Associação das concentrações das citocinas e os genótipos do HCV....	45
Figura 10: Associação das concentrações das citocinas e as variantes de TNF α ...	47
Figura 11: Associação das concentrações das citocinas e as variantes de IL-6.....	49
Figura 12: Associação das concentrações das citocinas e as variantes de IL-10....	51
Figura 13: Correlação linear simples entre as citocinas dos pacientes com HCV....	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Taxa de detecção de hepatite C (por 100.000 habitantes) segundo faixa etária por ano de notificação 19

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Seqüência dos primers que foram usadas nas análises dos genes da citocinas <i>IL28B</i> , <i>TNF α</i> , <i>IL6</i> e <i>IL10</i>	38
Tabela 02: Seqüência (5`-3`) dos <i>primers</i> das sondas utilizadas para a genotipagem do polimorfismo <i>IL28B</i>	39
Tabela 03: Dados demográficos dos indivíduos submetidos ao estudo	42
Tabela 04: Distribuição das frequências genotípicas nos genes das citocinas - <i>IL28B</i> , - <i>308TNFα</i> , - <i>174IL6</i> , e - <i>1082IL10</i> em pacientes <i>HCV⁺</i> e grupo controle	44

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
CBA	Cytometric Bead Array
CDLN-1	Claudina -1
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
G	Gravidade
GAGs	Moléculas de Glicosaminoglicanos
HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA II	Antígeno leucocitário Humano de Classe II
iDC	Célula Dendrítica Imatura
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
INFα	Interferon α
INFβ	Interferon β
INFλ	Interferon λ
JAK-STAT	Janus Cinase Transdutores de Sinais e Ativadores de

	Transcrição
kDa	Kilodalton
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LDLR	Receptor de Lipoproteínas de Baixa Densidade
mL	Mililitro
NK	Natural killer
OCLDN	Ocludina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
q PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
PEG-IFN	Interferon Peguilato
RIG-I	Ácido Retinóico Indutor do Gene I
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RVS	Resposta Virológica Sustentável
SINAN	Sistema de Informação de Agravos e Notificação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
SR-B1	Receptor Scavenger de Classe B Tipo 1
T_H	Células T Helper
TIR	Domínio do Toll Homólogo a Interleucina 1
TLR-3	Receptor do Tipo Toll 3
TLR-7	Receptor do Tipo Toll 7
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
Treg	Células T Regulatórias
TRIF	Indutor do Interferon β Similar ao TIR
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UTR	Regiões Não Traduzidas
VLDL	Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
1. REVISÃO DA LITERATURA	17
1.1 Epidemiologia.....	17
1.2 Transmissão	19
1.3 O vírus da hepatite C	19
1.4 Genótipos do HCV	22
1.5 Alterações clínicas e laboratoriais	23
1.6 Imunopatogênese do HCV.....	24
1.7 Tratamento.....	27
1.8 Fatores de resistência à terapia.....	28
1.8.1 Interleucina 28-B (IL28-B).....	29
1.8.2 Fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α).....	30
1.8.3 Interleucina 6 (IL-6).....	31
1.8.4 Interleucina 10 (IL-10).....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Tipo de Estudo	34
3.2 População de estudo e critérios de inclusão e exclusão	34
3.3 Aspectos éticos.....	35
3.4 Coleta e conservação das amostras	35
3.5 Quantificação de citocinas de padrão T_H1, T_H2 e T_H17por citometria de fluxo	37
3.6 Extração de DNA	37
3.7 Padronização dos marcadores dos polimorfismos dos genes das citocinas: <i>IL28B</i>, <i>TNFα</i>, <i>IL6</i> e <i>IL10</i>	38

3.7.1 Ensaio para a identificação do polimorfismo de <i>IL28B</i>	39
3.7.2 Ensaio para a identificação do polimorfismo de <i>TNFα</i>	39
3.7.3 Ensaio para a identificação do polimorfismo de <i>IL6</i>	40
3.7.4 Ensaio para a identificação do polimorfismo de <i>IL10</i>	40
3.8 Análises estatísticas	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Caracterização das amostras.....	42
4.2 Frequências alélicas e genóticas	42
4.3 Concentrações de citocinas associadas aos genótipos do HCV	44
4.4 Concentrações de citocinas associadas aos genótipos dos marcadores -308 <i>TNFα</i> , -174 <i>IL6</i> e -1082 <i>IL10</i>	46
4.4.1 Concentrações de citocinas associadas ao genótipo GG e GA do marcador -308 <i>TNFα</i>	46
4.4.2 Concentrações de citocinas associadas ao genótipo GG, GC e CC do marcador -174 <i>IL6</i>	48
4.4.3 Concentrações de citocinas associadas ao genótipo AA, AG e GG do marcador -1082 <i>IL10</i>	50
4.4.4 Correlações entre as concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IFN- Y e TNF- α em paciente HCV positivos	52
5. DISCUSSÃO	53
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	70
Anexo 01 - TCLE.....	70
Anexo 02 - TCLE.....	72
Anexo 03 – Aprovação do Comitê de Ética FMT/AM.....	75
Anexo 04 - Aprovação do Comitê de Ética HEMOAM	76
Anexo 05 – Artigo de Revisão.....	78
Anexo 06 – Artigo Original	92

Introdução

INTRODUÇÃO

A hepatite C é um problema de saúde pública que afeta mais de 150 milhões de pessoas no mundo (OMS, 2012). É uma doença de prognóstico muito variável que pode evoluir para cura ou para o desenvolvimento de hepatite C crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte (MELO, 2008).

O processo de erradicação do vírus depende da interação de forma dinâmica do sistema imune com o agente infeccioso que, por sua vez, apresenta mecanismos que favorecem a sua entrada e permanência nas células do hospedeiro. Logo, observa-se o importante papel das citocinas em inibir a replicação viral através da comunicação celular e humoral (COELHO-CASTELO *et al.*, 2009).

Neste aspecto, variações nas concentrações séricas de citocinas estão associadas principalmente a fatores genéticos, como polimorfismos em regiões regulatórias dos genes das citocinas. Algumas dessas variações podem resultar em expressão alterada do gene e, por conseguinte, alterar a funcionalidade dessas proteínas (CLARK *et al.*, 2011).

A identificação de regiões polimórficas que interferem nas concentrações de citocinas é algo que tem sido estudado para justificar a suscetibilidade de determinados indivíduos em desenvolver hepatite C crônica.

Por isso, embora os protocolos de tratamento preconizados para hepatite C crônica já estejam bem estabelecidos, é de conhecimento geral que, é uma terapia demorada, de alto custo e mal tolerada. Isto reforça a necessidade de se identificar um preditor de resposta ao tratamento da hepatite C, afim de que se torne uma ferramenta que contribua para o sucesso do tratamento ressaltando a peculiaridade genética de cada indivíduo.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a influência dos polimorfismos dos genes das citocinas *IL28B*, *TNF- α* , *IL6* e *IL10* sobre o perfil de citocinas T_H1 , T_H2 e T_H17 , em amostras de pacientes com Hepatite C crônica antes do início do tratamento e candidatos a doadores de sangue.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência dos polimorfismos dos genes das citocinas *IL28B*, *TNF- α* , *IL10* e da *IL6* nos referidos indivíduos e candidatos a doadores de sangue (controles);
- Avaliar o perfil de citocinas T_H1 , T_H2 e T_H17 em sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica e controles.
- Associar os polimorfismos descritos acima ao perfil de citocinas de pacientes HCV⁺ não tratados com interferon peguilado e ribavirina.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, constituindo subprojeto de estudos maiores da linha de pesquisa sobre o vírus da hepatite C, desenvolvidos pelo grupo de Pesquisa “*Aspectos Hemoterápicos do Amazonas*” da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas em parceria com a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

3.2 População de estudo e critérios de inclusão e exclusão

Foram analisadas 69 amostras de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, que se apresentaram na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM) no período de 01/08/2007 a 30/08/2009 (ARAÚJO *et al.*, 2011) e 47 amostras de candidatos a doadores de sangue que se apresentaram na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) no período de 01/03/2006 a 01/03/2007 (CUNHA *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que, foram obedecidos os mesmos critérios de inclusão e exclusão descritos por Araújo *et al.*, (2011) e CUNHA *et al.*, (2012), para o grupo de pacientes HCV⁺ e grupo controle, respectivamente.

Desta forma, para o grupo HCV⁺ foram considerados critérios de inclusão: pacientes adultos com mais de 18 anos, com diagnóstico de infecção pelo HCV confirmado por, pelo menos, um anti-HCV pela técnica de ELISA, Imunoblot positivo e confirmadas por RT-PCR. Foram considerados critérios de exclusão: pacientes gestantes (triagem com beta-HCG), pacientes que apresentaram co-infecção, detectada por meio de reação positiva para marcadores da Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL), pacientes que apresentaram quadro clínico-laboratorial de cirrose hepática descompensada, pacientes diabéticos descompensados, pacientes com história de uso de drogas ilícitas nos últimos sete anos, pacientes com relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios psiquiátricos, pacientes renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica.

Para o grupo controle, foram selecionados candidatos à doação de sangue, residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti-

HBc, HBsAg), HCV(anti-HCV), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL).

3.3 Aspectos éticos

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de projetos aprovados nos CEPs da FMT-AM (CAAE - 0913/2007) e Fundação HEMOAM – (CAAE - 0015/2005).

3.4 Coleta e conservação das amostras

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas através de punção venosa. O volume total de 10 mL de sangue periférico foram distribuídos em dois tubos: 5 mL em tubo PPT (*Plasma Preparation Tube, Vacuntainer BD*) para procedimentos referentes à determinação dos polimorfismos das citocinas propostas e 5 mL em um tubo sem anticoagulante, no qual foi reservado para dosagem de citocinas previstas pelos projetos.

O material foi processado no Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, sendo separado em alíquotas (plasma e *buffy coat*) e estocadas a -80°C até o momento em que as análises foram realizadas em colaboração com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e com a Universidade Federal do Pará (UFPA).

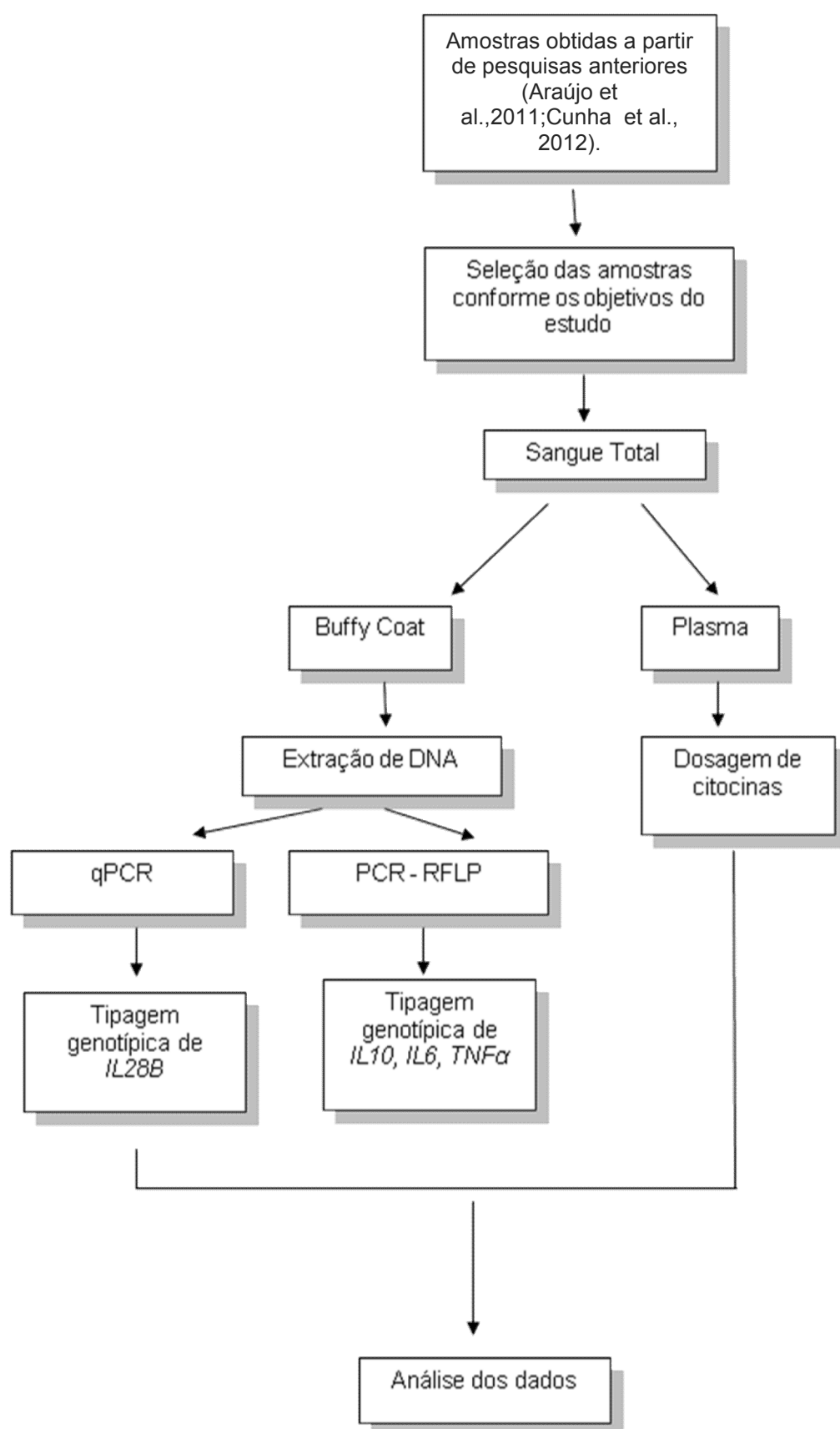


Figura 08: Fluxograma demonstrativo das etapas desenvolvidas no projeto.

3.5 Quantificação de citocinas de padrão T_H1, T_H2 e T_H17 por citometria de fluxo (Cytometric Bead Array - CBA)

As dosagens das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A foram realizadas pela técnica de citometria de fluxo CBA, utilizando o Kit T_H1, T_H2 e T_H17 (*BD Cytometric Bead Array (CBA) Human T_H1/T_H2/T_H17 Cytokine Kit - Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences, San Jose, CA*), seguindo as orientações técnicas contidas nos protocolos preconizados pelo fabricante.

O *BD™ CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads* com intensidade de fluorescência distinta) para detectar simultaneamente as várias citocinas solúveis através de uma superfície de captura.

Cada microesfera de captura está conjugada a um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é analisada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) – conjugado a anticorpos, que fornece um sinal fluorescente, em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*.

Os complexos formados de partículas de capturas, citocina da amostra e reagente de detecção são mensurados através da citometria de fluxo. A intensidade da fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/ml de cada citocina.

Para aquisição das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo *FACSCanto II* (*BD Biosciences*) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL de cada citocina foi utilizado o software *FCAP-Array™* (v 3.0.1).

3.6 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada a partir de 200 μ L de sangue total utilizando-se o Kit *Brazol®* (*Cat. N° 13-BR188, marca LGC tecnologia*), versão otimizada do método passo-único do isolamento total de DNA/RNA, baseado na metodologia desenvolvida por Chomczynski & Sanchi (2006).

As amostras foram inicialmente lisadas em solução de Trizol (*Kit Brazol® Cat. N° 13-BR188, marca LGC tecnologia*) a 4°C sob agitação vigorosa. Após homogeneização, adicionou-se clorofórmio a 4°C nas amostras, sob agitação vigorosa e, em seguida, centrifugou-se as mesmas por 15 minutos a 10.000 RPM em temperatura ambiente. Por conseguinte, observou-se que o produto resultante

apresentou duas fases visíveis. Retirou-se cuidadosamente a fase superior contendo DNA genômico e transferiu-se para tubos de 1,5 mL previamente identificados. O DNA extraído foi precipitado através da adição de 500 µL de etanol 100% a 4°C, seguido de centrifugação por 15 minutos a 10.621 g em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante. A etapa de precipitação foi repetida, seguida de centrifugação por 12 minutos a 10.621 g em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante. Removeu-se o etanol residual em banho seco a 56°C por 10 minutos. Por fim, o precipitado foi hidratado em 200 µL de água ultrapura e armazenado em freezer a -20 °C.

3.7 Padronização dos marcadores dos polimorfismos dos genes das citocinas: IL28B, TNFα, IL6 e IL10

A padronização dos marcadores dos polimorfismos de *IL28B* foi realizada pela técnica de PCR em Tempo Real enquanto os polimorfismos de *TNFα*, *IL6* e *IL10* foram realizados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida de reação de restrição com endonucleases (RFLP). Os *primers* utilizados encontram-se descritos na quadro abaixo (**Tabela 01**) :

Tabela 01: Sequência dos *primers* que foram usadas nas análises dos genes das citocinas *IL28B*, *TNF α*, *IL10* e *IL6* (*Eurofins Mwg Operon, Hutsvill, AL-US*).

Polimorfismo	Primes
<i>IL28B</i>	Senso
	5'- GCCTCAGGTCCCAGGTC - 3'
	Anti-Senso
	5' - GCCTTTGCTGTCTAGGAAGAGT - 3'
<i>TNFα</i>	Senso
	5'- GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT - 3'
	Anti-Senso
	5' - GGGACACACAAGCATCAAG - 3'
<i>IL6</i>	Senso
	5'- AAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT - 3'
	Anti-Senso
	5' - ATCTTTGTTGGAGGGTGAGG - 3'
<i>IL10</i>	Senso
	5'- TCTGAAGAAGTCCTGATGTC - 3'
	Anti-Senso
	5' - CTCTTACCTATCCCTACTTCC - 3'

3.7.1 Ensaio para identificação do polimorfismo de *IL28B* (rs8103142)

O sistema *TaqMan*[®] (*Assay name: rs8103142, Lot.: AH39YBJ, marca Applied Biosystems by Life Technologies*) foi a ferramenta utilizada para a genotipagem em PCR tempo real. Os *primers* que amplificam a região genômica de interesse e as sondas que permitem a identificação das variantes alélicas foram construídos através dos serviços oferecidos pelo próprio fornecedor (*Applied Biosystems by Life Technologies, São Paulo, SP*) e suas sequências encontram-se descritas na tabela 02.

As reações de PCR foram realizadas com 10 µL de enzima *TaqMan*[®] *genotyping Master Mix* (2x), 1 µL de ensaio *TaqMan*[®] (20x) contendo 36µM de cada *primer* e 8 µM de cada sonda *TaqMan*[®], 7,5 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA genômico, em reação final de 20 µL. O início da reação ocorreu com incubação a 60°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e hibridação e extensão a 60°C por 1 minuto.

Tabela 02. Sequências (5'-3') dos *primers* e das sondas utilizados para a genotipagem do polimorfismo *IL28B*

Polimorfismo	Primes (Fe R)	Sondas*
rs 8103142	GCCTCAGGTCCCAGGTC GCCTTTGCTGTCTAGGAAGAGT	VIC - CGGCACCTGCAGTC FAM- CGGCACTTGCAGTC

*Identificação dos Fluoróforos (VIC e FAM) do alelo específico para sonda e do sítio de anelamento ao SNP AH39YBJ

3.7.2 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina *TNFα*

O sítio polimórfico GA na posição -308 da região promotora do gene da citocina *TNFα* (147 pares de bases) foi amplificado com os iniciadores 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT - 3' e 5' - GGGACACACAAGCATCAAG - 3'. O DNA extraído foi adicionado à PCR, em um volume final de 50 µL, contendo 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,3 µM de cada iniciador e 1,25 U Taq DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação no termociclador da *Applied Biosystems (Veriti*[®] *96 Thermal Cycler)* de acordo com programa descrito: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C

por 10 minutos. O polimorfismo -308GA do *TNF α* foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Nco* I a 37°C por 8 horas. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5% visualizados por fluorescência UV no transiluminador de luz azul após coloração com *SYBR*® *Safe*. Foram definidos como genótipo GG os que apresentaram os fragmentos de 126 e 21 pb, GA com 147, 126 e 21 pb e AA com o fragmento 147 pb.

3.7.3 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina *IL6*

O sítio polimórfico CG na posição -174 da região promotora da citocina *IL6* (169 pares de bases-pb) foi amplificado com os iniciadores 5'-AAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT - 3' e 5' - ATCTTTGTTGGAGGGTGAGG - 3'. O DNA extraído foi adicionado a PCR, em um volume final de 50 μ L, contendo 1,5 mM $MgCl_2$, 1,25 mM dNTP, 10pM de cada iniciador e 0,5 U *Taq* DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação no termociclador de acordo com programa descrito: 1 ciclo a 95°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 59°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. O polimorfismo -174CG da *IL6* foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Nla* III a 37°C *over-night* e a eletroforese em gel de agarose a 4% foram visualizados por fluorescência UV no transluminador de luz azul após coloração com brometo de etídio. Foram definidos como genótipo GG os que apresentaram os fragmentos de 169 pb, CG com 169 e 87 pb e CC com o fragmento 87 e 88 pb.

3.7.4 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina *IL10*

O sítio polimórfico GA na posição -1082 da região promotora da citocina *IL10* (190 pares de bases-pb) foi amplificado com os iniciadores 5'-TCTGAAGAAGTCCTGATGTC - 3' e 5' - CTCTTACCTATCCCTACTTCC - 3'. O DNA extraído foi adicionado à PCR, em um volume final de 50 μ L, contendo 1,5 mM $MgCl_2$, 1,25mM dNTP, 10 pM de cada iniciador e 0,5 U *Taq* DNA Polimerase. Os parâmetros de amplificação no termociclador de acordo com programa descrito: 1 ciclo a 94°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. O polimorfismo AG para *IL10* foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Mn*LI a

37°C por 4 horas e a eletroforese em gel de agarose a 4% foram visualizados por fluorescência UV no transiluminador de luz azul após coloração com Brometo de etídio. Foram definidos como genótipo AA os que apresentaram os fragmentos de 125 pb e 65 pb, AG com 125, 93 e 65 pb e GG com os fragmentos 93 e 65 pb.

