



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**



**JEAN LUDGER BARTHELEMY**

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP) EM GENES DE IL-2 E  
IL-2R $\beta$  E O NÍVEL SÉRICO DAS CITOCINAS DO PERFIL TH1, TH2 E TH17 EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

**MANAUS-AM**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**



**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**JEAN LUDGER BARTHELEMY**

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP) EM GENES DE IL-2 E  
IL-2R $\beta$  E O NÍVEL SÉRICO DAS CITOCINAS DO PERFIL TH1, TH2 E TH17 EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dra. Andrea Tarragô Monteiro

**MANAUS-AM**

**2020**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B285a Barthelemy, Jean Ludger  
Análise dos polimorfismos de base única (SNP) em genes de IL-2, IL2-2R e o nível sérico das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C. / Jean Ludger Barthelemy . 2020  
73 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie  
Coorientadora: Andrea Tarragô Monteiro  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Hcv. 2. Il-2. 3. il-2rb. 4. polimorfismos.. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**JEAN LUDGER BARTHELEMY**

**ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DE BASE ÚNICA (SNP) EM GENES DE IL-2 E  
IL-2R $\beta$  E O NÍVEL SÉRICO DAS CITOCINAS DO PERFIL TH1, TH2 E TH17 EM  
PACIENTES INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-  
Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Amazonas, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: 16 de setembro de 2020

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Malheiro Alle Marie  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Aya Sadahiro  
Universidade Federal do Amazonas

---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Luís André Morais Mariúba  
Instituto Leônidas Marie Deane – FIOCRUZ Amazônia

*Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais **Ena Sibella e Victor Gerard Barthelemy** pelo amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por toda benção recebida, por renovar a cada dia a minha esperança, por ter me dado força e coragem para realizar esse sonho e por sempre me conduzir nos caminhos certos.

Aos meus queridos e amados pais, **Ena e Victor Gerard**, apesar de estar longe, sempre me incentivou. Obrigado pais, pelo seu amor, pelas suas orações e por me ensinaram os valores da vida. A saudade é muito grande.

A minha esposa **Dana Deborah** por todo carinho, pela paciência e por me incentivar nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos irmãos, **Maritza, Rose Angie e Gerry**, por todo amor e carinho, sempre torcendo pelo meu sucesso.

A minha orientadora **Dra. Adriana Malheiro** pela oportunidade e ensinamentos, por contribuir no meu processo de amadurecimento.

A minha co-orientadora **Dra. Andrea Tarragô**, por todos os ensinamentos, por todo apoio e contribuição no desenvolvimento do projeto, pela instrução durante o meu desenvolvimento na escrita científica. Você foi fundamental nesta etapa de formação.

Aos Msc **Pedro Viera**, Msc **Juliana Alfonso**, Msc **Diana**, por toda colaboração e por compartilhar seus conhecimentos.

A todas os membros do grupo Hepatite, especialmente Msc **Keyla** e Msc **Thaina**, por toda colaboração.

A todos os indivíduos envolvidos nesta pesquisa, **pacientes da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado** e a todos **os candidatos a doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas** por entenderam e aceitaram participar.

**A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas** pelo espaço oferecido no laboratório e núcleo de ensino.

A toda equipe do **Laboratório genômica da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas**, por todo apoio.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de mestrado.

Ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)** pela oportunidade de capacitação e qualificação profissional.

A **Universidade Federal do Amazonas** pela oportunidade oferecida através do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Enfim, obrigado a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1:</b> Sequências dos primers e a ciclagem que foram utilizadas nas reações em cadeia da polimerase.....	-37-
<b>Tabela 2:</b> Descrição das enzimas de restrição e do tamanho dos fragmentos que foram obtidos a partir da reação de restrição.....	-37-
<b>Tabela 3:</b> Caracterização da população do estudo.....	-43-
<b>Tabela 4:</b> Frequência dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos em indivíduos controles e pacientes com hepatite C .....	-44-
<b>Tabela 5:</b> Frequência dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos em pacientes com hepatite C, conforme o grau de fibrose.....	- 48-