3.8 Análises Estatísticas

Os resultados variáveis foram tabulados e armazenados por meio do *Software Microsoft Excel®* (versão 2007 para windows). Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas de frequência.

Para as análises dos resultados da concentração de citocinas por CBA e confecção dos gráficos foi utilizado o programa *GrahPadPrism®* (versão 5.0). A avaliação das associações entre os genótipos do HCV e os níveis de citocinas foram feitos através do teste Kruskal Wallis e o cálculo de correlação linear entre os níveis de citocinas foi feito através do teste de Pearson's.

O cálculo do equilíbrio de Hardy-Weiberg foi feito por meio do programa *BioEstat* 5.0. A comparação das frequências genotípicas dos genes estudados tanto nos pacientes HCV⁺ quanto no grupo controle foram realizadas por meio do programa *GrahPadPrism®* (versão 5.0) através do teste Exato de Fisher ou teste qui-quadrado.

A avaliação das associações entre os genótipos e os níveis de citocinas nos indivíduos positivos para o vírus c foi efetuada pelo teste de Mann-Whitney por meio do programa *GrahPadPrism®* (versão 5.0).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização das amostras

Para este estudo foram incluídos 116 indivíduos brasileiros, sendo que, dentre eles 69 eram pacientes HCV⁺ e 47 eram candidatos a doadores de sangue (grupo controle). Do total de indivíduos incluídos na pesquisa observou-se maior prevalência do sexo masculino tanto em pacientes HCV⁺ (67%) quanto em indivíduos controle (78%) em comparação ao sexo feminino, grupo de pacientes HCV⁺ (33%) e indivíduos controle (22%).

A média de idade para o sexo feminino foi 45,65±15,13 no grupo de pacientes HCV⁺ e 36,44±7,51 no grupo de doadores de sangue e para o sexo masculino a média de idade foi de 46,71±12,06 no grupo de pacientes HCV⁺ e de 37,6±11,43 no grupo controle, não apresentando diferença estatística significativa entre ambos os sexos. Na tabela 03, estão resumidas as características demográficas da população de estudo.

Tabela 03: Dados demográficos dos indivíduos submetidos ao estudo.

	<u>Sexo</u>	<u>Média de Idade</u>
<u>Pacientes HCV⁺</u>	Feminino 23(33%)	45,65±15,13
	Masculino 46(67%)	46,71±12,06
<u>Grupo Controle</u>	Feminino 10(22%)	36,44±7,51
	Masculino 37(78%)	37,6±11,43

4.2. Frequências alélicas e genotípicas

A análise dos desvios entre as proporções alélicas e genotípicas observadas e esperadas não foram significativas nos grupos estudados ($p>0.05$), revelando que ambos os grupos populacionais encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para este estudo (Tabela 04).

A distribuição das frequências genotípicas mostrou que os três genótipos estavam presentes em ambos os grupos nos marcadores *IL28B* (rs8103142) e *-1082IL10*, enquanto nos marcadores *-308TNF α* , o genótipo *AA* apresentou-se ausente em ambos os grupos avaliados, em *-174IL-6* o genótipo *CC* apresentou-se ausente apenas no grupo controle.

Com relação à citocina IL-28B, a frequência do genótipo *CC* foi de 30% no grupo controle e 27% no grupo de pacientes HCV⁺. Já o genótipo heterozigoto *CT* apresentou frequências de 43% no grupo controle e 52% em pacientes HCV⁺. Para o genótipo *TT* a frequência foi de 27% e 21%, em grupo controle e HCV⁺, respectivamente.

Para o TNF- α observou-se a frequência do genótipo *GG* em 87% e 98% nos grupos, controle e HCV⁺, respectivamente. O genótipo heterozigoto *GA* foi maior no grupo controle (13%) quando comparado aos pacientes HCV⁺ (2%), sendo estatisticamente significativo.

Diferente dos demais marcadores, *IL28B* (rs 8103142), *-308TNF α* , *-174IL6* e *-1082IL10* a análise estatística apresentou diferença significativa entre os dois perfis estudados (Tabela 04).

Quanto a interleucina IL-6, a frequência do genótipo *GG* foi de 61% no grupo controle e 62% no grupo HCV⁺. O genótipo heterozigoto *GC* apresentou frequências de 39% no grupo controle e 35% no grupo HCV⁺, enquanto o genótipo *CC* apresentou-se ausente no grupo controle (0%) e apresentou baixa frequência no grupo HCV⁺ (3%).

Vale ressaltar que as frequências das variantes de *IL28B* (rs8103142), *-308TNF α* , *-174IL6* e *-1082IL10*, foram investigadas em todos os sujeitos deste trabalho. No entanto, nem todos os indivíduos foram genotipados em virtude da qualidade e quantidade das amostras, não sendo possível a confirmação do genótipo. É possível que o número de amostras poderia ser uma limitação e ter influenciado os resultados obtidos.

Tabela 04: Distribuição das frequências genotípicas nos genes das citocinas *IL28B*, *-308TNF α* , *-174IL6* e *-1082IL10* em pacientes HCV⁺ e grupo controle.

Gene	Genótipo	Grupo controle n (%)	Pacientes HCV ⁺ n(%)	p valor
<i>IL-28B</i> (rs 8103142)	CC	13 (30)	18 (27)	0.1649
	CT	19 (43)	34 (52)	
	TT	12 (27)	14(21)	
<i>-308TNF-α</i>	GG	39 (87)	61 (98)	<0.0001*
	GA	6 (13)	8 (2)	
	AA	0	0	
<i>-174IL-6</i>	GG	28 (61)	43 (62)	0.1761
	GC	18 (39)	24 (35)	
	CC	0	2 (3)	
<i>-1082IL-10</i>	AA	17 (48)	27 (40)	0.2475
	AG	16 (46)	35 (52)	
	GG	2 (6)	5 (8)	

n: Número de indivíduos analisados

*p<0,05

4.3. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos do vírus C em pacientes HCV⁺

Os genótipos do vírus C foram publicados por Araújo *et al.*, (2011) e esses dados foram utilizados para verificar o perfil de citocinas em relação aos genótipos encontrados no Amazonas.

As concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A foram determinadas por citometria de fluxo em soro de pacientes HCV⁺ e comparados com o grupo controle. Os pacientes HCV⁺ com genótipos 2 e 3 foram analisados juntos pois apresentaram-se em menor número quando comparados com o genótipo 1.

Como mostra a figura 09, os resultados demonstraram uma diferença significativa nas concentrações séricas de IL-2(A), IL-6(C), IFN- γ (F) e IL17A(G), apresentando-se aumentadas em pacientes HCV⁺ quando comparados com o grupo controle ($p < 0,0001$). Não obstante, os indivíduos HCV⁺ que possuem o genótipo do vírus 1 apresentaram as concentrações séricas de IL-2(A), IL-6(C), IFN- γ (F) e

IL17A(G) maiores que os indivíduos HCV⁺ que possuem genótipos 2 e 3, sendo estatisticamente significativo.

Além disso, as concentrações séricas de IL-4(B), IL-10(D) e TNF-α (E) foram maiores em indivíduos do grupo controle quando comparados com o grupo de pacientes HCV⁺, sendo que destes somente IL-10 apresentou significancia estatística entre os grupos.

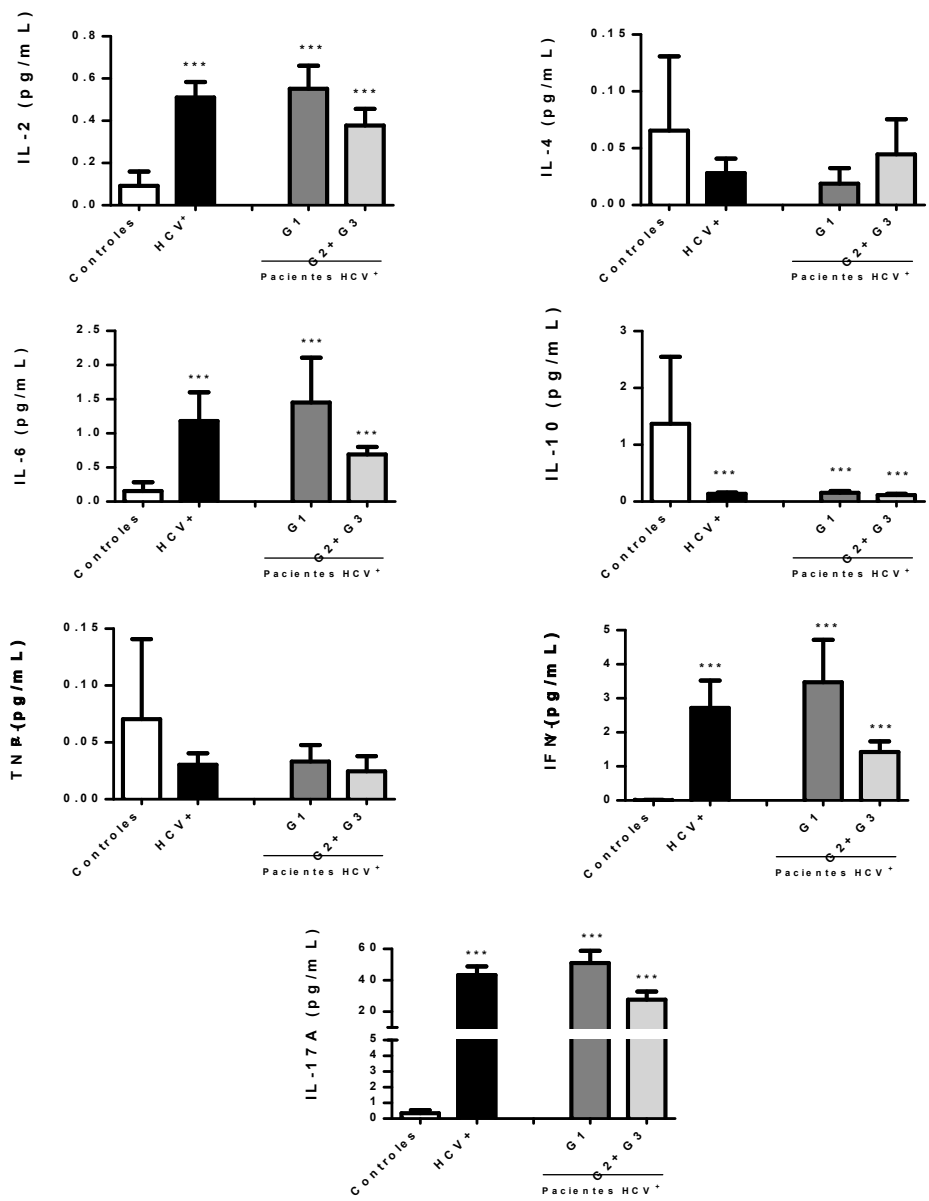


Figura 09. Associação das concentrações das citocinas de IL-2 (A), IL-4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF-α (E), IFN-γ e IL17A em doadores de sangue (controles) e em pacientes HCV⁺ sobre os genótipos do HCV (G1, G2 + G3). Foram consideradas significativas as diferenças com p < 0,001 (***) p). Os Dados foram demonstrados como média ± DP. Foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis* para comparação da concentração sérica de citocinas e os grupos com diferentes genótipos do HCV.

4.4. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos dos marcadores -308TNF α , -174IL6 e -1082IL10

A associação entre os genótipos e as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A no soro de indivíduos HCV⁺ e grupo controle pelo foi feita pelo teste de *Mann-Whitney* (figura 10,11 e 12).

4.4.1. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos GG e GA do marcador -308TNF α

Como demonstra a figura 10A concentração da IL-2 apresentou-se significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle com mesmo genótipo ($p < 0,0001$), enquanto pacientes com genótipo GA não apresentaram diferença estatística significativas em virtude da concentração de IL-2 no grupo controle ter sido próximo a zero.

Diferente da IL-2, para IL-4 (Fig. 10B) não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos controle e de pacientes HCV⁺ com ambos genótipos GG e GA ($p=0,5720$).

Por outro lado, observou-se diferença significativa na concentração das citocinas IL-6 (Fig.10C) ($p < 0,0001$) e IFN- γ (Fig.3F) ($p < 0,0001$), em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle, enquanto pacientes com genótipo GA não apresentaram diferença estatística significativa para ambas as citocinas

A concentração das citocinas IL-10 (Fig. 10D) foi significativamente menor em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle ($p < 0,0001$), diferentemente pacientes com genótipo GA não apresentaram diferença estatística significativa entre ambos os grupos (controle e HCV⁺).

Para o TNF- α (Fig. 10E) foi observado menor concentração em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle ($p = 0,0234$), enquanto pacientes com genótipo GA não apresentaram diferenças estatísticas significativas, porém foi possível observar que houve um aumento ainda que não seja significativo na concentração de TNF- α em pacientes HCV⁺ com genótipo GA.

Surpreendentemente a IL-17A (Fig.10G) apresentou-se significativamente maior tanto em pacientes HCV⁺ com genótipo GG (p < 0,0001), quanto com genótipo GA (p < 0,0100), quando comparados com indivíduos do grupo controle com os mesmos genótipos.

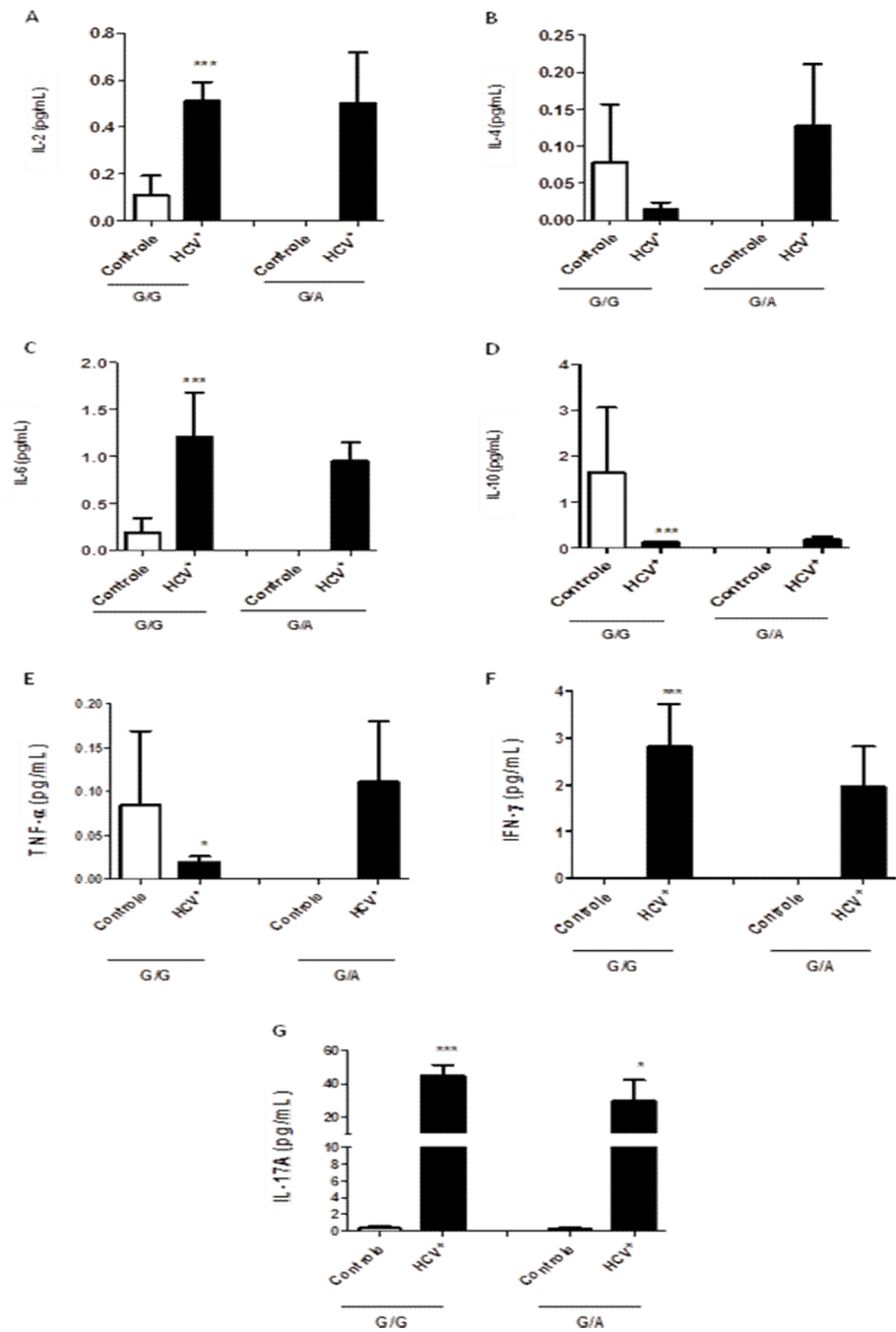


Figura 10. Associação dos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α, IFN- γ e IL17A e as variantes de TNF-α. Foram consideradas significativas as diferenças com p < 0.001 (***) p), p=0.0234 (*) e p=0.0100 (*p). Os dados foram demonstrados em Média ±SD. O teste utilizado para avaliar a significância estatística foi *Mann Whitney*.

4.4.2. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos GG, GC e CC do marcador -174IL6

Para o melhor entendimento do perfil imunológico nestes indivíduos avaliamos também a associação da produção das citocinas com os diferentes genótipos estudados da IL-6.

Pode-se observar que a concentração da IL-2 (Fig. 11A) apresentou-se significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle com mesmo genótipo ($p < 0,0001$), enquanto pacientes com genótipo GC e CC não apresentaram diferença estatística significativas entre os grupos.

Por outro lado, não foi observado diferenças estatísticas significativas na concentração sérica da IL-4 (Fig. 11B) entre os grupos controle e de pacientes HCV⁺ com todos os genótipos estudados, ou seja, GG, GC e GA ($p=0,5860$).

A IL-6 (Fig. 4C), apresentou-se significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo GG e GC, comparados com indivíduos do grupo controle com os mesmo genótipos ($p<0,0001$), enquanto pacientes com genótipo CC não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Ao contrário da IL-6, a IL-10 (Fig. 11D) apresentou-se significativamente menor em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle ($p < 0,0001$), enquanto pacientes com genótipo GC e CC não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

A concentração do TNF- α (Fig. 11E) apresentou-se significativamente menor em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle com o mesmo genótipo ($p < 0,0001$), enquanto pacientes com genótipo GC e CC não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Em relação ao IFN- γ (Fig. 11F), foi observado aumento significativo em pacientes HCV⁺ com genótipo GG, comparados com indivíduos do grupo controle com o mesmo genótipo ($p < 0,0001$), enquanto em pacientes com genótipo GC e CC não houve diferença estatística entre os grupos.

Mais uma vez foi observado aumento significativo na concentração da IL-17A (Fig. 11G) tanto em pacientes HCV⁺ com genótipo GG ($p < 0,0001$) quanto GC ($p <$

0,0001), quando comparados com indivíduos do grupo controle com os mesmos genótipos.

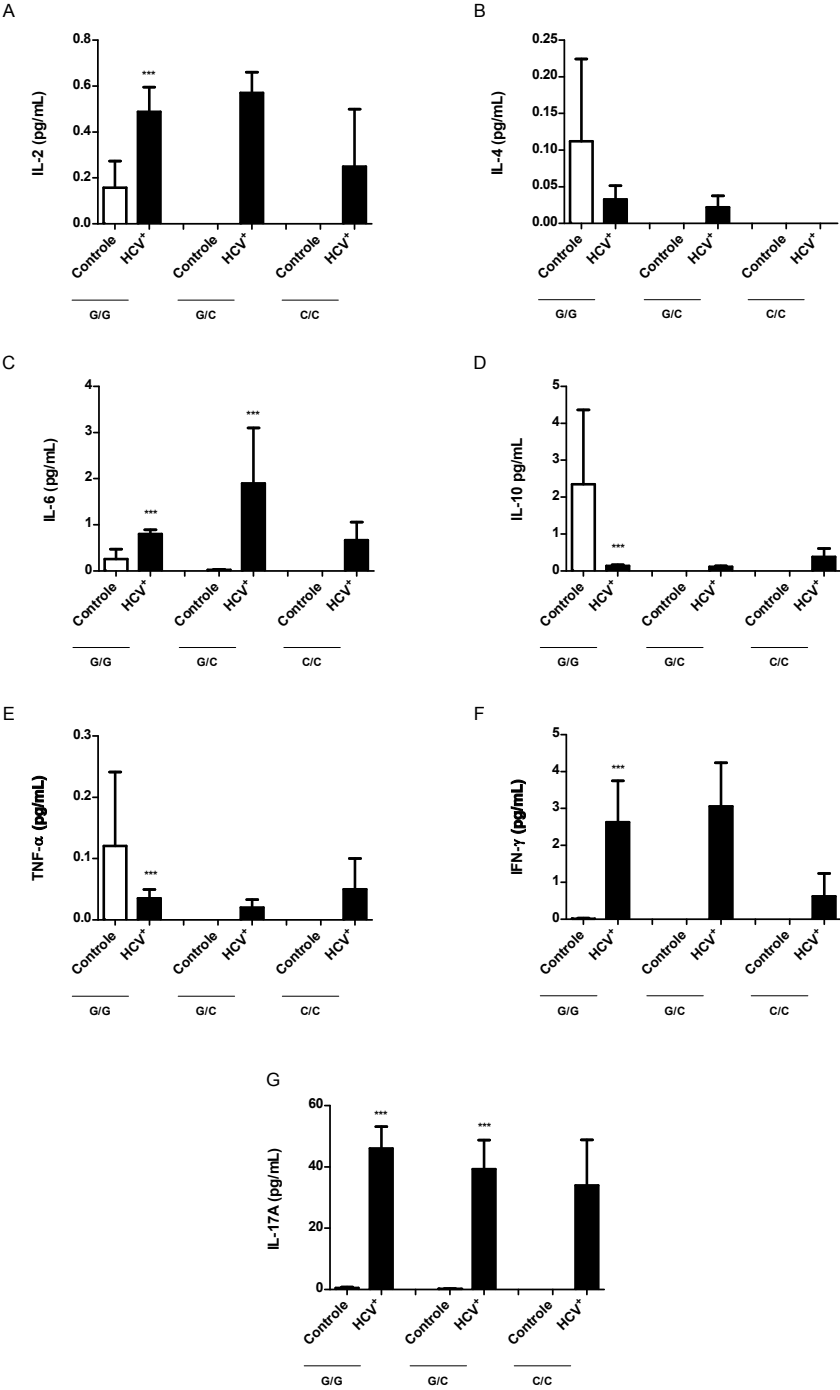


Figura 11. Associação dos níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α, IFN- γ e IL17A e as variantes de IL-6. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0.001$ (***) p). Os dados foram demonstrados como Média $\pm$ SD. O teste utilizado para avaliar a significância estatística foi *Mann Whitney*.