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do vírus da Hepatite C (modificado).....	16-
<b>Figura 2:</b> Representação do genoma do vírus da hepatite C e das proteínas virais.....	17-
<b>Figura 3:</b> Replicação do HCV.....	19-
<b>Figura 4:</b> Estimativa global da prevalência da Hepatite c e a distribuição mundial dos genótipos.....	21-
<b>Figura 5:</b> Taxa de detecção de hepatite C por 100 mil habitantes, região norte, Nordeste, Sul, sudeste, centre oeste, Brasil, 2007 a 2017.....	22-
<b>Figura 6:</b> Representação esquemática das vias de sinalização da IL-2.....	28-
<b>Figura 7:</b> Fluxograma demonstrativo das etapas desenvolvidas no projeto.....	35-
<b>Figura 8:</b> Análise do polimorfismo -330 T/G da IL-2 em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).....	39-
<b>Figura 9:</b> Análise do polimorfismo -2425 G/A da IL-2 em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).....	40-
<b>Figura 10:</b> Análise do polimorfismo +10558 G/A do IL-2R $\beta$ em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).....	42-
<b>Figura 11:</b> Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- $\alpha$ (C) e IFN- $\gamma$ (D) entre grupo controle (CN) e pacientes com Hepatite C ( HCV.....	50-
<b>Figura 12:</b> Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL- 4 (A), IL- 10 (B) e IL-17A (C) entre grupo controle (CN) e pacientes com Hepatite C (HCV) .....	52-
<b>Figura 13:</b> Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas entre grupo de pacientes com hepatite classificado com o grau de progressão da fibrose em $\leq$ F2 e $>$ F2.....	53-
<b>Figura 14:</b> Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL- 2 (A), IL- 4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF- $\alpha$ (E), INF $\gamma$ (F), IL-17 A (G) entre os genótipos dos SNPs estudados .....	55-

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Por cento
°C	Grau(s) Celsius
®	Marca registrada
<b>BCL-2</b>	Proteína do linfoma de células B2
<b>BSF-2</b>	Fator de diferenciação de células B
<b>CBA</b>	“ <i>Cytometric Bead Array</i> ”
<b>CD81</b>	“ <i>Cluster of differentiation 81</i> ”
<b>CLDN1</b>	Claudina-1
<b>CNPQ</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados a danos
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EGFR</b>	Receptor de fator de crescimento epidérmico
<b>FMT-HVD</b>	Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado
<b>FHEMOAM</b>	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>HCV</b>	Vírus da Hepatite C
<b>HSF</b>	Fator estimulante de hepatócito
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidade
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNB2</b>	Interferon beta-2
<b>IFR3</b>	Fator de resposta ao interferon 3
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRES</b>	Entrada ribossomal
<b>IRF3</b>	Fator de resposta ao interferon 3
<b>LDL</b>	Lipoproteína
<b>MCL-1</b>	“ <i>Myeloid cell leukemia-1</i> ”
<b>MDA5</b>	Receptor do gene de melanoma associado à diferenciação 5
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NF-κB</b>	Fator nuclear Kb
<b>NK</b>	Exterminadora natural
<b>NPC1L1</b>	“ <i>Niemann Pick C1 like 1</i> ”

<b>OCLN</b>	Ocludina
<b>ORF</b>	Quadro de leitura aberto
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PKR</b>	Protease quinase R
<b>PRR</b>	Receptor de reconhecimento de padrões
<b>RFLP</b>	Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição
<b>RIG-I</b>	Receptor do gene indutível por ácido retinóico I
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SR-B1</b>	Receptor Scavenger classe B tipo 1
<b>TBK1</b>	<i>‘Tank-binding kinase 1’</i>
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TLR</b>	Receptor de tipo toll
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>UTR</b>	Região não traduzida
<b>μL</b>	Microlitro
<b>WHO</b>	Organização mundial de saúde
<b>SNP</b>	Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
<b>SAA</b>	Amilóide sérica A