4.4.3. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos AA, AG e GG do marcador -1082IL10

A concentração da IL-2 (Fig. 12A) apresentou-se significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo AA, comparados com indivíduos do grupo controle com mesmo genótipo ($p < 0,016$), enquanto pacientes com genótipo AG e GG não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Em relação a IL-4 (Fig. 12B) não houve diferença estatística significativa entre os grupos controle e de pacientes HCV⁺ com genótipos AA, AG e GG, estudados ($p=0,9122$).

Enquanto que para a IL-6 (Fig. 12C), observou-se diferença estatística significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo AA e AG, comparados com indivíduos do grupo controle com os mesmo genótipos ($p<0,0001$), enquanto pacientes com genótipo CC não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

A IL-10 (Fig. 12D) foi significativamente menor em pacientes HCV⁺ com genótipo AA e AG, comparados com indivíduos do grupo controle ($p<0,0001$), enquanto indivíduos com genótipo GG não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados.

Para o TNF- α (Fig. 12E) não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos controle e pacientes HCV⁺ para genótipos AA, AG e GG ($p=0,0873$).

A concentração do IFN- γ (F) apresentou-se significativamente maior em pacientes HCV⁺ com genótipo AA, comparados com indivíduos do grupo controle com o mesmo genótipo ($p < 0,0001$), enquanto pacientes com genótipo AG e GG não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Interessantemente, a concentração da IL-17A (12G) apresentou-se significativamente maior tanto em pacientes HCV⁺ com genótipo AA ($p < 0,0001$) quanto AG ($p < 0,0001$) quando comparados com indivíduos do grupo controle com os mesmos genótipos, porém os indivíduos com genótipo GG não apresentaram diferença estatística entre os grupos, controle e HCV⁺.

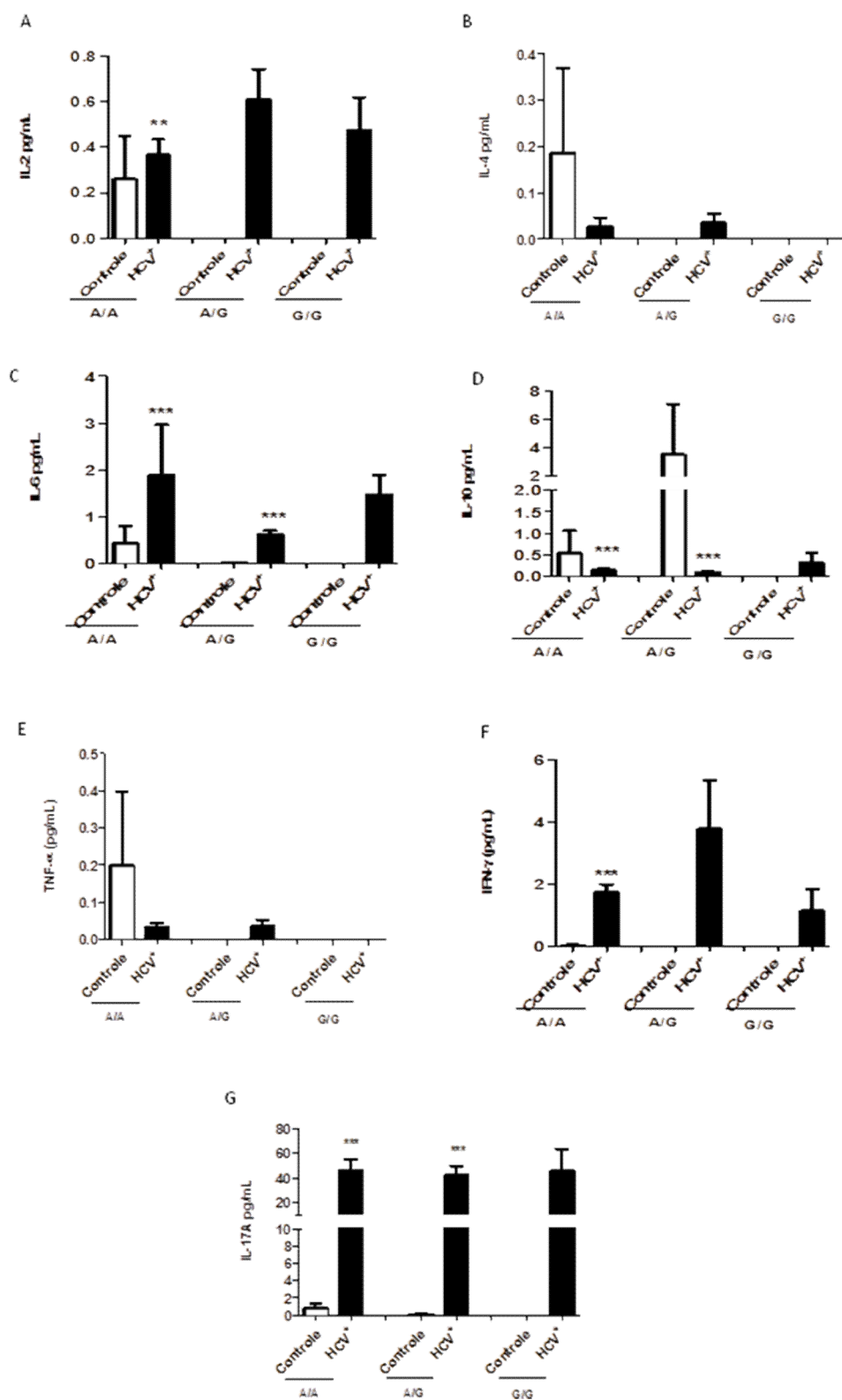


Figura 12. Associação dos níveis de citocina de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A e as variantes de IL-10. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0.0016$ (** $p < 0.001$ (***) p). Os dados foram demonstrados em Média $\pm$ SD. O teste utilizado para avaliar a significância estatística foi *Mann Whitney*.

4.4.4. Correlações entre as concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α em pacientes HCV⁺

Para melhor compreensão do perfil de produção de citocinas pacientes HCV⁺, a correlação entre as concentrações das citocinas no soro também foi determinada. Como mostra a figura 13, observou-se correlação positiva entre as citocinas: IL-2 e IL-4 ($p=0,0494$; $r=0,2375$), IL-2 e IFN- γ ($p<0,0001$; $r=0,8652$), IL-2 e TNF- α ($p=0,0005$; $r=0,4086$), IL-4 e TNF- α ($p<0,0001$; $r=0,6352$), e IFN- γ e TNF- α ($p=0,0004$; $r=0,4129$). Isso demonstra que existe uma dinâmica pertinente nas concentrações das citocinas do perfil T_H 1 sobre o perfil T_H2 em pacientes HCV⁺ não tratados.

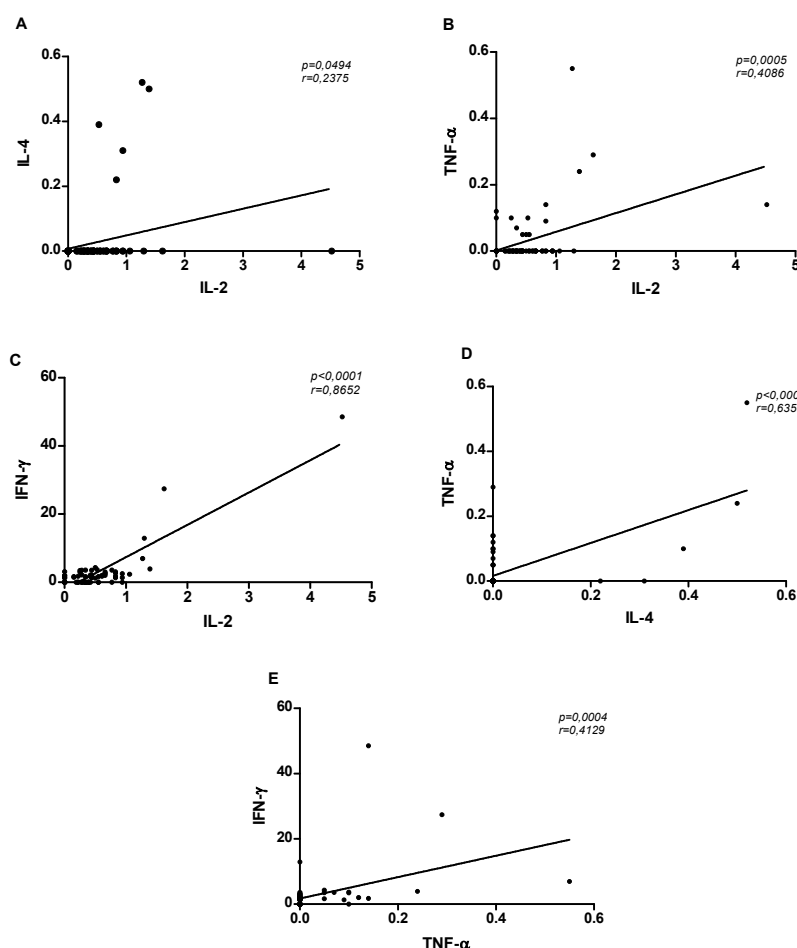


Figura 13. Correlação linear simples entre as citocinas no sangue periférico de pacientes com HCV⁺. A associação entre os níveis séricos de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL17A. Correlações estatisticamente significativas identificadas por análise de *Pearson* são mostrados com índices p e r na figura.

Discussão

5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado maior prevalência da infecção pelo HCV em indivíduos do sexo masculino, com idade acima de 40 anos. Estes dados estão de acordo com trabalho Torres *et al.*, (2009), publicados anteriormente na literatura e nos permite sugerir que estes indivíduos tenham se infectado antes da introdução de métodos diagnósticos importantes em bancos de sangue, de acordo com a Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993 (Brasil,1993).

A infecção pelo HCV é uma doença crônica que pode modificar a dinâmica das células do sangue e do perfil de citocinas. Nesta perspectiva, as mudanças na citocinas séricas estão associadas principalmente a fatores genéticos, tais como polimorfismos em regiões reguladoras de genes de citocinas. A identificação de regiões polimórficas que interferem na concentração de citocinas é algo que tem sido estudado para justificar a suscetibilidade de certos indivíduos que desenvolvem a Hepatite C crônica (CLARK *et al.*, 2011) .

O polimorfismo da IL-28B (rs8103142) tem sido relacionado com a eliminação do vírus C (BELLANTI *et al.*, 2012). Sendo que o genótipo *TT* está mais associados a esta eliminação viral citada anteriormente (CLAUSEN *et al.*, 2011). No entanto, estes dados não são conclusivos na literatura. Diante do descrito anteriormente, tivemos o interesse em analisar a frequência do polimorfismo de IL-28B na nossa população de estudo. Os resultados demonstraram que o genótipo *CT* apresentou-se mais frequente, seguido dos genótipos *CC* e *TT*, tanto na população controle quanto em pacientes HCV⁺. Em contraste aos resultados encontrados, Pedergrana *et al.*, (2011), demonstraram em uma população de 261 pacientes egípcios HCV⁺ que a maioria dos indivíduos que conseguiram eliminar o vírus C apresentou o genótipo *TT*, que foi associado a altos níveis séricos de IL-28B, seguido do genótipo *CT* e *CC*.

No entanto, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram observados por Martinez-Gómez *et al.*, (2012), quando estudaram 83 pacientes mexicanos HCV⁺ que não apresentaram resposta virológica sustentada e com genótipo *CT*, seguido de *CC* e *TT*. Em nosso estudo foi observado que a maioria dos pacientes respondeu na 4^a semana de tratamento com IFNpeg e ribavirina, (dados não mostrados), no entanto não foi avaliado o perfil de resposta desta população seis meses após o término do tratamento. Desta forma não pode-

se concluir a correlação dos genótipos encontrados com a resposta virológica sustentada. Por outro lado, nesta população foi encontrado maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3 e 2 do HCV. Como descrito na literatura, o genótipo 1 está associado a cronificação da hepatite C, assim como a menor resposta ao tratamento preconizado (FERRAZ, 2010).

Segundo estudo realizado por Ge *et al.*, (2009), ao estudarem 96 indivíduos em três grupos independentes (euro-americanos, afro-americanos e hispânicos) observaram que o SNP rs 8103142, que está localizado na região de codificação de dois exons, resulta na mudança de um único aminoácido de lisina por arginina na posição 70 (K70R) do cromossomo 19. De acordo com a Clark *et al.*, (2011), esta substituição pode reduzir potencialmente a ligação da IL-28B ao receptor correspondente ou até mesmo a estabilidade desta citocina, o que afetaria diretamente a ação da IL-28B sobre a ativação das vias de sinalização STAT 1 e 2, o que provocaria a diminuição na produção de proteínas anti-virais que podem estar relacionadas aos efeitos de depuração do HCV. Porém, no presente estudo não foi possível analisar a produção de IL-28B nas amostras estudadas por limitações técnicas, impedindo assim a correlação entre a produção desta citocina e os genótipos de IL-28B encontrados.

Outra citocina importante na infecção pelo HCV é o TNF- α (HIROISHI *et al.*, 2010). Para este estudo foi avaliado o polimorfismo -308TNF α . Os dados encontrados estão em concordância com os resultados observados por Trujillo-Murillo *et al.*, (2010). O genótipo GG apresentou-se mais frequente, seguido dos genótipos GA e AA, tanto na população controle quanto na população de pacientes HCV⁺, assim como descrito por Trujillo-Murillo *et al.*, (2010) e citado anteriormente.

Para avaliarmos a possível influência do polimorfismo na região promotora do gene da citocina TNF- α sobre a produção desta citocina, analisou-se a concentração sérica da mesma. Os dados demonstraram que pacientes com o genótipo GA apresentaram maior concentração de TNF- α em relação aos indivíduos saudáveis (controles), sugerindo a influência deste genótipo na produção e liberação desta citocina. Estes dados estão em concordância com os resultados de Abraham *et al.*, (1999), no qual observaram influência do genótipo GA/AA sobre a concentração sérica do TNF- α .

Dados descritos por Tilg & Moschen (2011), sugeriram que o polimorfismo -308TNF α pode estar relacionado à persistência do vírus C e progressão da doença, tendo em vista que esta citocina está relacionada a injúria tecidual hepática. Na população de pacientes estudados foram observados diferentes graus de fibrose hepática (dados não mostrados), o que poderia estar relacionado ao aumento de TNF- α observado neste estudo.

De acordo com Dai *et al.*, (2006) em uma população de 250 pacientes com Hepatite C crônica de origem tailandesa, observaram a frequência dos genótipos GG, GA, AA bem como a relação entre o genótipo AA, que foi associado a altos níveis séricos desta citocina, com o aumento do grau de fibrose e baixos níveis de RNA do vírus C, quando comparados com os demais genótipos encontrados naquela região. Este resultado indica que o TNF- α , apresenta propriedades imunológicas a agentes infecciosos e pode inibir a replicação do HCV. Vale ressaltar que na população (pacientes HCV⁺ e controles) estudada no presente trabalho não foi encontrado o genótipo AA, o que poderia estar relacionado a particularidades da população do Estado do Amazonas ou ao tamanho amostral.

Por outro lado, Santovito *et al.*, (2012), demonstraram que indivíduos oriundos do Norte da Costa do Marfim com doença hepática relacionada ao HCV, apresentavam o genótipo GA mais frequente, seguido de GG e AA. A frequência aumentada do genótipo heterozigoto no gene desta citocina pode estar associada à seleção natural frente aos agentes infecciosos da região do leste da África.

Os dados publicados por Valenti *et al.*, (2005), também apresentaram-se controversos ao nosso estudo. Estes autores demonstraram que pacientes do Norte da Itália com doença hepática relacionada ao HCV, não apresentavam diferenças significativas na produção de TNF- α entre os pacientes HCV⁺ e grupo controle. Ainda no mesmo estudo, observaram que o genótipo mais frequente foi AA, seguido de GA e GG.

Outra citocina importante na evolução da infecção pelo HCV⁺ é a IL-6. Neste estudo analisamos o polimorfismo -174/IL6 e foi observado que o genótipo GG apresentou-se mais frequente, seguido dos genótipos GC e CC, tanto na população controle quanto na população de pacientes HCV⁺.

Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira *et al.*, (2011), em uma população de 55 mulheres idosas residentes de uma comunidade em Belo

Horizonte, no qual foi observado que o genótipo GG apresentou-se em maior frequência, seguido dos genótipos GC e CC.

Dados publicados por Falletti *et al.*, (2010), apresentaram resultados semelhantes ao nosso trabalho, sendo o genótipo GG mais prevalente, seguido de GC e CC. Além disso, estes autores observaram que estes 121 pacientes HCV⁺ estudados, caucasianos, oriundos da Itália, apresentavam níveis de alanina aminotransferase próximos da normalidade e com fibrose escore menor que 4 (<4). Estes autores sugeriram uma relação entre o genótipo GG, a produção de IL-6 e fibrose hepática.

Ao analisarmos o perfil de produção da IL-6, observamos que pacientes dos genótipos GG e GC apresentaram maior concentração desta citocina em relação ao controle, sugerindo uma possível influência do polimorfismo na região promotora do gene da citocina IL-6 sobre a produção desta citocina. Em concordância com estes resultados, Burzotta *et al.*, (2001) e Belluco, *et al.*, (2003), também sugeriram a influência dos genótipo GG/GC sobre as concentrações séricas da IL-6 em pacientes HCV⁺.

Ainda, de acordo com dados observados por Barret *et al.*, (2003), em uma população de 158 mulheres irlandesas, o genótipo GG foi associado a persistência do vírus enquanto o genótipo CC, que está associado a baixos níveis séricos desta citocina, foi relacionado à eliminação viral, o que sugere que a presença do alelo C pode ter um efeito protetor contra o vírus da Hepatite C.

Resultados controversos foram relatados por Milton *et al.*, (2005), no qual não observaram nenhuma associação do marcador -174IL6 com a eliminação do vírus em 606 pacientes ingleses.

Para o polimorfismo -1082IL10, a frequência dos genótipos observados em nosso estudo foi : AA, AG e GG, tanto no grupo controle como em pacientes HCV⁺.

Ao analisarmos a possível influência do polimorfismo na região promotora do gene da IL-10, pode-se observar que, não houve diferenças significativas nas concentrações desta citocina relacionadas aos genótipos estudado neste polimorfismo. Estes dados corroboram os resultados de Constantini *et al.*, (2002), no qual não observaram influência dos genótipos AA, AG e GG sobre a concentração sérica da IL-10 em pacientes HCV⁺.

Diferentes dos dados encontrados em nosso trabalho, Kusumoto *et al.*, (2006), ao estudarem uma população de 460 japoneses, no qual, 364 eram pacientes crônicos e 114 eram indivíduos que eliminaram o vírus espontaneamente. Nesta população não foi observada a presença do alelo GG, que está associado a altos níveis séricos desta citocina. Os demais genótipos GA e AA apresentaram-se semelhantes tanto no grupo de pacientes crônicos quanto em indivíduos que eliminaram o vírus de forma espontânea.

No Brasil, segundo dados publicados por Ramos *et al.*, (2012), verificou-se que numa população de 178 indivíduos, oriundos do Rio de Janeiro, dos quais, 161 eram pacientes com Hepatite C crônica, foi observado que, o genótipo AA apresentou-se em maior frequência, seguido dos genótipos AG e GG, enquanto no grupo de 18 pacientes com Hepatite C aguda que, progrediram para cura, a frequência genotípica desta população apresentou o genótipo AA em maior frequência, seguido dos genótipos AG e GG, sendo estatisticamente significativos. Ainda no mesmo estudo, os autores sugeriram que o genótipo AA está associado a baixos níveis séricos desta citocina, o que pode influenciar na resposta contra o vírus C.

Para melhor compreensão da infecção pelo HCV⁺, o perfil de citocinas foi determinado frente aos diferentes genótipos do vírus C. Os dados demonstraram que pacientes HCV⁺ apresentaram maior concentração de IL-2, IL-6, IFN- α e IL-17A quando comparadas ao grupo controle, frente aos diferentes genótipos do vírus. Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas na produção de IL-4, IL-10, TNF- α entre ambos os grupos, controle e HCV⁺, mesmo quando analisado em relação aos diferentes genótipos do vírus C. Estes dados sugerem que na infecção pelo HCV parece haver um predomínio do perfil T_H1/T_H17 sobre o perfil T_H2 o que poderia estar relacionado a uma regulação da resposta imune nestes indivíduos.

Nossos dados divergem de Wan *et al.*, (2009), que ao estudar uma população de indivíduos HCV⁺ oriundos de Taiwan, verificou concentrações elevadas de IL-2, IFN- α e TNF- α nesses indivíduos antes e depois do tratamento com ribavirina e interferon peguilado. Ainda, neste mesmo trabalho foi observado que os indivíduos que não conseguiram eliminar o vírus após tratamento apresentaram concentrações elevadas de citocinas com perfil T_H1/T_H2.

Nossos dados também divergem dos resultados obtidos por Najafizadeh *et al.*,(2006), que ao estudar 54 pacientes HCV⁺ e controles provenientes de Azerbaijan observaram que as concentrações das citocinas IL-2, IFN- α e TNF- α maiores em pacientes infectados pelo vírus C que nos indivíduos controles, com significância estatística apenas para a citocina TNF- α .

A correlação positiva entre as citocinas TNF- α /IL-2 em pacientes infectados com HCV corroboram os dados publicados por Najafizadeh *et al.*,(2006), que também observaram correlação entre estas citocinas. Estes dados sugerem que a presença do TNF- α associado a produção da IL-2 pode contribuir para ação da imunidade inata em estimular uma resposta imune adaptativa capaz de eliminar o vírus naturalmente. Outro dado importante foi observado na relação entre as concentrações de citocinas IFN- γ / IL-2 que, segundo dados do presente estudo estão de acordo com os autores citados anteriormente, que sugerem que o aumento destas citocinas estão relacionados com o aumento do grau de injúria no tecido hepático.

Desta forma, pode-se observar ação sinérgica do TNF- α /IL-2 /IL-4 sugerindo que existe uma interação entre estas citocinas a fim de que o sistema imune gere células de memória e produção de anticorpos específicos para o vírus da Hepatite C.

Sabe-se muito pouco sobre a ação de IL17A no curso da Hepatite C, porém, dados semelhantes aos obtidos em nosso estudo foram encontrados por Ge Jian *et al.*, (2009), no qual observaram concentração significativamente aumentada da IL17A em pacientes com Hepatite B quando comparados com indivíduos controles.

Segundo dados publicados por Hammad *et al.*,(2013), afirmam que existe associação das citocinas IL-6 e IL-17 com a exacerbação progressiva da lesão hepática induzida pelo vírus HCV .

No Brasil, pouco foi estudado a respeito dos perfis genéticos de citocinas em pacientes com Hepatite C crônica bem como suas influências durante o agravamento da doença. Desta forma, o presente estudo pode vir a somar juntamente com os estudos genéticos da população Amazônica, a fim de compreender melhor a dinâmica das citocinas nesta infecção.

Conclusão

CONCLUSÃO

- Há evidências de que o perfil de citocinas observado em pacientes HCV⁺ é predominantemente do perfil T_H1/T_H17 sobre o perfil T_H2;
- Pacientes com genótipo *-308TNFα GA* apresentaram maior concentração de TNF-α em relação aos indivíduos saudáveis (controles), sugerindo a influência deste genótipo na produção e liberação desta citocina;
- Pacientes com genótipo *-308TNFα GA* e *-174IL6 GG/GC* apresentaram maior concentração de TNF-α e IL-6, sugerindo a influência destes genótipos na produção e liberação destas citocinas. Por outro lado, não foram observadas associações significativas entre as frequências genotípicas *-1082IL10* e as concentrações de citocinas em pacientes HCV⁺.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, LJ & Kroeger, KM. **Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease.** *Journal of Leukocyte Biology* 66(4): 562-566, 1999

Alter, MJ. **Epidemiology of hepatitis c virus infection.** *World Journal Gastroenterology* 13 (17): 2436-2441, 2007

Araújo, AR; Almeida, CM; Fraport L., Garcia N, Lima TA, Maia LPV, Torres KL, Tarrago AM, Victória F, Tatenó A, Levi JE, Talhari S, malheiro A. **Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite Crônica: genótipos no Estado do Amazonas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(5) 638-640, 2011

Araújo, ARS. **Perfil imunológico de pacientes com hepatite c crônica antes e durante o tratamento com interferon alfa e ribavirina.** Dissertação. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2010

Ashfaq, U; Javed, T; Rehman, S; Nawaz, Z; Riazuddin, S. **An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses.** *Journal of Virology* 8:161, 2011

Barrett, S; Collins, M; Kenny, C; Ryan, E; Keane, CO; Crowe, J. **Polymorphisms in Tumour Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- β , Interleukin-10, Interleukin-6, Interferon- γ and Outcome of Hepatitis C Virus infection.** *Journal of Medical Virology* 71(2): 212-218, 2003

Behrens, SF; Tomei, L; De Francesco, R. **Identification and properties of the RNA –dependent RNA polymerase of hepatitis C virus.** *The EMBO Journal* 15(1):12-22, 1996.

Bellanti, F; Vendemiale, G; Altomare, E; Serviddio, G. **The Impact f Interferon Lambda 3 Gene Polymorphism on Natural Course and Treatment of Hepatitis C.** *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1-9, 2012

Belluco, C; Olivieri, F; Bonafe, M; Giovagnetti, S; Mammano, E; Scarleta, R; Ambrosi, A; Franceschi, C; Nitti, D; Lise M. **-174 G>C Polymorphism of Interleukin 6 Gene Promoter Affects Interleukin 6 Serum Level in Patients with Colorectal Cancer.** *Clinical Cancer Research* 9: 2173, 2003

Bernardini, AP. **Geografic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38(1): 41-9, 2005

Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim Epidemiológico: Hepatites Virais.** Ministério da Saúde, Brasília, 82: 2011

Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Publicada no Diário Oficial da União em 02/12/1993.** Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> - Acesso em 18 de março de 2013.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Relatório de Recomendação da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC-01.** Ministério da Saúde, Brasília, 2012

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções.** Ministério da Saúde, Brasília, 2011

Bukh, J; Miller, RH; Purcell, RH. **Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes.** *Seminars in Liver Disease* 15(1): 41- 63, 1995

Burzotta, F; Lacoviello, L; Di Castelnuovo, A; Glieca, F; Luciani, N; Zamparelli, R; Schiavello, R; Donati, MB; Maseri, A; Possati, G; Andreotti, F. **Relation of the -174 G/C Polymorphism of Interleukin -6 to Interleukin -6 Plasma Levels and to Length of Hospitalization After Srgical Coronary Revascularization.** *The American Journal of Cardiology* 88(10): 1125-1128, 2001

Campiotto, S; Pinho, JRR; Carrilho, FJ; Da Silva, LC; Souto, FJD; Spinelli, V; Pereira, LMMB; Coelho, HSM; Silva, AO; Fonseca, JC; Rosa, H; Lancet, CMC; Bernardini AP. **Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38(1): 41-49, 2005

Chen, JY; Lin, CY; Wang, CM; Lin, YT; Kuo, SN; Shiu, CF; Chang, SW; Wu, J; Sheen, IS. **IL28B genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon- α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection.** *Genes and Immunity* 12: 300-309, 2011

Chomczynski, P & Sacchi, N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol- chloroform extraction: twenty-something years on.** *Nature Protocols* 1: 581-585, 2006

Clark, P; Thompson, A; McHutchison J. **IL-28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis c infection: The future of personalized HCV therapies.** *The American Journal Gastroenterology*. 106: 38-45, 2011

Clark, PJ & Thompson, A. **Host genomics and HCV treatment response.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 27: 212-222, 2012

Clausen, LN; Weis, N; Astvad, K; Schonning, K; Fenger, M; Krarup, H; Bukh, J; Benfield, T. **Interleukin-28B polymorphisms are associated with hepatitis C virus clearance and viral load in a HIV-1-infected cohort.** *Journal of Viral Hepatitis* 18(4): e66-e74 , 2011

Coelho-Castelo, AAM; Trombone, APF; Rocha, CD; Lorenzi, JCC. **Resposta imune a Doenças Infeciosas.** *Medicina* 42(2): 127-142, 2009

Constatini, PK; Wawrzynowicz-Syczewska, M; Clare, M; Kaczmarek, AB; MacFarlane, IG; Cramp, ME; Donaldson, PT. **Interleukin-1, interleukin -10 and tumour necrosis factor alpha polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy.** *Liver* 22: 404-412, 2002

Chuang JY; Yang SS; Lu YT; Hsieh YY; Chen CY; Chang SC; Chang CS; Yeh HZ; Kao JH. **IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients.** *Digestive liver disease*. 41(6):424-30. 2009

Cussigh, A; Falletti, E; Fabris, C; Bitetto, D; Cmet, S; Fontanini, E; Bignulin, S; Fornasiere, E; Fumolo, E; Minisini, R; Pirisi, M; Toniutto, P. **Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C** *Immunogenetics*, 66: 33-41, 2011

Cunha, LKH ; Kashima, Simone ; Amarante, MFC ; R Hadad ; Rodrigues, E S ; Silva, KLT ; de Lima, Tatiane Amabile ; Castro, DB ; Brito, FC ; Almedia, E. G. ; Cova, D ; Covas, Dimas Tadeu ; Malheiro, A. **Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the state of Amazonas, Brazil, and subtype C identification.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45, p. 104-112, 2012.

Dai, C-Y; Chuang, W-L; Lee, L-P; Chen, S-C; Hou, N-J; Lin, Z-Y; Hsieh, M-Y; Wang, L-Y; Chang, W-Y; Yu, M-L. **Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -380 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C.** *Journal of Viral Hepatitis* 13: 770-774, 2006

Dao Thi, VL; Dreux, M; Cosset, FL. **Scavenger receptor class B type I and the hypervariable region-1 of hepatitis C virus in cell entry and neutralization.** *Expert Reviews in Molecular Medicine* 13: e13-e33, 2011

Diegelmann, J; Beigel, F; Zitzmann, K; Kaul, A; Göke, B; Auernhammer, CJ; Bartenschlager, R; Diepolder, HM; Brand, S. **Comparative Analysis of the Lambda-Interferons IL-28A and IL-29 regarding Their Transcriptome and Their Antiviral Properties against Hepatitis C Virus.** *Plos One* 5: 1-13, 2010

Edwards-Smith, CJ; Jonsson, JR; Purdie, DM; Bansal, A; Shorthouse, C; Powell, EE. **Interleukin-10 Promoter Polymorphism Predicts Initial Response of Chronic Hepatitis C to Interferon Alfa.** *Hepatology* 30(2): 526-530, 1999

Español, I; Gallego, A; Enríquez, J; Rabella, N; Lerma, E; Hernández, A; Pujol-Moix, N. **Thrombocytopenia associated with liver cirrhosis and hepatitis C viral infection: role of thrombopoietin.** *Hepato-gastroenterology* 47(35):1404-1406, 2000

Evans, MJ; Von Hahn, T; Tscherne, DM; Syder, AJ; Panis, M; Wölk, B; Hatzioannou, T; McKeating, JA; Bieniasz, PD; Rice, CM. **Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry.** *Nature* 446: 801–805, 2007

Fallahi, P; Ferri, C; Ferrari, SM; Corrado, A; Sansonno, D; Antonelli, A. **Cytokines and HCV-Related Disorders.** *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1-10, 2012

Falleti, E; Fabris, C; Vandelli, C; Colletta, C; Cussigh, A; Smirne, C; Fontanini, E; Cmet, S; Minisini, R; Bitetto, D; Toniutto, P; Pirisi, M. **Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C.** *Human Immunology* 71(10): 999-1004, 2010

Falleti, E; Bitetto, D; Fabris, C; Cussigh, A; Fornasiere, E; Cmet, S; Fumolo, E; Bignulin, S; Fontanini, E; Cerutti, A; Minisini, R; Pirisi, M; Toniutto, P. **Role of interleukin 28B rs 12979860 C/T polymorphism on the histological outcome of chronic hepatitis c: relationship with gender and viral genotype.** *Journal of Clinical Immunology* 31:891-899, 2011

Ferraz, MLG. **Hepatite C. Programa de Educação Médica Continuada.** *Sociedade Brasileira de Hepatologia* 3-6, 2010

Fishman, D; Faulds, G; Jeferry, R; Mohamed –Ali, V; Yudkin, JS; Humphries, S; Woo, P. **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. *Journal of Clinical Investigation* 102: 1369-1376, 1998

Gale, Jr M & Foy, EM. **Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus.** *Nature* 436(7053): 939-45, 2005

Ge, D; Fellay, J; Thompson, A; Simon, J; Shianna, K; Urban, T; Heinzen, E; Qiu, P; Betelsen, A; Muir, A; Sulkowski, M; McHutchison, J; Goldstein, D. **Variação genética no *IL28B* como preditor de clearance viral induzida pelo tratamento da hepatite C.** *Nature* 461: 399- 401, 2009

Ge, J; Wang, K; Meng, Q-H; Qi, Z-X; Meng, F-L; Fan, Y-C. **Implication of Th17 and Th1 Cells in Patients with Chronic Active Hepatitis B.** *Journal of Clinical Immunology* 30: 60-67, 2010

Hammad, LN; Abdelraouf, SM; Hassanein, FS; Mohamed, WA; Schaalán, MF. **Circulating IL-6, IL-17 and vitamin D in hepatocellular carcinoma: Potential biomarkers for a more favorable prognosis?** *Journal of Immunotoxicology* 2013:1-7, 2013

Hammerich, L; Heymann, F; Tacke, F. **Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases.** *Clinical and Developmental Immunology* 2011:1-12, 2011

Hiroishi, K; Ito, T; Imawari, M. **Immune Responses in Hepatitis C infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence.** *Journal, Gastroenterology and Hepatology* 23: 1473-1482, 2008

Hiroishi, K; Eguchi, J; Ishii, S; Hiraide, A; Sakaki, M; Doi, H; Omori, R; Imawari, M. **Immune Responses vaccine Developmente for hepatitis C virus infection.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010: 1-10, 2010

Holmes, CL; Russell, JA; Walley, KR. **TherapyShock: Role in Prognosis and Potential for Genetic Polymorphisms in Sepsis and Septic.** *CHEST Journal* 124: 1103-115, 2003

Jarvis, SM; Thorn, JA; Glue, P. **Ribavirin uptake by human erythrocytes and the involvement of nitrobenzylthioinosine-sensitive (es)-nucleoside transporters.** *British Journal of Pharmacology* 123: 1587-1592, 1998

Jensen, D & Pol, S. ***IL28B* genetic polymorphism testing in the era of direct acting antivirals therapy for chronic hepatitis C: ten years too late?** *Liver International* 32(s1):74-78, 2012

Jong, BA; Westendorp, RGJ; Bakker, AM; Huizinga, TWJ. **Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF) – gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production.** *Genes and Immunity* 3: 25-29, 2002

Knapp, S; Hennig, BJW; Frodsham, AJ; Zhang, L; Hellier, S; Wright, M; Goldin, R; Hill, AVS; Thomas, HC; Thursz, MR. **Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection.** *Immunogenetics* 55: 362-369, 2003

Kotenko, SV; Gallagher, G; Baurin, VV; Lewis-Antes; Shen, M; Shan, NK; Langer, JA; Sheikh, F; Dicknsheets, H; Donnelly, RP. **IFN- λ mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.** *Nature Immunology* 4: 69-77, 2003

Kusumoto, K; Uto, H; Hayashi, K; Takahama, Y; Nakao, H; Suruki, R; Stuver, SO; Ido, A; Tsubouchi, H. **Interleukin-10 or tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan.** *Cytokine* 4(1): 69-77, 2006

Lauer, GM & Walker, BD. **Hepatitis C virus infection.** *The New England Journal of Medicine* 345(1): 41-52, 2001

Lavanchy, D. **Evolving epidemiology of hepatitis c virus.** *Clinical Microbiology and Infectious Disease* 17(2): 107-115, 2011

Martinez-Gómez, LE; Chávez-Tapia, NC; Burguete-Garcia, AI; Aguilar-Olivos, N; Madrid-Marina, V; Román-Bahena, M; Orbe-Orihuela, C; Misael, U; Méndez-Sánchez, N. **IL28B polymorphisms predict the response to chronic hepatitis C virus infection treatment in a Mexican population.** *Annals of Hepatology* 11(6): 876-881, 2012

Martins, T; Narciso- Schiavon, JL; Schiavon, LL. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Revista da Associação Brasileira de Medicina* 57(1): 105-110, 2010

Melo, E. **Influencia dos polimorfismos no promotor do gene da interleucina -10 na resposta a antivirais em pacientes com hepatite C crônica.** Dissertação. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008

Minton, EJ; Smillie, D; Smith, P; Shipley, S; MCKendrick, MW; Gleeson, DC; Underwood, JCE; Cannings, C; Wilson, AG; The Trent Hepatitis C Study Group. **Clearance of Hepatitis C Virus Is Not Associated With Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 Genes.** *Human Immunology* 66(2): 127-132, 2005

Moradpour, D; Penin, F; Rice, CM. **Replication of Hepatitis C virus.** *Nature* 5: 453-63, 2007

Murphy, D; Chamberland, J; Dandavino, R; Sablon, E. **A new genotype of hepatitis C virus originating from central Africa.** *Hepatology* 46: 623A, 2007

Najafizadeh, M; Farhadi, N; Sarkari, B. **Th1 Cytokine Profiles in Hepatitis C Virus Infected Patients and Their Contributions to Inflammatory Responses.** *Shiraz E-Medical Journal* 8(1): 22-27, 2007

Nattermann, J; Vogel, M; Nischalke, HD; Danta, M; Mauss, S; Stellbrink, H-J; Baumgarten, A; Mayr, C; Bruno, R; Tural, C; Klausen, G; Clotet, B; Naumann, U; Lutz, T; Rausch, M; Schewe, K; Bienek, B; Haerter, G; Sauerbruch, T; Rockstroh, J; Spengler, U. **Genetic Variation in IL28B and treatment-induced clearance of hepatitis c virus in HIV-positive patients with acute and chronic hepatitis c.** *The Journal of Infectious Diseases* 203: 595-601, 2011

Oliveira Filho, AB; Pimenta, ASC; Rojas, MFM; Chagas, MCM; Crespo, DM; Crescente, JAB; Crespo, DM; Lemos, JAR. **Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Para, Northern Brazil.** *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 105(1): 103-106, 2010

OMS-Organização Mundial da Saúde. **Hepatitis C.** Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>. Acesso em 15 de maio de 2011

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Hepatitis C.** Publicação informal, 1- 4, 2012

OMS - Organização Mundial da Saúde. **World Health Statistics**, 36, 2012

Paladino, N; Flores, AC; Marcos, CY; Fainboim, H; Theiler, G; Arruvito, L; Williams, F; Middleton, D; Fainboim, L. **Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus.** *Tissue Antigens* 69(1): 109-11, 2007

Paltanin, LF & Reiche, EM. **Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil.** *Revista de Saúde Pública* 36: 393-399, 2002

Pedergnana, V; Abdel-Hamid, M; Guernon, J; Mohsen, A; Fouler, LL; Theodorou, L; Mohamed, MK; Fontanet, A; Plancoulaine, S; Abel, L. **Analysis of IL28B Variants in an Egyptian Population Defines the 20 Kilobases Minimal Region Involved in Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus.** *Plos One* 7(6): e385782012, 2012

Penin, F; Brass, V; Appel, N; Ramboarina, S; Montserret, R; Ficheux, D; Blum, HE; Bartenschlager, R; Moradpour, D. **Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A.** *Journal of Biological Chemistry* 279(39): 40835-40843, 2004

Pereira, SS; Garcia, DM; Narciso, FMS; Santos, MLAS; Dias, JMD; Queiroz, BZ; Souza, ER; Nóbrega, OT; Pereira, LSM. **Effects of -174 G/C polymorphism in the promoter region of the interleukin-6 gene on plasma IL-6 levels and muscle strength in elderly women.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44(2):123-129, 2011

Perkins J. **Medical and Scientific Illustrations.** Disponível em: <http://www.people.rit.edu> Acesso em 15 de maio de 2011

Perlemuter, G; Budkowska, A; Bréchet, C; Lotteau, V. **Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism.** *Seminars in Liver Disease* 25: 93–104, 2005

Ramos, JA; Silva, R; Hoffman, L; Ramos, ALA; Cabello, PH; Urményi, TP; Villella-Nogueira, CA; Lewis-Ximenez, L; Rondinelli, E. **Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro.** *BMC Research Notes* 5: 508, 2012

Ricon, JL; Anguita, J; Nakamura, T; Fikig, E; Flavel, R. **Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4 producing CD4+ T cells.** *Journal of Experimental Medicine* 185(3): 461-470, 1997

Santovito, A; Cervella, P; Schleicherova, D; Delpero, M. **Genotyping for cytokine polymorphisms in a Northern Ivory Coast population Reveals a high frequency of the heterozygote genotypes for the TNF- α -308G/A SNP.** *International Journal of Immunogenetics* 39(4): 291-295, 2012

Saraiva, M & O'Garra, A. **The regulation of IL-10 production by immune cells.** *Nature* 10: 170-181, 2010