## RESUMO

A hepatite C é uma doença de curso variável onde a maioria dos casos resulta em infecção crônica, que pode levar a cirrose, hepatocarcinoma e transplante de fígado. Somente uma minoria de pessoas infectadas é capaz de eliminar o vírus durante a fase aguda sem qualquer intervenção terapêutica. Os fatores explicando essas diferenças, ainda não são bem elucidados. Neste sentido, esse estudo teve como objetivos analisar os polimorfismos da IL-2 (rs2069762, rs4833248) e do IL-2R $\beta$  (rs1003694), e a relação desses polimorfismos com a produção das citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C. Foram analisados neste estudo, 149 amostras de indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C e 100 de indivíduos saudáveis. A extração de DNA foi feita, utilizando-se o Kit *Brazol*®. A determinação das frequências alélicas dos polimorfismos foi obtida por PCR-RFLP. A dosagem das citocinas foi feita por Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array). As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism 5.0. Os SNPs estudados, apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas frequências genotípicas e alélicas entre os grupos estudados. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, apresentaram-se aumentadas nos pacientes HCV+ quando comparado aos controles. O Fator de necrose tumoral foi maior no grupo controle em comparação com o grupo de pacientes. Não foi observada diferença estatística significativa no nível de IFN- $\gamma$  entre os grupos. A fibrose > f2 foi caracterizada por uma alta produção de IL-2. Os resultados obtidos sugerem que o SNP IL2 rs4833248 e o SNP rs1003694 não estão relacionados ao desenvolvimento da Hepatite C, o SNP IL-2 rs2069762 poderia estar relacionado a cronicidade da doença e a alta produção de IL-2 na fibrose >2 está relacionada a uma atividade fibrogênica aumentada em pacientes com hepatite C.

**Palavras chaves:** HCV, IL-2, IL-2R $\beta$ , polimorfismos.

## ABSTRACT

Hepatitis C is a disease with a variable course where most cases result in chronic infection, which can lead to cirrhosis, hepatocarcinoma and liver transplantation. Only a minority of infected people are able to eliminate the virus during the acute phase without any therapeutic intervention. The factors explaining these differences are not yet well understood. In this sense, this study aimed to analyze the polymorphisms of IL-2 (rs2069762, rs4833248), and IL-2R $\beta$  (rs1003694), and the relationship these polymorphisms with the production of cytokines of the profile Th1, Th2 and Th17 in patients infected with the Hepatitis C virus. In this study, 149 samples from individuals infected with the hepatitis C virus and 100 from healthy individuals were analysed. DNA extraction was performed using the Brazol® Kit. The determination of the allele frequencies of the polymorphisms was obtained by PCR-RFLP. The measurement of cytokines was performed by Flow Cytometry CBA (Cytometric Bead Array). Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism 5.0 program. The SNPs studied, were presented in Hardy-Weinberg equilibrium. No statistically significant were found in genotype and allele frequencies between the groups studied. The cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, were increased in HCV + patients when compared to controls. The tumor necrosis factor was higher in the control group compared to the patient group. There was no statistically significant difference in the IFN- $\gamma$  level between the groups. Fibrosis  $\geq$  f2 was characterized by a high production of IL-2. The results obtained suggest the SNP IL2 rs4833248 and the SNP rs1003694 are not related to the development of Hepatitis C, the SNP IL-2 rs2069762 could be related to the chronicity of the disease and the high production of IL-2 in fibrosis  $\geq$  2 is related to increased fibrogenic activity in patients with hepatitis C.

**Keywords:** HCV, IL-2, IL-2R $\beta$ , polymorphisms.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1 Vírus da hepatite C .....	17
2.2 Replicação viral .....	18
2.3 Genótipos de HCV .....	20
2.4 Epidemiologia .....	21
2.5 Vias de Transmissão .....	23
2.6 Resposta imune contra HCV .....	24
<b>2.6.1 Resposta Imune Inata .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.2 Resposta imune adaptativa .....</b>	<b>26</b>
2.7 Interleucina 2 (IL-2).....	27
<b>2.7.1 Atividade pleiotrópica da IL-2 .....</b>	<b>27</b>
<b>2.7.2 Via de sinalização da IL-2 .....</b>	<b>28</b>
2.8 Subunidade Beta do receptor da IL-2 .....	29
2.9 Polimorfismos Genéticos .....	30
<b>2.9.1 Polimorfismos de IL-2.....</b>	<b>31</b>
<b>2.9.2 Polimorfismos de IL-2RB .....</b>	<b>32</b>
<b>3.OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Tipo de estudo.....	34
4.2 População de estudo.....	34
4.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	34
4.4 Aspectos Éticos .....	35
4.5 Coleta dos dados e do material biológico .....	35
4.6 Quantificação de citocina.....	37
4.8 Extração de DNA .....	37
4.8 Genotipagem dos polimorfismos .....	38
4.8.1 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs2069762.....	39
4.8.2 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs24833248..	40
4.8.3 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs1003694....	41
4.9 Análises Estatística .....	43