Sawada, L; Pinheiro, AC; Locks, D; Pimenta, ASC; Rezende, PR; Crespo, DM; Crescente, JA; Lemos, JA; Oliveira Filho, AB. **Distribution of hepatitis C virus genotypes among different exposure categories in the State of Para, Brazilian Amazon.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44(1): 8-12, 2011

Shepard, WC; Finelli, L; Alter, JM. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *The Lancet Infectious Disease* 5: 558-67, 2005

Sheppard, P; Kindsvogel, W; Xu, W; Henderson, K; Schlutsmeyer, S; Whitmore, TE; Kuestner, R; Garrigues, U; Birks, C; Roraback, J; Ostrander, C; Dong, D; Shin, J; Presnell, S; Fox, Brian; Haldeman, B; Cooper, E; Taft, D; Gilbert, T; Grant, FJ; Tackett, M; Krivanm, W; McKnight, G; Clegg, C; Foster, D; Klucher, KM. **IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.** *Nature Immunology* 4: 63-68, 2003

Shi, X; Pan, Y; Wang, M; Wang, D; Li, W; Jiang, T; Zhang, P; Chi, X; Jiang, Y; Gao, Y; Zhong, J; Sun, B; Xu, D; Jinag, J; Niu, J. **IL28B Genetic Variation Is Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus, Treatment Response, Serum IL-28B Levels in Chinese Population.** *Plos One*, 7(5): e37054, 2012

Sugiyama, M; Tanaka, Y; Wakita, T; Mikanishi, M; Mizokami, M. **Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression.** *Plos one* 6: 1-12, 2011

Świątek, BJ. **Is interleukin-10 gene polymorphism a predictive marker in HCV infection?** *Cytokine & Growth Factor Reviews* 23(1-2): 47-59, 2012

Tanaka Y; Nishida N; Sugiyama M; Kurosaki M; Matsuura K; Sakamoto N; Nakagawa M; Korenaga M; Hino K; Hige S; Ito Y; Mita E; Tanaka E; Mochida S; Murawaki Y; Honda M; Sakai A; Hiasa Y; Nishiguchi S; Koike A; Sakaida I; Imamura M; Ito K; Yano K; Masaki N; Sugauchi F; Izumi N; Tokunaga K; Mizokami M. **Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.** *Nature Genetics Journal* 41(10):1105-9, 2009

Tanabe, O; Akira, S; Kamiya, T; Wong, GG; Hirano, T; Kishimoto, T. **Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human.** *The Journal of Immunology* 141(11): 3875-81, 1988

Tang, H & Grise'e, H. **Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis.** *Clinical Science.* 117: 49–65, 2009

Tilg, H & Moschen, AR. **Relevance of TNF- α gene polymorphisms in a nonalcoholic fatty liver disease.** *Expert Reviews of Gastroenterology & Hepatology* 5(2): 155-158, 2011

Tone, M; Powell, MJ; Tone, Y; Thompson, SA; Waldman, H. **IL-10 gene expression is controlled by the manuscption factors Sp1 e Sp3.** *Journal of Immunology* 165(1): 286-291, 2000

Torres, KL; Malheiro, A; Tateno, A; Lima, TA; Maia, LPV; Pimentel, JPD; Morais, MOE; Usui, CSM; Braga, FO; Silva, IAF; Vasquez, F; Levi, JE. **Hepatitis C virus in blood donors, Brazil.** *Emerging Infectious Diseases* 15(4): 676-678, 2009

Trujillo-Murillo, K; Pérez-Ibave, D; Muñoz-Mejía, C; Cordero-Pérez, P; Muñoz-Espinosa, L; Martínéz-Rodríguez, H; Bosques-Padilla, F; Rivas-Estilla, AM. **Prevalence of the -308 and -238 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Promoter Polymorphisms in Mexican Chronic Hepatitis C Patients.** *Revista de Gastroenterologia Mexicana* 75(1): 7-11, 2010

Valenti, L; Pulixi, E; Fracanzani, AL; Dongiovanni, P; Maggioni, M; Orsatti, A; Gianni, C; Fargion, S. **TNF α genotype affects TNF α release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis.** *Journal of Hepatology* 43(6): 944-950, 2005

Vasconcelos, RR; Tengan, FM; Cavaleiro, NP; Ibrahim, K; Pereira, H; Barone, AA. **Fatores associados às formas evolutivas graves da infecção crônica pelo vírus da hepatite C.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(5): 433-438, 2006

Wan, L; Kung, Y-J; Lin, Y-J; Liao, C-C; Sheu, JJC; Tsai, Y; Lai, H-C; Peng, C-Y; Tsai, F-J. **Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients threated with interferon- α .** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379(4): 855-860, 2009

Wölk, B; Sansonno, D; Krausslich, HG; Dammacco, F; Rice, CM; Blum, HE; Moradpour, D. **Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines.** *Journal of Virology* 74(5): 2293-2304, 2000

Yasukawa, K; Hirano, T; Watanabe, Y; Muratani, K; Matsuda, T; Nakai, S; Kishimoto, T. **Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF- 2/IL-6) gene.** *The Embo Journal*. 6(10) 2939-45, 1987

Yee, LJ; Tang, J; Herrera, J; Kaslow, RA; Leeuwen, DJ .**Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection.** *Genes and Immunity* 1(6): 386-90, 2000

ANEXO 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização dos genótipos do HIV em doadores de sangue soropositivos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre os tipos do vírus HIV envolvidos na infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas, promovendo um melhor entendimento sobre a doença.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 10 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus e a confirmação mais segura do diagnóstico da infecção. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a), mas ajudará no conhecimento e na prevenção do HIV.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: O senhor(a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito ao HIV, podendo entrar em contato com as doutoras Kátia Torres e Adriana Malheiro (HEMOAM: Tel: 92-655-0111/ 92-656-0113). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

VOLUNTARIEDADE: A sua participação neste estudo é voluntária, podendo ser retirada a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos posteriores. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras

armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras das características do vírus e de como o corpo convive com a infecção? () Sim ou

() Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)



Manaus, ____/ ____/ ____.

(Impressão dactiloscópica)

ANEXO 02

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

TÍTULO DO PROJETO:

AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DE INDIVÍDUOS COM HEPATITE C CRÔNICA TRATADOS COM INTERFERON ALFA E RIBAVIRINA NA FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DO AMAZONAS

Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa clínica e laboratorial, a ser realizado na fundação de Medicina Tropical do Amazonas em parceria com a Fundação HEMOAM.

Você só deve participar por livre vontade.

Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

Este estudo irá contribuir com informações sobre a resposta imune e os subtipos do vírus da hepatite C que atingem pacientes em todo o Estado do Amazonas, com o objetivo de descrever a evolução clínica e o sistema imunológico (defesas) durante o tratamento da hepatite C.

Para este estudo será coletada amostra de 20ml de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus e conhecer o subtipo envolvido. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM em Manaus e outros na Fundação Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), como a ultrassonografia abdominal e para HIV (o teste de HIV não será utilizado para estudo, ele apenas faz parte da rotina de acompanhamento). A coleta do líquido será realizada por punção em região lombar e a coleta da saliva por um esfregaço oral.

Para as amostras sanguíneas e líquido haverá o desconforto da picada da agulha. Em 10% dos pacientes após a coleta do líquido poderá haver dor de cabeça passageira, dor no local da coleta e dormência transitória nas pernas. A ocorrência

de lesão neurológica com a punção lombar é raríssima. A coleta de saliva e a Ultrassonografia não são exames invasivos e não acarretarão nenhum risco a você. A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o indivíduo, mas ajudará no conhecimento, na prevenção e no acompanhamento de pessoas com hepatite C.

Os indivíduos participantes deste estudo terão, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito ao HCV, podendo entrar em contato com a Dra. Adriana Malheiro e Dr. Ian Lima Feitosa (Tel: 92-3655-0111/ 92-3656-0113/ 92-91792413). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica da Fundação de Medicina Tropical.

A participação neste estudo é voluntária. Os participantes deste estudo podem retirar sua participação a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento na Fundação de Medicina Tropical.

Os dados pessoais referentes à participação dos indivíduos neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgada a identidade dos participantes.

Para eventuais danos decorrentes da pesquisa, a equipe da Fundação de Medicina Tropical e HEMOAM envolvida na pesquisa se propõe a atender os participantes.

USO DE. MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue periférico, líquido e saliva), será utilizado somente para fins de pesquisa e será armazenado para estudos posteriores.

() Autorizo que minhas amostras possam ser armazenadas para estudos posteriores

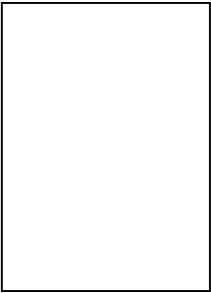
() Não autorizo que minhas amostras possam ser armazenadas para estudos posteriores

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)



Manaus, ____/____/____.

(Impressão dactiloscópica)



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
Cep: 69040-000
Manaus – Amazonas - Brasil



APROVAÇÃO Nº 1845

Registro CEP Nº 0913-07

CAAE – 0031.0.114.112-07

Processo Nº0913/2007-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Avaliação do perfil imunológico de indivíduos com hepatite C crônica tratados com interferon-alfa e ribavirina na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas.

Pesquisador responsável: Ana Ruth Silva de Araújo

Instituição Sediadora: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Instituição Vinculada: HEMOAM

Área Temática Especial: Não se aplica

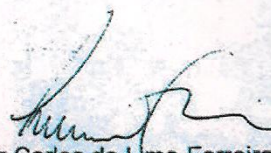
Patrocinador: Não se aplica

Registro para armazen. de mat. Biológico humano: Não se aplica

Ao se proceder à análise relativo do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão do dia 27 de julho de 2007 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 27 de julho de 2007.


Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira
Coordenador de Ética em Pesquisa
FMT-AM

Obs: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page.

ANEXO 04



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP **PARECER – CAAE-0015/2005 – Versão 02/05**

VIII. Identificação

Título: Caracterização dos genótipos do HIV em doadores de sangue soropositivos da Fundação Hemoam

Instituição: HEMOAM

Pesquisador responsável: Luana Karen Holanda da Cunha

Data de reapresentação ao CEP: 07.11.2005

Documentos Encaminhados: Justificativa, Folha de Rosto, Projeto, TCLE, Questionário, Carta Hemocentro Ribeirão Preto, Carta da FAPEAM.

Versão do Protocolo: 02

IX. Objetivos

Geral: Analisar através de técnicas de biologia molecular (PCR) e genotipagem o vírus HIV das amostras dos indivíduos que apresentarem resultado positivo ou indeterminado para HIV, na triagem sistemática dos doadores de sangue da Fundação Hemoam, na cidade de Manaus.

Específico: Analisar através da técnica de PCR, amostras de doadores de sangue que apresentarem WB positivo ou indeterminado para HIV nos testes de triagem sorológica; Genotipar e determinar os subtipos por sequenciamento do vírus HIV nas amostras de doadores de sangue PCR positivas; Determinar o perfil epidemiológico dos subtipos do vírus HIV na população de doadores de sangue da FHEMOAM;

X. Sumário do projeto

O projeto é importante tanto do ponto de vista científico quanto institucional, à medida que busca caracterizar os diferentes genótipos em sorologias HIV positivas em doadores de sangue desta Fundação

XI. Comentários do CEP:

Os pesquisadores apresentaram os documentos solicitados e algumas modificações sugeridas no parecer anterior. Porém, solicitamos que, para garantir a confidencialidade do estudo, seja retirado do formulário de informações epidemiológicas o nome e telefone de contato do sujeito da pesquisa, pois o mesmo pode ser identificado pelo número da bolsa.

Sugerimos que o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresente claramente em forma de pergunta se o sujeito concorda com a guarda do material biológico para estudos posteriores podendo ser da seguinte forma:

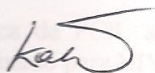
“O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras das características do vírus e de como o corpo convive com a infecção? () Sim ou () Não”

XII. Parecer do CEP:

Pendente. O pesquisador tem 60 dias para responder aos quesitos formulados pelo CEP em seu parecer. Após esse prazo o projeto será considerado retirado e posteriormente havendo interesse, deverá ser apresentado novo protocolo e reiniciado o processo de registro.

XIII. Data da Reunião: 18. 11.2005

XIV. Data do parecer: 25.11.2005



KÁTIA LUZ TORRES SILVA
Coordenadora CEP/HEMOAM

ANEXO 05

POLIMORFISMO DO GENE DE IL -28B: MARCADOR PREDITOR DE *CLEARANCE* DO VÍRUS DA HEPATITE C?

Andréa Monteiro Tarragô^{1,2}, Aya Sadahiro^{1,3}, Adriana Malheiro^{1,2}

1. Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM.

2. Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, Manaus, AM.

3. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, Manaus, AM.

Endereço para Correspondência: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOA) – Bloco A: Departamento de Ensino e Pesquisa, Av. Constantino Nery, Nº 4.397, CEP: 69050-002, Bairro: Chapada, Manaus, Amazonas, Brasil;

Tel: 55 92 3655-0013; 55 92 9136-0001

e-mail: malheiroadriana@yahoo.com; Tel: 55 92 9136-0001.

RESUMO

A Hepatite C é um problema de saúde pública que afeta mais de 150 milhões de pessoas no mundo. É uma doença causada por vírus RNA, de prognóstico variável que pode evoluir para cura ou para o desenvolvimento de Hepatite C crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte. Uma vez estabelecida a infecção crônica pelo vírus C, cerca de 50 a 85% dos casos de infecção pelo HCV evoluem para a infecção crônica enquanto apenas 10 a 20% dos indivíduos infectados conseguem eliminar o vírus espontaneamente. Dados que demonstram envolvimento do perfil genético do hospedeiro, como um dos fatores associados à evolução da doença pós infecção viral. Neste contexto, sabe-se que existem polimorfismos de genes que podem alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias e, assim contribuir ou não para persistência do vírus. Dos genes de citocinas investigados para hepatite C, o polimorfismo na região regulatória do gene *IL28B* tem sido indicado como preditor do “Clearance” viral, justificando em parte o insucesso da terapia com PegIFN- α associado a ribavirina.

DESCRITORES: vírus da Hepatite C, *IL28B*, Fator de transcrição STAT1, Fator de transcrição STAT2, Fator de transcrição STAT3.

ABSTRACT

Hepatitis C is a public health problem that affects over 150 million people worldwide. It is a disease caused by RNA viruses, prognostic variable that can lead to healing or the development of chronic hepatitis C, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death. Once established chronic infection by hepatitis C virus, about 50 to 85% of cases of HCV infection progress to chronic infection whereas only 10-20% of infected individuals are able to clear the virus spontaneously data demonstrating the involvement of host genetic profile as one of the factors associated with progression of disease after viral infection. In this context, it is known that polymorphisms of genes exist and can alter the production of pro-inflammatory cytokines and contribute or not to the persistence of the virus. Polymorphisms of cytokine genes in the regulatory region of the IL28B were investigated for hepatitis C and it has been indicated as a predictor of viral clearance, explaining in part the failure of therapy with PegIFN- α combined with ribavirin.

KEY WORDS: Hepatitis C virus, IL28B, STAT1 transcription factor, STAT2 transcription factor, STAT3 transcription factor.

INTRODUÇÃO

A hepatite C é um grave problema de saúde pública mundial. É uma doença infecciosa, causada por um flavivirus-RNA, vírus da hepatite C (HCV), com evolução clínica muito variável, desde a cura ao desenvolvimento da hepatite C crônica, cirrose hepática, carcinoma hepatocelular e morte. Estima-se que em torno de 150 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo o vírus C e que mais de 350 mil pessoas morrem a cada ano (WHO, 2012).

A infecção pelo vírus C é considerada um dos fatores responsáveis por 20 % das mortes por câncer em países de baixa e média renda, e 9% das mortes por câncer em países de alta renda (WHO, 2012). Além disso, é a principal causa de transplante de fígado em países desenvolvidos, sendo considerada a infecção crônica mais comum transmitida por transfusão sanguínea nos Estados Unidos (Shepard et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária para hepatite C, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10%. Entretanto, estudos de base populacional e com doadores de sangue revelam prevalências inferiores às estimadas (1,4%), colocando o Brasil como país de baixa endemicidade (Lavanchy et al., 2011). Com base nos dados publicados em 2002, provenientes da rede de hemocentros, a distribuição da soroprevalência da hepatite C variou entre as regiões brasileiras: 0,62% no Norte, 0,55% no Nordeste, 0,28% no Centro-Oeste, 0,43% no Sudeste e 0,46% no Sul (Paltanin et al., 2002), .

Quanto aos sintomas da doença, inicialmente apresenta-se de forma assintomática, oligossintomática ou associada a sintomas inespecíficos e, geralmente o diagnóstico é acidental, ocorrendo, em alguns casos, durante triagem sorológica para doação de sangue ou exames médicos de rotina (Ferraz, 2010).

A partir do momento que a infecção por HCV é estabelecida, mais de 80% dos casos evoluem para infecção crônica, apresentando complicações, e cerca de 10 a 20% conseguem eliminar o vírus (Gale Jr & Foy, 2005).

Acredita-se que o processo de eliminação do vírus seja determinado pela competência das respostas imune inata e adaptativa do hospedeiro sustentada pela ação de citocinas do perfil T_H1 e quimiocinas que mantêm uma comunicação celular e humoral satisfatória (Coelho-Castelo et al., 2009; Hiroishi et al., 2008; Hiroishi et al., 2010).

No entanto, sabe-se que existem variações genéticas inerentes ao hospedeiro que podem causar desregulação na produção de citocinas pro-inflamatórias contribuindo para a persistência do vírus (Chen et al., 2011). Neste aspecto, a identificação de polimorfismos em regiões regulatórias dos genes das citocinas é algo que tem sido estudado para justificar o insucesso da terapia com PegIFN- α associado a ribavirina (Balagopal et al., 2010; Kelly et al., 2011).

Nesta revisão, nós iremos enfatizar mecanismos de ativação da IL-28B na resposta contra o HCV e de que forma os polimorfismos relacionados a esta citocina podem alterar a resposta imune a este patógeno.

FAMILIA DE INTERFERON- λ : VISÃO GERAL

A citocina IL-28B pertence a família de citocinas classificadas como interferon λ (IFN- λ), que inclui três subtipos de interferon: IFN- λ I (IL-29A), IFN- λ II (IL-28A) e IFN- λ III (IL-28B) (Sheppard et al., 2003; Kotenko et al., 2003). Este grupo de interleucinas conservam alto grau de similaridade estrutural com os membros da família de IL-10, embora sejam funcionalmente similares aos interferons do tipo I (Gad et al., 2009; Balagopal et al., 2010).

O gene que codifica a IL-28B contém seis exons com aproximadamente 200 aminoácidos e está localizado no cromossomo 19q13.13. Esta interleucina apresenta alto grau de similaridade de sequência gênica com a IL-28A (96%) e com a IL-29A(81%) (Sheppard et al., 2003; Sugiyama et al., 2011).

Recentemente, vários polimorfismos de base única (SNPs) na região promotora de IL-28B tem sido associados como possíveis preditores de resposta virológica sustentada (RVS) entre grupos raciais. E, a partir destes estudos pode-se observar que alguns desses SNPs estão localizados acima ou abaixo da região promotora da IL28-B (Diegelmann et al., 2010; Chen. et al., 2011)

Segundo dados publicados por Ge et al., (2009) foi identificado um SNP de 3 kb acima do gene de IL28B, rs12979860, que foi fortemente associado com a resposta virológica sustentada (RVS) pois o genótipo TT de rs12979860 foi associado com uma taxa de cerca de 2 vezes maior de RVS em comparação com o genótipo CC, tanto em pacientes de ascendência europeia quanto afro-americanos.

Segundo estudo realizado pelo mesmo grupo anteriormente, ao estudarem 96 indivíduos em três grupos independentes (euro-americanos, afro-americanos e hispânicos) observaram que o SNP rs 8103142, que está localizado na região de codificação de dois exons resulta na mudança de um único aminoácido de lisina por arginina na posição 70 (K70R) do cromossomo 19 (Ge *et al.*, 2009). De acordo com a Clark *et al.*, (2011), esta substituição pode reduzir potencialmente a ligação da IL-28B ao receptor correspondente ou até mesmo a estabilidade desta citocina, o que afetaria diretamente a ação da IL-28B sobre a ativação das vias de sinalização STAT 1 e 2, o que provocaria a diminuição na produção de proteínas anti-virais que podem estar relacionadas aos efeitos de depuração do HCV. Porém, no presente estudo não foi possível analisar a produção de IL-28B nas amostras estudadas por

limitações técnicas, impedindo assim a correlação entre a produção desta citocina e os genótipos de IL-28B encontrados.

Segundo dados publicados por Xiaodong *et al.*, (2012), sugerem que este mesmo polimorfismo de base única (rs 12979860), com genótipo TT esta associado com a eliminação espontânea do vírus HCV em pacientes chineses.

Outro SNP (rs8099917) fortemente associado com resposta virológica sustentada foram publicado por Tanaka et al., (2009). Em ensaios quantitativos realizados por PCR tempo real em células mononucleares do sangue periférico observaram-se baixos níveis de expressão de IL-28B em indivíduos que possuem o genótipo GG (Tanaka et al., 2009; Jensen et al., 2012).

Além disso, dados publicados por Onomoto *et al.*, (2011), afirmam que a desregulação no sistema de produção de IL-28B avaliada através do padrão de expressão de genes relacionados, antes do tratamento, foi associada a uma resposta inadequada a terapia combinada.

Ativação e Regulação das vias STAT 1 e STAT2

As células infectadas pelo vírus C induzem a produção tanto IFN- α / β quanto IFN- λ (IL-28A, IL-28-B e IL-29A) que se ligam aos seus receptores correspondentes (IFNAR1/IFNAR2 e IFN- λ R1/IL10-R2) e ativam as vias de sinalização JAK- STAT1, STAT2 e STAT3 nos hepatócitos humanos (Clark et al., 2011).

As vias de sinalização STAT1 e STAT2 juntamente com o fator 9 de regulação do interferon (IRF-9) formam o complexo trimérico fator 3 estimulador do gene de interferon (ISGF-3) a fim de produzir proteínas anti-virais (por exemplo, Mx1, OEA, IRF-7, etc) que, posteriormente, inibem a replicação do HCV (Chen et al., 2009).

Assim, a produção de IFN- λ potencializa a ativação das vias de sinalização STAT 1 e 2, permitindo consequentemente o aumento da produção de proteínas anti-virais, que podem estar relacionadas aos efeitos de depuração do HCV (Clark et al., 2011).

Os IFN- α , β e λ são ativados por vias de sinalizações comuns e é provável que os mecanismos imunomoduladores virais também sejam semelhantes (Coccia et al., 2004; Onoguchi et al., 2007; Pagliaccetti et al., 2010).

Segundo dados publicados por Onomoto et al., (2011) observou-se que, pacientes que não desenvolveram resposta virológica sustentada por apresentar genótipo desfavorável CC tendem a apresentar altos títulos de fator 3 estimulador de interferon (ISG) expressos no fígado antes de iniciar o tratamento com IFN- α Peg e Ribavirina, enquanto indivíduos que apresentam genótipo favorável TT para produção de IL28B apresentaram baixos títulos de ISG. A alta expressão de ISG pode induzir uma produção deficiente de IFN- λ , além de aumentar o risco de hepatocarcinogênese causada pela infecção pelo vírus C (Onomoto et al., 2011).

Ativação da Via STAT 3 e seus efeitos sobre o fígado

A ativação de STAT3 regula negativamente a atividade anti-viral do IFN- α por inibição STAT1 e STAT2. Além disso, a STAT3 aumenta a expressão SOCS1 e SOCS3 que inibem a sinalização do IFN- α (McGovern, 2011).

Todavia, quando há ativação simultânea de STAT1 e STAT3 desempenham papéis antagonicos no fígado, reduzindo a lesão hepática e aumentando o processo de reparação tecidual no fígado. (Gao et al., 2011).

É provável que a ativação da STAT3 nas células T induz a expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α , que promovem a diferenciação para um fenótipo T_H 17.

Uma mudança de T_H 1 para T_H 17 parece ser potencialmente prejudicial para o paciente em se tratando de perfil de resposta antiviral e a progressão da doença do fígado, tendo em vista que as respostas T_H 17 mais fortes estão associados a maior carga viral do plasma, aumento

dos níveis de transaminases no soro, e ativação aumentada de monócitos do sangue, bem como macrófagos hepáticos. (Hammerich et al., 2011).

No entanto, STAT3 ativação de células T também podem inibir a sinalização STAT1 e evitar uma polarização para um fenotipo T_H1, reduzindo assim os níveis de IFN- γ e inflamação hepática (Gao et al., 2011; Hammerich et al., 2011).

Desta forma, estes resultados sugerem que o papel da STAT3 na inflamação do fígado é complexa. Enquanto STAT1 promove a inflamação sob muitas condições, a activação da via de sinalização STAT3 em hepatócitos em geral leva a respostas anti-inflamatórias, evitando danos hepatocelulares através da inibição da via de sinalização de STAT1 (Gao et al., 2011).

CONCLUSÃO

Embora os protocolos de tratamento indicados para Hepatite C crônica já estejam bem estabelecidos, sabe-se que muitos pacientes não serão curados por não serem capazes de desenvolver resposta virológica sustentada.

Além disso, a identificação de um preditor confiável de resposta ao tratamento da hepatite C pode facilitar a tomada de decisão terapêutica tendo em vista que o tratamento anti-HCV é caro, demorado, não isento de efeitos secundários e, principalmente, tem uma grande chance de insucesso.

Desta forma, vale ressaltar a importância de se estudar melhor o papel das interleucinas IL-29A, IL-28A e IL-28B na infecção pelo HCV, bem como as variações genéticas podem influenciar no curso da Hepatite C crônica.

Sabe-se que a IL-28B é uma candidata promissora para o tratamento da infecção pelo HCV. No entanto, são necessários mais estudos para compreender como a citocina IL-28B inibe a replicação do vírus C e induz a expressão de proteínas antivirais.

CONFLITO DE INTERESSSE

Nenhum conflito de interesse foi declarado.

REFERÊNCIAS

1. Balagopal, A.; Thomas, D; Thio, C. **Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology**. *Gastroenterology*; 139: 1865 – 1876, 2010.
2. Chen, J-Y; Lin, C-Y; Wang, C-M; Lin, Y-T; Kuo, S-N; Shiu, C-F; Chang, S-W; Wu, J; Sheen, I-S. ***IL28B* genetic variations are associated with high sustained virological response (SVR) of interferon- α plus ribavirin therapy in Taiwanese chronic HCV infection**. *Genes and Immunity*; 1-10, 2011.
3. Clark, P; Thompson, A; McHutchison J. ***IL-28B* genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis c infection: The future of personalized HCV therapies**. *The American Journal Gastroenterology*. 106:38-45, 2011.
4. Coccia EM; Severa M; Giacomini E; Monneron D; Remoli ME; Julkunen I; Cella M; Lande R; Uze G. **Viral infection and toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells**. *Eur J Immunol* 34(3): 796–805, 2004.
5. Coelho-Castelo, AAM; Trombone, APF; Rocha, CD; Lorenzi, JCC. **Resposta imune a Doenças Infecciosas**. *Medicina*; 42(2): 127-142, 2009.
6. Diegelmann J; Beigel F; Zitzmann K; Kaul A; Göke B; Auernhammer C J; Ralf Bartenschlager; Diepolder HM; Brand S. **Comparative Analysis of the Lambda-**

Interferons IL-28A and IL-29 regarding Their Transcriptome and Their Antiviral Properties against Hepatitis C Virus. *Plos one*.5:1 -13, 2010.

7. Ferraz, MLG. **Hepatite C. Programa de Educação Médica Continuada – Sociedade Brasileira de Hepatologia**; 3-6 2010.

8. Gade, HH; Dellgreen, C; Hamming, OJ, et al. **Interferon- lambda is functionally and interferon but structurally related to the interleukin-10 family.** *J. Biol. Chem.*, 2009.

8. Gale Jr M & Foy EM. **Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus.** *Nature*; 436(7053): 939-45, 2005.

9. Gao B; Wang H., Lafdil F; Feng D; **STAT proteins – Key regulators of anti-viral responses, inflammation, and tumorigenesis in the liver.** *Journal of Hepatology*, 57: 430-441, 2012.

10. Ge, D; Fellay, J; Thompson, A. J; Simon, J. S; Shianna, K. V; Urban, T. J; Heinzen, E. L; Qiu, P; Bertelsen, A. H; Muir, A. J; Sulkowski, M; McHutchison, J. G; Goldstein, D. B. **Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance.** *Nature*. 461: 399-401, 2009.

11. Hiroishi, K; Ito, T; Imawari, M; **Immune Responses in Hepatitis C infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence.** *Journal, Gastroenterology and Hepatology*; 23: 1473-1482, 2008.

12. Hiroishi, K; Eguchi, J; Ishii, S; Hiraide, A; Sakaki, M; Doi, H; Omori, R; Imawari, M. **Immune Responses oaccine Desenvolpente for hepatitis C virus infection.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 1-10, 2010.

13. Hammerich L., Heymann F., and Tacke F., **Role of Th-17 and Th-17 cells in liver diseases.** *Clinical and developmental Immunology* , 2011.

14. Jensen D & Pol S. ***IL28B* genetic polymorphism testing in the era of direct acting antivirals therapy for chronic hepatitis C: ten years too late?** *Liver International* 74-78, 2012.
15. Kelly C; Klenerman P; Barnes E. **Interferon lambdas: the next cytokine storm.** *Gut* 60:1284-1293, 2011.
16. Kotenko SV; Gallagher G; Baurin VV; Lewis-Antes; Shen M, et al. **IFN- lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex.** *Nat Immunol* 4:69-77, 2003.
17. McGovern BH. **Predictors of response to hepatitis c treatment in HIV- infected patients.** *UptoDate*, 2011.
18. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, Fujita T. **Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism.** *J Biol Chem* 282(10):7576–7581, 2007.
19. Onomoto K, Morimoto S, Kawaguchi T, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Uno K, Kumada T, Matsuda F, Shimotohno, F T; Murakami, Y. **Dysregulation of IFN System can lead to a Poor Response to Pegylated Interferon and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C.** *Plos one*; 6(5):1-10, 2011.
20. Pagliaccetti N., and Robek M., **Interferon- λ in the immune response to hepatitis B and Hepatitis C virus.**, *Journal of interferon & cytokine research*, 30:8, 2010.
21. Paltanin, L. F; Reiche, E. M. **Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors, Brazil.** *Revista de Saúde Pública*, v. 36, p. 393-399, 2002.

22. Sheppard, P; Kindsvogel, W; Xu, W; Henderson, K; Schlutsmeyer, S; Whitmore, T. E; Kuestner, R; Garrigues, U; Birks, C; Roraback, J; Ostrander, C; Dong, D; and 14 others. **IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.** *Nature Immun.* 4: 63-68, 2003.
23. Shepard WC; Finelli L; Alter MJ. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infect Dis* ; 5: 558-67, 2005.
24. Sugiyama M; Tanaka Y., Wakita T; Mikanishi M; Mizokami M; **Genetic Variation of the *IL-28B* Promoter Affecting Gene Expression.** *Plos one* 6: 1-12, 2011.
25. Tanaka, Y; Nishida, N; Sugiyama, M; Kurosake, H et al. **Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon – α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.** *Nature genetics*; 41(10): 1105 -1109, 2009.
26. Thomas, DL; Thio, CL; Martin, MP; Qi, Y; Ge, D; O'Heuigen, C; Kidd, J; Kidd, K; Kahakoo, S; Alexander, G; Goedert, J; Kirk, GD; Donfield, S; Rosen, H; Tobler, L; Busch, M; McHutchison, J; Goldstein, D; Carrington, M. **Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus.** *Nature*; 461:798-802, 2009.
27. Torres, KL; Malheiro, A; Tatenno, A; Lima TA; Maia, LPV; Pimentel, JPD; Moraes, MOE; Usui, CSM; Braga, FO; Silva, IAF; Vasquez, F; Levi, JE. **Hepatitis C virus in blood donors, Brazil.** *Emerg Infect Dis*; 15(4):676-678, 2009.
28. Xiaodong Shi., Yu Pan, Moli Wang, Dongsheng Wang, Wanyu Li, Tao Jiang, Peng Zhang, Xiumei Chi, Yanfang Jiang, Yanhang Gao, Jin Zhong, Bing Sun, Damo Xu, Jing Jiang, Junqi Niu. ***IL28B* Genetic Variation Is Associated with Spontaneous Clearance of Hepatitis C Virus, Treatment Response, Serum *IL-28B* Levels in Chinese Population.** *Plos one*, 2012.

29. Uno K, Sugimoto Y, Kakimi K, Moriyasu F, Hirose M, et al. **Impairment of IFN- α production capacity in patients with hepatitis C virus and the risk of the development of hepatocellular carcinoma.** World J Gastroenterol 11: 7330–7334, 2005.
30. World Health Organization (WHO). **Hepatitis C.** Publicação informal. p. 1- 4, 2012.
31. World Health Organization (WHO). **World Health Statistics.** p. 36, 2012.

ANEXO 06

Interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin -10 polymorphisms are associated with the cytokines serum levels of hepatitis C virus infection in Brazilian Population

Andréa Monteiro Tarragô^{a,b}, Allyson Guimarães da Costa^{a, b}, João Paulo Diniz Pimentel^{a, c}, Samara Gomes^d, Pritesh Lalwani^b, Ana Ruth S. de Araújo^b, Antônio Carlos Vallinoto^d, Aya Sadahiro^{b, e}, Adriana Malheiro^{a, b}

^aFundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM,3497

Constantino Nery Av., Manaus- AM, Brazil.

^bUniversidade Federal do Amazonas – UFAM, 3000, Rodrigo Otávio Av.,Manaus- AM, Brazil

^cInstituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz Amazônia,476 Terezina st.,Manaus- AM, Brazil

^dUniversidade Federal do Pará, 1 Augusto Corrêa , Belém, Pará

^eInstituto de Pesquisa da Amazônia -INPA, 2936 André Araújo Av.,Manaus- AM, Brazil

Author of correspondence:

Adriana Malheiro, PhD

Av. Constantino Nery, 4397

Chapa, Manaus, Brasil

Fone: (92) 3655-0123

malheiroadriana@yahoo.com.br

Abstract:

We investigated the effects of polymorphisms in Interleukin-6, tumor necrosis factor- α and interleukin -10 in chronic hepatitis C patients newly diagnosed and before they start the treatment in Manaus, Amazonas, Brazil. A total of 116 individual were genotyped for the genes encoding *308TNF α* , *-174IL6* and *-1082IL10* and the IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL17A were measured. The aim of this study was to evaluate the influence of polymorphisms: *-308TNF α* , *-174IL6* and *-1082IL10* on the cytokine profile T_H1, T_H2 and T_H17, in samples from patients with chronic hepatitis C before treatment begins and blood donors candidates. A total of 116 subjects were studied, 69 HCV⁺ and 47 controls. We observed a higher prevalence males in both groups, with an average age above 40 years for HCV⁺. The most frequent genotype for the *-308TNF α* was GG, both in patients and in controls. We observed statistically significant differences in GA genotype among HCV⁺ patients and controls. For *-174IL6*, the GG genotype was the most prevalent in both groups, followed by GC. The CC genotype was not found in the control group, but it was find only HCVpatients. The AA genotype was more prevalent for *-1082IL10*, HCV⁺ patients and controls, followed by AG and GG. The cytokines IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-17A, showed to be increased in HCV⁺ patients compared to controls. The concentration of IL-10 was higher in the control group compared to HCV⁺ patients. Patients with genotype GA for *-308TNF α* showed higher concentrations of TNF- α compared with control subjects. It was also observed that patients HCV⁺ with genotypes GG and GC for IL-6 had a higher concentration of IL-6 compared to controls, were not observed significant associations between *-1082IL10* of genotype frequencies and the concentrations of cytokines in patients HCV⁺. The results suggest a possible influence of polymorphisms of TNF- α and IL-6 on the production and release of cytokines.

Keywords: Interleucina-6; Tumor necrosis factor- α ; Interleucina-10; Polymorphism; Hepatitis

1. Introduction

Hepatitis C is a public health problem that affects over 150 million people worldwide. It is a disease of variable prognostic that can progress to healing or the development of chronic hepatitis C, liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and death [1].

The identification of polymorphic regions that influence the cytokines levels is something that has been studied to justify the susceptibility of certain individuals develops chronic hepatitis C infection [2].

Cytokines play an important role in regulating the immune response in HCV [3]. The production of inappropriate levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-10 are related to the progression of the chronic hepatitis C [3]. Several studies have demonstrated that *-380TNF α* , *-174IL6* and *-1082IL10* may be associated with the pathogenesis of acute and chronic hepatitis C and response to therapy [4-9].

The aim of this study was to explore the impact of the *-380TNF α* , *-174IL6* and *-1082IL10* variations over the cytokines serum levels of HCV⁺ patients.

2. Patients and Methods

2.1 Patients

We analyzed 69 samples from HCV⁺ patients, from the Fundação de Medicina Tropical (FMTAM) carried out during 2007 - 2009 (Araújo et al., 2011) and 47 samples of blood donors from the Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) at 2006 to 2007 (CUNHA et al., 2012). The samples used in this study were obtained from projects approved by the Human Subjects Committees of the Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT-AM (CAAE - 0913/2007) and Fundação de Hematologia hemoterapia do Amazonas -HEMOAM (CAAE - 0015/2005). The biological materials were stored at -80 ° C until the time of analysis were performed.

2.2 DNA extraction

DNA was extracted by LCG kit Brazol Biotechnology, a protocol developed by Chomczynski and Sacchi, following the recommendations outlined by the manufacturer [10].

2.3 RFLP-PCR

2.3.1 IL-6 genotype

The CG polymorphic site at position -174 of the gene promoter (169 base pairs, bp) was amplified with the primers 5'-AAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT - 3' and 5' - ATCTTTGTTGGAGGGTGAGG - 3'. The extracted DNA was added to PCR in a final volume of 50 μ L containing 1.5 mM $MgCl_2$, 1.25 mM dNTP, 10pm each primer and 0.5 U Taq DNA polymerase. The parameters of amplification in the thermo cycler according program described: 1 cycle at 95 ° C for 2 minutes, 35 cycles at 94 ° C for 40 seconds, 59°C for 30 seconds, 72 ° C for 40 seconds and final extension at 72 ° C for 10 minutes. The polymorphism CG of IL6 was detected after digestion of the PCR product with the restriction enzyme Nla III at 37 ° C overnight and electrophoresis on agarose gel and 4% were visualized by UV fluorescence on transilluminator blue light after staining with Bromide ethidium. GG genotype were defined as those who showed fragments of 169 bp, CG with 169 and 87 bp and CC with 87 and 88 bp fragment.

2.3.2 TNF- α genotype

The polymorphic site GA at position -308 of the gene promoter was amplified with the primers 5'-GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' and 5'-GGGACACACAAGCATCAAG -3'. The extracted DNA was added to PCR in a final volume of 50 μ L containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTP, 0.3 mM of each primer and 1.25 U Taq DNA Polymerase. The parameters of amplification in the thermo cycler from Applied Biosystems (Veriti® 96 Thermal Cycler) in accordance with the program described: 1 cycle at 95 ° C for 10 minutes, 35 cycles of 95°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 72 ° C for 30 seconds and extension the final 72° C for 10 minutes. Polymorphism GA of TNF was detected after digestion of the PCR product with the restriction enzyme NcoI 37 ° C for 8 hours. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 2.5% agarose visualized by UV fluorescence on blue light transilluminator after staining with SYBR Safe®. Were defined as GG genotype showed that the fragments of 126 and 21 bp GA with 147, 126 and 21 bp and AA with 147 bp fragment.

3.2.3 IL-10 genotype

The polymorphic site at position -1082 GA gene promoter (190 base pairs, bp) was amplified with the primers 5'-TCTGAAGAAGTCCTGATGTC - 3' and 5' - CTCTTACCTATCCCTACTTCC - 3'. The extracted DNA was added to PCR in a final volume of 50 μ L containing 1.5 mM MgCl₂, 1.25 mM dNTPs, 10 pM of each primer and 0.5 U Taq DNA polymerase. The parameters of amplification in the thermo cycler according program described: 1 cycle at 94 ° C for 2 minutes, 35 cycles at 94 ° C for 1 minute, 60 ° C for 1 minute, 72 ° C for 1 minute, and final extension at 72 ° C for 10 minutes. The polymorphism AG for IL10 was detected after digestion of the PCR product with the restriction enzyme MnlI at 37 ° C for 4 hours and electrophoresed on agarose gel and 4% were visualized by UV fluorescence on transilluminator blue light after staining with ethidium bromide. AA genotype were defined as those who showed fragments of 125 bp and 65 bp, AG with 125, 93 and 65 bp and GG with 93 and 65 bp fragments.

2.4 Cytokines serum levels - Cytometric Bead Array

The dosages of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL17A were performed by the technique of flow cytometry CBA, using the kit TH1, TH2 and TH17 (Kit TH1, TH2 e TH17 (BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit - Cat. N° 560484, Lot.: 29132, marca BD® Biosciences San Jose, CA), following the manufacturer's technical guidelines and according to the protocols recommended by Kit TH1, TH2 and TH17 CBA Kit from Becton Dickinson Biosciences BD. This procedure was used flow cytometer from Becton Dickinson Biosciences BD -FACSCanto II (BD Biosciences) of the Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) - Fiocruz Amazônia for acquisition of samples. For calculation of the concentrations and mean fluorescence intensity of each cytokine was used software FCAP-ArrayTM (v 3.0.1).

2.5 Statistical analysis

The analysis of the results of the concentration of cytokines by CBA and construction of graphs was used GrahPadPrism[®] program (version 5.0). The

evaluation of the association between HCV genotypes and cytokine levels was performed using the Kruskal Wallis test and calculating the linear correlation between the levels of cytokines was performed using Pearson's test and the calculation of Hardy-Weiberg was done through the program BioEstat 5.0. Comparison of genotype frequencies of genes studied in both HCV⁺ patients and control groups were performed using the program GrahPadPrism[®] (version 5.0) by Fisher's exact test or chi-square test. The evaluation of the associations between genotypes and cytokine levels in individuals positive for the virus c was performed using the Mann-Whitney through the program GrahPadPrism[®] (version 5.0).

3. Results

3.1 The base line characteristics of individuals in this study (Table 1)

For this study a total of 116 individuals were included Brazilians, and among them 69 were HCV⁺ patients and 47 were blood donors (control group). Of the total number of individuals included in the study we observed a higher prevalence of males in both patients HCV⁺ (67%) and in control group (78%) compared to females, group of patients HCV⁺ (33%) and control subjects (22 %).

The mean age for females was 45.65 ±15.13 in patients HCV⁺ and 36.44 ±7.51 in the group of blood donors, and for males the average age was 46.71 ±12.06 in HCV⁺ patients group and 37.6 ±11.43 in the control group, showing no statistically significant difference between both sexes. In table 1 are summarized the demographic characteristics of the study population (Table 01).