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1 Caracterização da população.....	44
5.2 Frequências alélicas e genóticas .....	45
5.3 Associação dos Polimorfismos estudados com o grau de fibrose. ....	48
5.4 Análise das citocinas séricas TH1, Th2 e TH17 .....	50
5.4.1 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas pró-inflamatórias e do perfil Th1 entre grupos de pacientes HCV + e Controle. ....	50
5.4.2 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas do perfil Th2 e Th17 entre grupos de pacientes HCV + e Controle. ....	52
5.5 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1, Th2, Th17.....	54
5.6 Associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados e a média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1, Th2, Th17.....	55
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>

## INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 185 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus da hepatite C (HCV) em todo mundo (WHO, 2018). Estima-se que 80 % das pessoas infectadas residem em países de baixa renda e subdesenvolvidos (MESSINA et al., 2015).

Na maioria dos casos, a infecção pelo HCV resulta em infecção crônica que pode progredir para fibrose e hepatocarcinoma, enquanto aproximadamente 20-30 % dos indivíduos infectados são capazes de eliminar o vírus espontaneamente, durante a fase aguda sem qualquer intervenção terapêutica (*clearance* viral espontâneo) (HOOFNAGLE, 2002). Os mecanismos explicando essas diferenças não são completamente elucidados. Mas muitos estudos sugerem que o perfil de citocinas pode desempenhar um papel importante na resposta contra o HCV (LARRUBIA et al., 2008; ZHEN-QI et al., 2015; SOUZA-CRUZ et al., 2016; HENGST et al. 2016; PEREIRA et al., 2019).

No entanto, a produção das citocinas é influenciada por fatores genéticos, e varia entre indivíduos em função de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) localizados em regiões reguladores/codificadores dos genes que codificam essas proteínas (HOFFMANN; STANLEY; COX et al., 2001) e que conseqüentemente pode afetar a evolução e a gravidade da doença (OLLIER, 2004). Além disso, estudos indicam associação entre a infecção pelo HCV e polimorfismos em genes envolvidos na sinalização dessas citocinas (RECHERMANN, 2000; OLEKSYK et al., 2005)

A interleucina 2 (IL-2) é uma das citocinas produzidas por células do sistema imune que se destaca pelas suas ações imunomoduladoras (BOYMAN; SPRENT, 2012). Apresenta um papel crucial na manutenção da homeostase e na auto-tolerância do sistema imune (CHURLAUD et al., 2014). Participa da regulação das atividades funcionais e da proliferação das células T e das células exterminadoras naturais (NK), além de regular a expansão e a apoptose de células T ativadas (SEDER; PAUL, 1994).

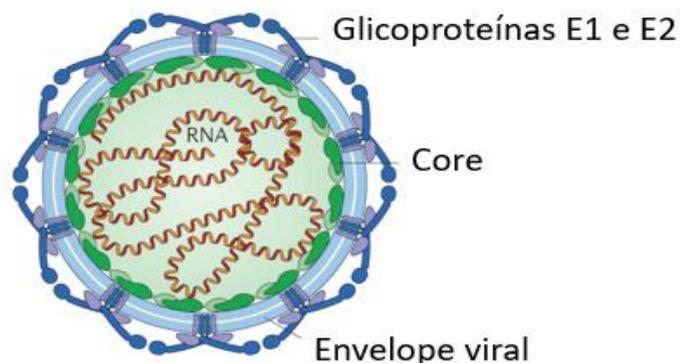
Nesse sentido, esse projeto visou investigar a associação dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes da interleucina 2 (IL-2) especificamente rs4833248 e rs2069762 e do receptor  $\beta$  da IL-2 (IL-2R $\beta$ ) rs1003694 e a relação desses polimorfismos com a produção das citocinas Th1, Th2 e Th17 no desenvolvimento da hepatite C.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é pertencente ao gênero *Hepacivirus* incluído na família *Flaviviridae*. Possui entre 30 e 60 nanômetros de diâmetro, seu genoma é composto por uma fita de RNA simples de polaridade positiva apresentando tamanho de 9,6 kilobases (CHOO et al., 1989; HOOFNAGLE, 2002) (**Figura 1**).

O genoma do HCV apresenta uma longa fase de leitura aberta ininterrupta (ORF- *open reading frame*) que codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3 000 aminoácidos. Inclui também regiões nas extremidades 5' e 3' não traduzidas (UTRS) que contêm estruturas de RNA secundário essenciais para replicação viral. A extremidade 5' (UTR) é uma região interna de entrada ribossomal (IRES), onde a tradução da poliproteína é iniciada (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; SCHEEL; RICE, 2013).