3.2 Differential distribution of -174IL6, -308TNF α and -1082IL10 variants

The distribution of the alleles for all markers was in accordance with Hardy-Weinberg equilibrium in this study. The frequencies of the -174IL6, -308TNF α and -1082IL10 variants were investigated in all the subjects. However, some of the sample was not sufficient to confirm the genotype. It is plausible that the number of samples could be a limitation and have influenced the results obtained (Table 02).

For TNF- α was observed frequency of GG genotype in 87% and 98% in groups, control and HCV⁺, respectively. The GA genotype was higher in the control group (13%) compared to HCV⁺ patients (2%) and was statistically significant.

Unlike other markers, $-308TNF\alpha$, $-174IL6$ and $-1082IL10$ statistical analysis showed a significant difference between the two profiles studied (Table 02).

As interleukin IL-6, the frequency of GG genotype was 61% in the control group and 62% in HCV⁺ group. The genotype frequencies of GC showed 39% in the control group and 35% in HCV⁺ group, while the CC genotype appeared absent in the control group (0%) and showed low frequency in the HCV⁺ group (3%).

3.3 Cytokines serum levels associated genotypes virus in patients with HCV⁺

The C virus genotypes were published by Araújo et al., and these data were used to verify the cytokine profile in relation to genotypes found in Amazonas[11].

The concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL17A were determined by flow cytometry in HCV⁺ patients and compared to the control group. Patients with HCV⁺ genotypes 2 and 3 were analyzed together as there were fewer in number compared with genotype 1.

As shown in Figure 01, the results showed a significant difference in serum concentrations of IL-2 (A), IL-6 (C), IFN- γ (F) and IL17A (G), presenting enhanced in patients with HCV⁺ when compared with the control group ($p < 0,0001$). Nevertheless, individuals HCV⁺ possessing the genotype of the virus 1 showed serum concentrations of IL-2 (A), IL-6 (C), IFN- γ (F) and IL17A (G) greater than individuals HCV + possessing genotypes 2 and 3, being statistically significant.

Also, serum concentrations of IL-4 (B), IL-10 (D) and TNF- α (E) were higher in the control group compared with the group of patients HCV⁺, of which only IL-10 significance showed statistically between groups.

3.4 Cytokines serum levels associated genotypes GG/GC/CC at position -174 in the IL-6

To better understand the immunological profile of these individuals also evaluated the association of cytokine production with different genotypes of IL-6. We observed that the concentration of IL-2 (Fig. 2A) was significantly higher in patients genotype GG, compared with the control group with the same genotype ($p < 0.0001$), while patients with genotype GC and CC genotype showed no significant statistical difference between the groups.

Moreover, there was no statistically significant differences in serum levels of IL-4 (Fig. 4B) between the control group and patients in all genotypes (GG, GA and GC) ($p = 0.5860$).

The IL-6 (Fig. 2C), was significantly higher in patients with genotype GG, GC and compared with control subjects with the same genotype ($p < 0.0001$). We also observed that patients with CC genotype showed no difference statistically between the groups.

Unlike IL-6, IL-10 (Fig. 2D) was significantly lower in patients genotype GG, compared with the control group ($p < 0.0001$), whereas patients with GC and CC genotype did not showed statistically significant difference between groups. The concentration of TNF- α (Fig. 2E) was significantly lower in patients with HCV genotype GG, compared with control subjects with the same genotype ($p < 0.0001$), whereas patients with GC and CC genotype showed no statistical difference between groups.

Regarding IFN- γ serum levels (Fig. 2F) was significantly increased in patients with genotype GG, compared with control subjects with the same genotype ($p < 0.0001$), whereas in patients with GC and CC genotype did not statistically significant difference between groups.

Again we observed an increase in the concentration of IL-17A (Fig. 2G) both in patients with genotype GG ($p < 0.0001$) and GC ($p < 0.0001$) compared with individuals in the control group with the same genotype.

3.5 Cytokines serum levels associated genotypes GG/ GA at position -308 in the TNF- α

As Figure 3A shows the concentration of IL-2 was significantly higher in patients with HCV⁺ genotype GG, compared with control subjects with the same genotype ($p < 0.0001$), whereas patients with GA genotype showed no statistically significant difference in Given the concentration of IL-2 in the control group was near zero.

Unlike IL-2 to IL-4 (Fig. 3B) was not observed statistically significant differences between the control and HCV⁺ patients with both genotypes GG and GA ($p = 0.5720$).

Moreover, there was significant difference in the concentration of IL-6 (Fig.3C) ($p<0.0001$) and IFN- γ (Fig.3F) ($p<0.0001$) in patients with genotype GG, compared with the control group, while patients with genotype GA showed no statistically significant difference for both cytokines.

The concentration of IL-10 (Fig. 3D) was significantly lower in patients genotype GG, compared with the control group ($p<0.0001$), unlike patients with GA genotype showed no statistically significant difference between both groups (control and HCV⁺).

For TNF- α (Fig. 3E) was observed lower concentrations in patients genotype GG, compared with the control group ($p=0.0234$), whereas patients with GA genotype showed no statistically significant differences, but we observed an increased even though was not significant concentration of TNF- α in patients genotype GA.

Surprisingly, IL-17A (Fig.3G) was significantly higher both in patients with HCV genotype GG ($p<0.0001$) and with GA genotype ($p<0.0100$) compared with individuals in the control group with the same genotype.

3.6 Cytokines serum levels associated genotypes GG/ GC/CC at position -1082 in the IL10

The concentration of IL-2 (Fig. 4A) was significantly higher in patients with genotype AA, compared with control subjects with the same genotype ($p<0.016$), while patients with genotype AG and GG did not differ statistically between groups.

Regarding IL-4 (Fig. 4B) there was no statistically significant difference between the control and patients with genotypes AA, AG and GG, studied ($p=0.9122$).

While for IL-6 (Fig. 4C), there was a statistically significant higher in patients with genotype AA and AG, compared with control subjects with the same genotype ($p<0.0001$), whereas patients with CC genotype showed no statistical difference between groups.

The IL-10 (Fig. 4D) was significantly lower in HCV + patients with genotype AA and AG, compared with the control group ($p<0.0001$), while individuals with GG genotype showed no statistical difference between groups.

For TNF- α (Fig. 4E) was not statistically significant difference between the control and patients for genotype AA, AG and GG ($p=0.0873$).

The concentration of IFN- γ (F) was significantly higher in patients with HCV genotype AA, compared with control subjects with the same genotype ($p < 0.0001$), while patients with genotype AG and GG did not differ statistically between groups.

Interestingly, the concentration of IL-17A (G) was significantly higher both in patients with HCV genotype AA ($p<0.0001$) and AG ($p<0.0001$) compared with individuals in the control group with the same genotypes but individuals with GG genotype showed no statistical difference between groups, control and patients.

3.7 Correlation between the cytokines levels of IL-2, IL-4, IFN- γ e TNF- α in HCV⁺ patients

For a better understanding of the cytokine production in HCV⁺ patients, the correlation between the cytokines levels was also determined. As shown in Figure 5, a positive correlation was observed between cytokines: IL-2 and IL-4 ($p=0.0494$, $r=0.2375$), IL-2 and IFN- γ ($p<0.0001$; $r=0.8652$), IL-2 and TNF- α ($p=0.0005$, $r=0.4086$), IL-4 and TNF- α ($p<0.0001$, $r=0.6352$) and IFN- γ and TNF- α ($p=0.0004$, $r=0.4129$). This demonstrates that a dynamic hesitate relevant concentrations of T_H1 cytokine profile on the T_H2 profile in HCV⁺ patients untreated.

4. Discussion

In the present study, we observed a higher prevalence of HCV infection in males aged over 40 years. These data are consistent with labor Torres et al., (2009), previously published in the literature and allows us to suggest that these individuals have been infected before the introduction of diagnostic methods important in blood banks, according to Ordinance No. 1376, of 19 November 1993 [12-13].

HCV infection is a chronic disease that can modify the dynamics of the blood cells and cytokine profile. In this perspective, changes in serum cytokines are associated mainly to genetic factors such as polymorphisms in the regulatory regions of cytokine genes [2].

An important cytokine in HCV infection is TNF- α [14]. For this study we evaluated the polymorphism -308TNF α and the genotype GG appeared most frequently, followed by GA and AA genotypes in both the control population and in

the population of HCV⁺ patients [15]. Our data also showed that patients with GA genotype had a higher concentration of TNF- α compared to healthy individuals (controls), suggesting the influence of genotype on the production and release of this cytokine [16-17].

In the population of patients studied were found varying degrees of liver fibrosis (data not shown), which could be related to increased TNF- α observed in this study. According to Dai et al., in a population of 250 patients with chronic hepatitis C from Thai origin, observed the frequency of genotypes GG, GA, AA and the relationship between the AA genotype, which was associated with high serum levels of this cytokine with increasing degree of fibrosis and low levels of C virus RNA, when compared with the other genotypes found in that region. This result indicates that TNF- α , shows immunological properties infectious agents and may inhibit the replication of HCV. It is noteworthy that in the population (HCV⁺ patients and controls) studied in this work was not found AA genotype, which could be related to the particularities of the population of the state of Amazonas [18].

Moreover, Santovito et al., demonstrated that individuals from Northern Ivory Coast with HCV-related liver disease, had the most frequent genotype GA, followed by GG and AA. The increased frequency of the heterozygous genotype in this cytokine gene may be associated with natural selection against the infectious agents in the region of East Africa [19].

Another important cytokine in the development of HCV⁺ infection is IL-6. In this study we analyzed polymorphism -174/IL6 and it was observed that GG genotype appeared most frequently, followed by GC and genotypes CC, both in the control population and in the population of HCV⁺ patients. Analyzing the production profile of IL-6, we observed that patients GC and GG genotypes had higher concentration of this cytokine in the control, suggesting a possible influence of polymorphism in the promoter region of the gene of the cytokine IL-6 on the production of this cytokine. [20-23].

Data published by Falletti et al., showed results similar to our work, with the GG genotype most prevalent, followed by GC and CC. Additionally, these authors found that these 121 patients studied HCV⁺, Caucasian, from Italy, had alanine aminotransferase levels close to normal and fibrosis score lower than 4 (<4). These

authors suggested a relationship between the GG genotype, production of IL-6 and hepatic fibrosis [24].

Contradictory results were reported by Milton et al., which found no association of the marker with -174IL6 the elimination of HCV in 606 patients English [25].

The -1082IL10 polymorphism, the frequency of genotypes observed in our study was: AA, AG and GG, both in the control and in HCV⁺ patients. When analyzing the possible influence of polymorphism in the promoter region of the gene for IL-10, it can be seen that there were no significant differences in the concentrations of this cytokine related to polymorphism genotypes in this study. These data corroborate the results of Constantini et al., which found no influence of the genotypes AA, AG and GG on the serum concentration of IL-10 in HCV⁺ patients [26].

Different data found in our study, Kusumoto et al., who studied a population of 460 Japanese. Among them, 364 were chronic patients and 114 were individuals who clear the virus spontaneously. This population was not observed the presence of the GG allele that is associated with high serum levels of this cytokine. The other genotypes GA and AA were similar in both groups of chronic patients and in individuals who clear the virus spontaneously [14, 27].

To better understand the infection by HCV⁺, the cytokine profile was determined with reference to different genotypes of HCV. The data demonstrated that HCV⁺ patients had higher concentration of IL-2, IL-6, IFN- α and IL-17A compared to the control group, compared to different genotypes of the virus. Moreover, no significant differences were observed in IL-4, IL-10, TNF- α between both groups, and HCV⁺ control, even when analyzed in relation to different genotypes of the HCV. These data suggest that the HCV infection seems to be a predominance of T_H1/T_H17 over T_H2 which could be related to a regulation of the immune response in these individuals. Our results differ from Wan et al., by studying a population of individuals HCV⁺ from Taiwan found high concentrations of IL-2, IFN- α and TNF- α in these patients before and after treatment with ribavirin and pegylated interferon. Also, this same work it was observed that subjects who failed to clear the virus after treatment showed high levels of cytokines with T_H1/T_H2 profile [28-29].

The positive correlation between cytokines TNF- α / IL-2 in patients infected with HCV corroborate the data published by Najafizadeh et al., who also observed a correlation between these cytokines. These data suggest that the presence of TNF- α associated with the production of IL-2 may contribute to innate immunity action to stimulate an adaptive immune response can eliminate the virus naturally. Another important finding was observed in the relationship between concentrations of cytokines IFN- γ / IL-2 which, according to the present study are in agreement with the previously mentioned authors, suggesting that these cytokines are associated with increasing degree of injury in liver tissue.

Thus, it can be observed synergistic action of TNF- α / IL-2 / IL-4 suggests that there is an interaction between these cytokines to the immune system manages memory cells and production of antibodies specific for the Hepatitis C.

We know very little about the action in the course of IL17A in the HCV infection, however, data similar to those obtained in our study were found by Jian Ge et al., in which observed concentration of IL17A significantly increased in patients with hepatitis B compared with control subjects [30].

According to data published by Hammad et al., argue that there is an association of IL-6 and IL-17 with progressive exacerbation of liver injury induced by HCV [31].

In Brazil, little has been studied about the genetic profiles of cytokines in patients with chronic hepatitis C and their influences during the worsening of the disease. Thus, this study might add together with the Amazon population genetic studies in order to better understand the dynamics of cytokine this infection.

References

1. World Health Organization (WHO). World Health Statistics 2012, p. 36.
2. Clark P J & Thompson A, **Host genomics and HCV treatment response.** *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2012.
3. Fallahi P; Ferri C; Ferrari S. M; Corrado A; Sansonno D; e Antonelli A.**Cytokines and HCV-Related Disorders.** *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.

4. Jong, BA; Westendorp, RGJ; Bakker, AM; Huizinga; TWJ. **Polymorphisms in or near tumour necrosis factor (TNF) – gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production.** *Genes and Immunity*, 2002
5. Fishman D; Faulds G, Jeferry R; Mohamed –Ali V, Yudkin JS; Humphries S; Woo P. **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.** *Journal of Clinical Investigation*, 102: 1369-1376, 1998.
6. Cussigh A; Falletti E; Fabris C; Bitetto D; Cmet S; Fontanini E; Bignulin S; Fornasiere E; Fumolo E; Minisini R; Pirisi M; Toniutto P; **Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C** *Immunogenetics*, 2011.
7. Edwards-Smith CJ; Jonsson JR; Purdie DM; Bansal A; Shorthouse C e Powell E. E. **Interleukin-10 Promoter Polymorphism Predicts Initial Response of Chronic Hepatitis C to Interferon Alfa.** *Hepatology*, 1999
8. Yee LJ; Tang J; Gibson A; Kimberly R; Leeuwen DJV; Kaslow RA; **Interleukin 10 Polymorphisms as Predictors of Sustained Response in Antiviral Therapy for Chronic Hepatitis C Infection.** *Hepatology*, 2011.
9. Knapp S; Hennig BJW; Frodsham AJ; Zhang L; Hellier S; Wright M; Goldin R; Hill AVS; Thomas HC e Thursz MR. **Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection.** *Immunogenetics*, 2003.
10. Chomczynski P and Sacchi N. **Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate- phenol- chloroform extraction.** *Nature Protocol*, 2006.
11. Araújo AR; Almeida CM ;Fraporti L; Garcia N; Lima TA; Maia LPV; Torres KL; Tarrago Am; Victória F; Tateno A; Levi JE; Talhari S; malheiro A **Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite Crônica: genótipos no Estado do Amazonas.** *Rev Bras Med Bras Tropical*, 2011.
12. Cunha, LKH ; Kashima, Simone ; Amarante, MFC ; R Hadad ; Rodrigues, E S ; Silva, KLT ; de Lima, Tatiane Amabile ; Castro, DB ; Brito, FC ; Almedia, E. G. ; Cova, D ; Covas, Dimas Tadeu ;MALHEIRO, A. . **Distribution of**

- human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the state of Amazonas, Brazil, and subtype C identification. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2012.
13. Torres, KL; Malheiro, A; Tateno A; Lima TA; Maia, LPV; Pimentel, JPD; Moraes, MOE; Usui, CSM; Braga FO; Silva IAF; Vasquez, F; Levi, JE. **Hepatitis C virus in blood donors, Brazil.** *Emerg Infect Dis*, 2009.
 14. Brasil. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1.376, de 19 de novembro de 1993. Publicada no Diário Oficial da União em 02/12/1993.** Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br> - acesso em 18 de março de 2013.
 15. Kusumoto K; Uto H; Hayashi K; Takahama Y; Nakao H; Suruki R; Stuver S. O; Ido A; Tsubouchi H. **Interleukin-10 or tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan.** *Cytokine*, 2006.
 16. Trujillo-Murillo K; Pérez-Ibave D; Muñoz-Mejía C; Cordero-Pérez P; Muñoz-Espinosa L; Martínez-Rodríguez H; Bosques-Padilla F e Rivas-Estilla AM. **Prevalence of the -308 and -238 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Promoter Polymorphisms in Mexican Chronic Hepatitis C Patients.** *Rev Gastroenterol Mex*, 2010.
 17. Abraham L.J & Kroeger K.M., **Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease.** *Journal of Leukocyte Biology*, 1999.
 18. Tilg H. & Moschen A. R.. **Relevance of TNF- α gene polymorphisms in a nonalcoholic fatty liver disease.** *Expert Reviews*, 2011.
 19. Dai, C-Y; Chuang, W-L; Lee, L-P; Chen; S-C, Hou, N-J; Lin, Z-Y; Hsieh, M-Y; Wang, L-Y; Chang, W-Y; Yu, M-L. **Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -380 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C.** *Journal of Viral Hepatitis*, 2006.
 20. Santovito A; Cervella P; Schleicherova D; e Delpero M; **Genotyping for cytokine polymorphisms in a Northern Ivory Coast population Reveals a high frequency of the heterozygote genotypes for the TNF- α -308G/A SNP.** *International Journal of Immunogenetics*, 2012
 21. Pereira SS; Garcia D.M; Narciso F.M.S; Santos M.L.A.S; Dias J.M.D; Queiroz B.Z; Souza E.R; Nóbrega O.T. e Pereira L.S.M. **Effects of -174 G/C**

- polymorphism in the promoter region of the interleukin-6 gene on plasma IL-6 levels and muscle strength in elderly women.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2011.
22. Belluco C; Olivieri F; Bonafe M; Giovagnetti S; Mammano E; Scarleta R; Ambrosi A; Franceschi C; Nitti D; e Lise M. **-174 G>C Polymorphism of Interleukin 6 Gene Promoter Affects Interleukin 6 Serum Level in Patients with Colorectal Cancer.** *Clinical Cancer Research*, 2003.
 23. Burzotta F; Lacoviello L; Di Castelnuovo A; Glioca F; Luciani N; Zamparelli R; Schiavello R; Donati MB; Maseri A; Possati G. e Andreotti F. **Relation of the -174 G/C Polymorphism of Interleukin -6 to Interleukin -6 Plasma Levels and to Length of Hospitalization After Srgical Coronary Revascularization.** *The American Journal of Cardiology*, 2001.
 24. Barrett S; Collins M; Kenny C; Ryan E; Keane CO and Crowe J; **Polymorphisms in Tumour Necrosis Factor- α , Transforming Growth Factor- β , Interleukin-10, Interleukin-6, Interferon- γ and Outcome of Hepatitis C Virus intection.** *Journal of Medical Virology*, 2003.
 25. Falleti E; Fabris C; Vandelli C; Colletta C; Cussigh A; Smirne C; Fontanini E; Cmet S; Minisini R; Bitetto D; Toniutto P; e Pirisi M. **Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C.** *Human Immunology*, 2010.
 26. Minton E J; Smillie D; Smith P; Shipley S; MCKendrick M. W; Gleeson D. C., Underwood JCE; Cannings C; Wilson AG. e the Trent Hepatitis C Study Group. **Clearance of Hepatitis C Virus Is Not Associated With Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 Genes.** *Human Immunology*, 2005
 27. Constatini, PK; Wawrzynowicz-Syczewska, M; Clare, M; Kaczmarska, AB; MacFarlane IG; Cramp ME; Donaldson PT. **Interleukin-1, interleukin -10 and tumour necrosis factor alpha polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy.** *Liver*, 2002
 28. Ramos J.A; Silva R., Hoffman L; Ramos A LA; Cabello PH; Urményi T P; Villella-Nogueira C A; Lewis-Ximenez L. e Rondinelli E.. **Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of**

- hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro.** *BMC Research Notes*, 2012.
29. Wan L; Kung Y-J; Lin Y-J; Liao C-C; Sheu J JC; Tsai Y; Lai H-C; Peng C-Y e Tsai F-J. **Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(–) patients threated with interferon- α .** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009
30. Najafizadeh M; Farhadi N; e Sarkari B. **Th1 Cytokine Profiles in Hepatitis C Virus Infected Patients and Their Contributions to Inflammatory Responses.** *Shiraz E-Medical Journal*, 2007
31. Jian Ge ; Kai Wang ; Qing-Hua Meng ;Zhao-Xia Qi ;Fan-Li Meng; Yu-Chen Fan **Implication of Th17 and Th1 Cells in Patients with Chronic Active Hepatitis B.** *J Clin Immunol*, 2010
32. Hammad LN; Abdelraouf S M; Hassanein F S; Mohamed W A e Mona F. Schaalan **Circulating IL-6, IL-17 and vitamin D in hepatocellular carcinoma: Potential biomarkers for a more favorable prognosis?** *Journal of Immunotoxicology*, 2013.

Acknowledgements

We sincerely thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support.

Table page

Table 1: Demographic characteristics of 116 study subjects.

	<u>Female</u>	<u>Mean age</u>
HCV ⁺ patients	23(33%)	
		45,65±15,13
	<u>Male</u>	
	46(67%)	46,71±12,06
Control group	<u>Female</u>	<u>Mean age</u>
	10(22%)	36,44±7,51
	<u>Male</u>	
	37(78%)	37,6±11,43

Table 2: Genotypes of IL-10 (-1082), TNF-α (-308), IL-6 (-174) in HCV⁺ and controls.

Gene	Genotype	Control	HCV ⁺	<i>p</i> value
		n (%)	n(%)	
IL-6 (-174)	GG	28 (61)	43 (62)	0.1761
	GC	18 (39)	24 (35)	
	CC	0	2 (3)	
TNF-α (-308)	GG	39 (87)	61 (98)	<0.0001*
	GA	6 (13)	8 (2)	
	AA	0	0	
IL-10 (-1082)	AA	17 (48)	27 (40)	0.2475
	AG	16 (46)	35 (52)	
	GG	2 (6)	5 (8)	

Figure 1

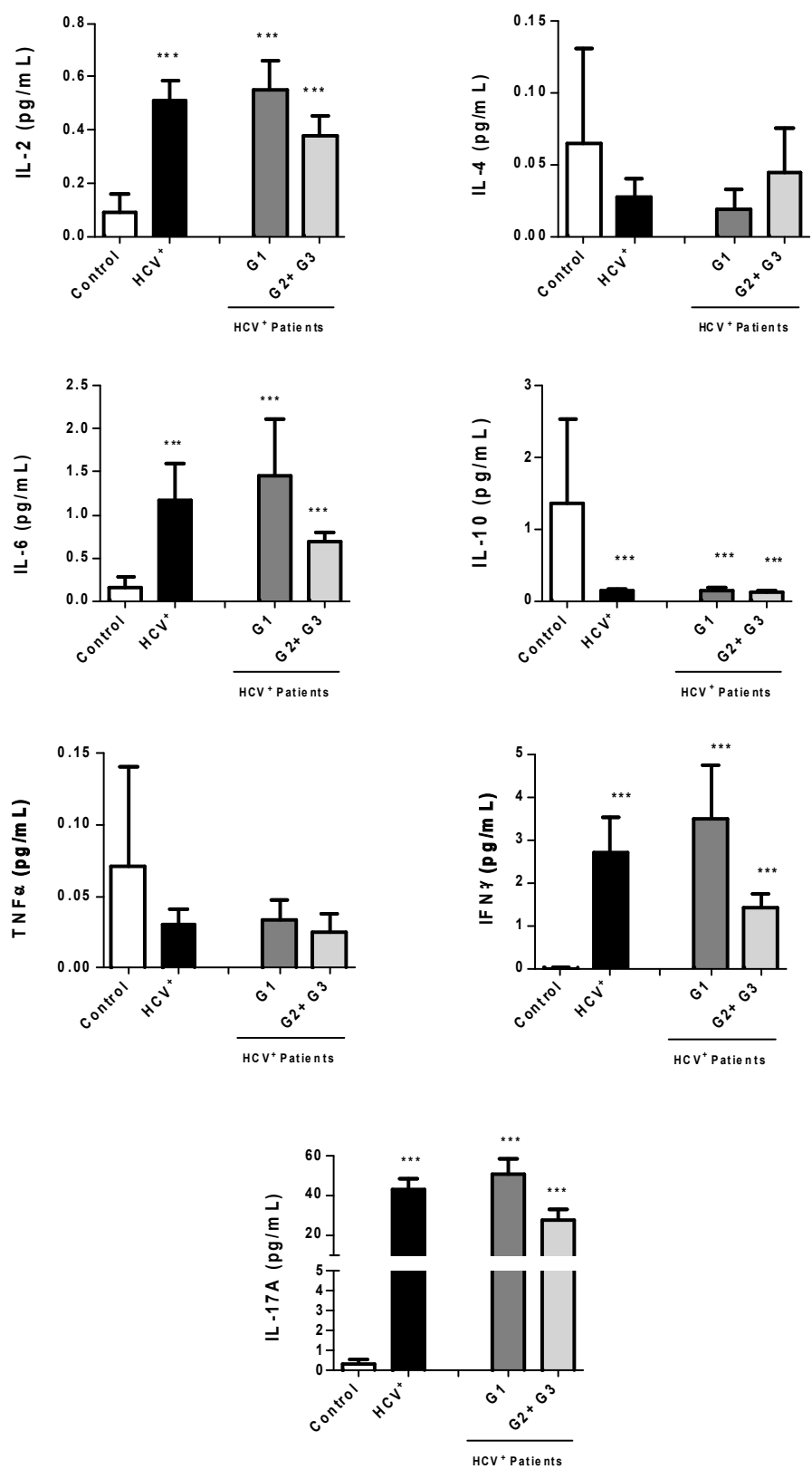


Figure 2

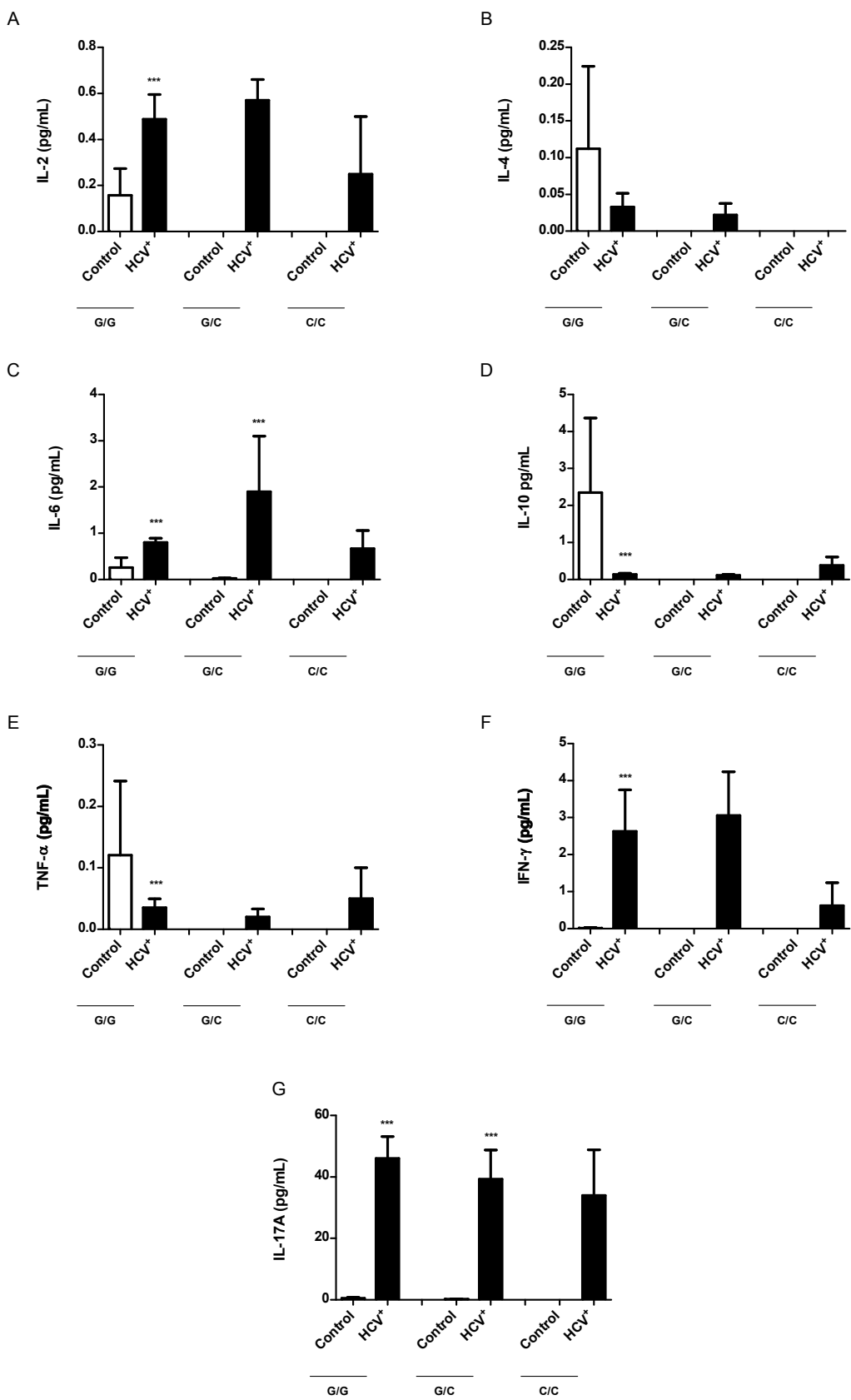


Figure 3

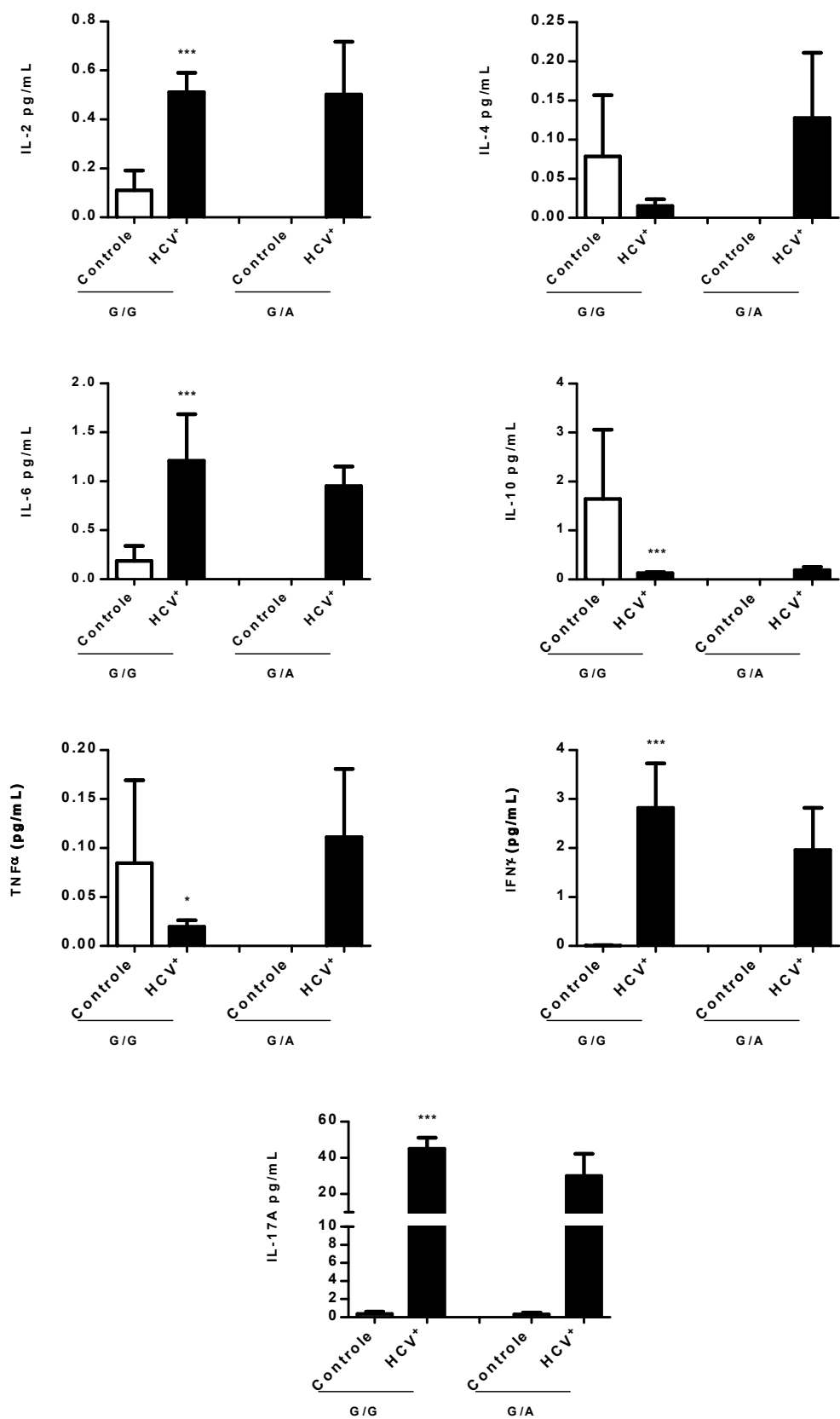


Figure 4

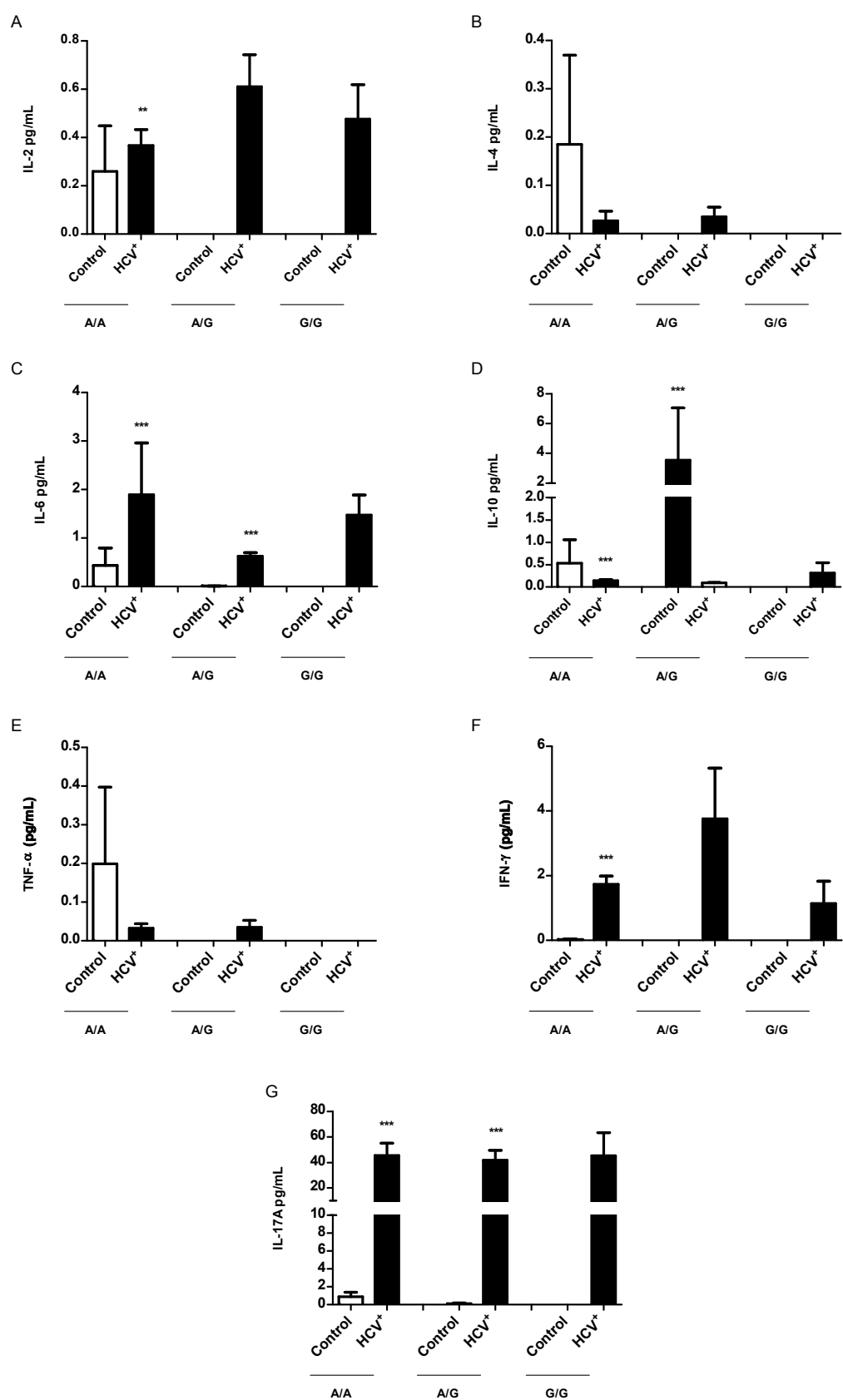
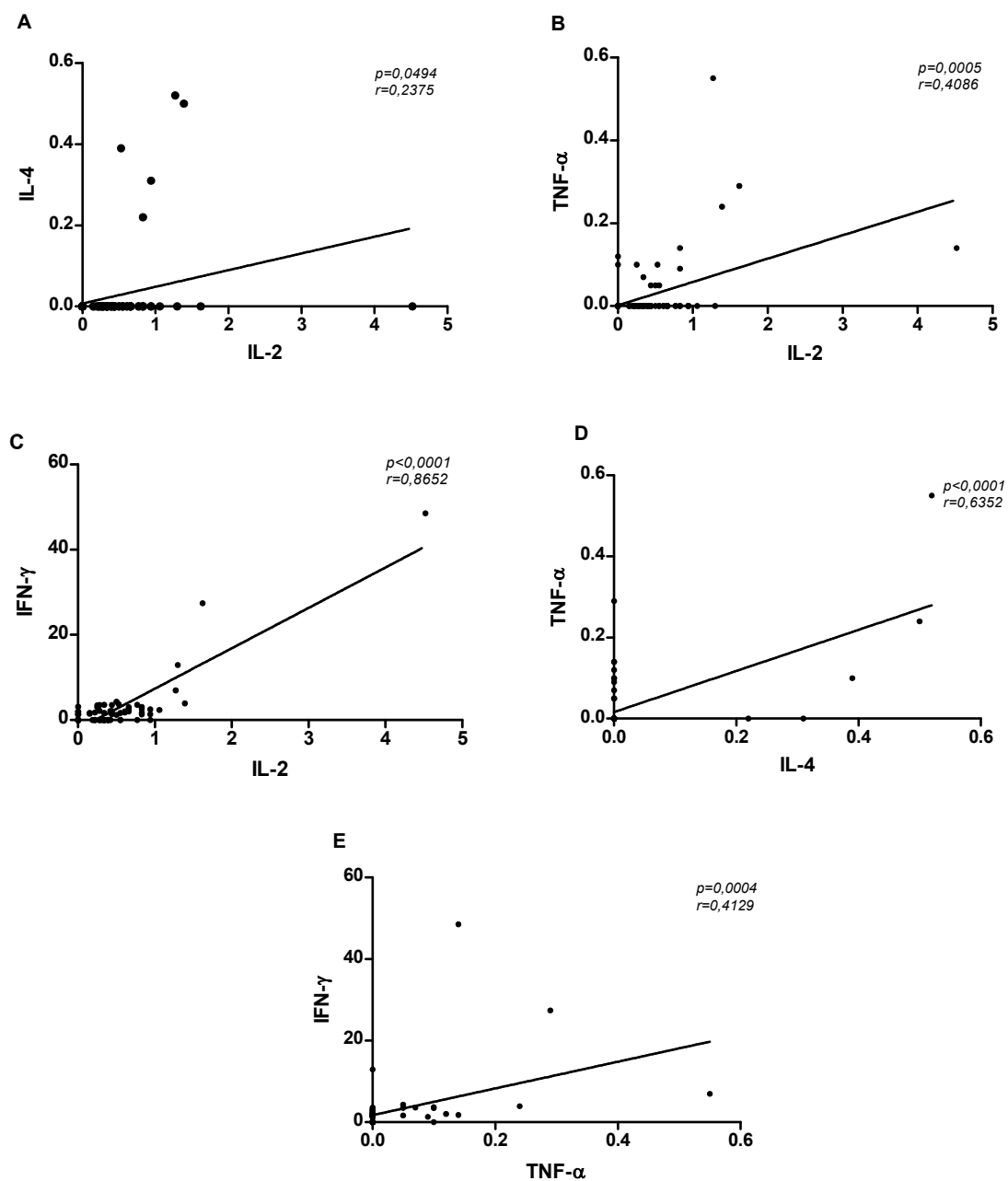


Figure 5



Legend page

Figure 1. The association of serum levels of IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-6 and IL17A of blood donors (controls) and HCV⁺ patients over the HCV genotypes. Differences were considered significant with $p < 0.001$ (p^{***}). The cytokines levels were measured with cytometric bead array. Data are shown as mean $\pm$ SD. Kruskal-Wallis.

Figure 2. The association of serum levels of IL-2, IFN- γ , TNF- γ , IL-10, IL-6 and IL17A and IL- 6 variants. Differences were considered significant with $p < 0.001$ (p^{***}). The cytokines levels were measured with cytometric bead array. Data are shown as mean $\pm$ SD. Mann- Whitney test was used to evaluate the statistical significance.

Figure 3. The association of serum levels of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 and IL17A and TNF- α variants. Differences were considered significant with $p < 0.001$ (p^{***}), $p=0.0234$ (p^*) e $p=0.0100$ (p^*). The cytokines levels were measured with cytometric bead array. Data are shown as mean $\pm$ SD. Mann- Whitney test was used to evaluate the statistical significance.

Figure 4. The association of serum levels of IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-6 and IL17A and IL- 10 variants. The cytokines levels were measured with cytometric bead array. Differences were considered significant with $p < 0.0016$ (p^{**}) $p < 0.001$ (p^{***}). Data are shown as mean $\pm$ SD. Mann- Whitney test was used to evaluate the statistical significance.

Figure 5. Simple linear correlation between the cytokines in the peripheral blood of HCV⁺ patients. The cytokines levels were measured with cytometric bead array. The association between the serum levels of IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 and IL17A. Statistically significant correlations identified by Pearson's analysis are shown with p and r indexes in the figure.