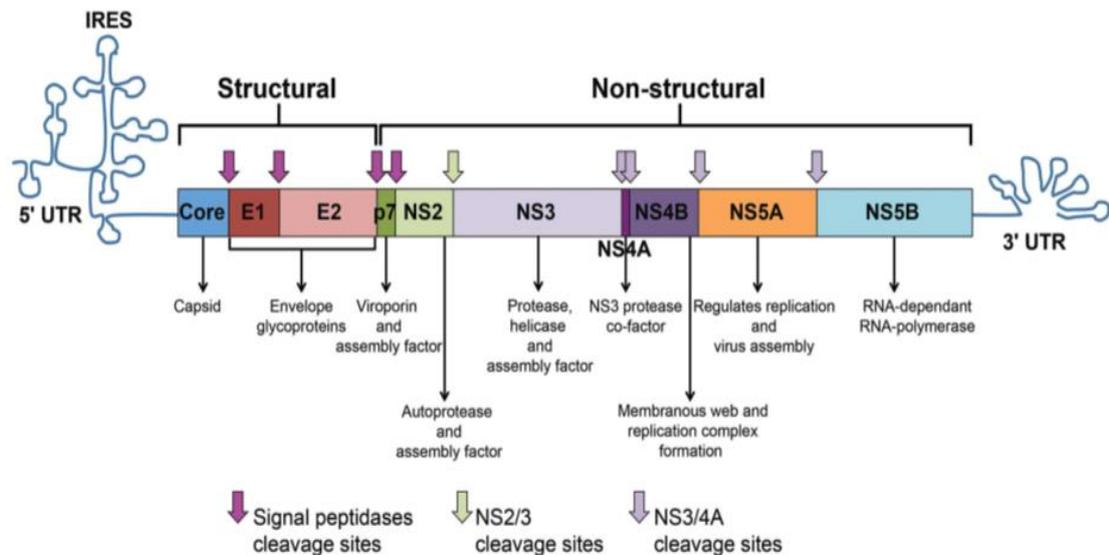


**Figura 1:** Representação esquemática do vírus da Hepatite C (modificado)

**Fonte:** LINDENBACH; RICE, 2013; CHO et al., 1989.

A poliproteína codificada pelo genoma do HCV é processada por uma combinação de proteases celulares e virais em três proteínas estruturais (Core, E1, E2) e sete proteínas não estruturais (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (**Figura 2**) (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

A proteína *core* é uma proteína de ligação ao RNA viral que compõe o nucleocapsídeo. Esta proteína tem a capacidade de modular as funções das células hospedeiras (MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007). As glicoproteínas E1 e E2 são proteínas transmembranas e componentes essenciais do envelope do HCV, interagem com os receptores das células hospedeiras e mediam a entrada do vírus, dependendo do pH citoplasmático. A proteína E2 contém regiões hipervariáveis que são alvo de anticorpos (SCHEEL; RICE, 2013).



**Figura 2:** Representação do genoma do vírus da hepatite C e das proteínas virais.

**Fonte:** ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014.

As proteínas não estruturais (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) não são incorporadas nas partículas virais, mas desempenham um papel importante no processamento da proteína viral e na replicação do vírus (LAUER; WALKER, 2001; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

A proteína p7 atua como canal de cálcio e sua função durante a replicação não é bem definida, mas alguns estudos sugeriram que interações entre E1, E2 e p7 são essenciais para montagem do vírus (DUBUISSON; COSSET, 2014).

A NS2 possui atividade auto-protease sendo responsável pela clivagem da poliproteína entre o NS2 e NS3. A NS3 atua como serina protease em combinação com NS4A que atua como cofator para catalisar o processamento da poliproteína. A NS3 apresenta também atividade de RNA helicase ATPase. As funções de NS4B e NS5A não são bem definidas, mas alguns estudos mostraram que NS4B induz a formação de um compartimento onde a replicação viral ocorre. A NS5B é a RNA polimerase dependente de RNA, é responsável pela replicação do vírus. Como todas as RNA polimerases, ela é sujeita a vários erros, pois não tem uma atividade revisora. (LI; LEMON, 2013).

## 2.2 Replicação viral

Devido às pouquíssimas linhagens de células que são suscetíveis a replicação do vírus da hepatite C, os modelos de investigação do ciclo de replicação do HCV são escassos. Além disso, o chimpanzé é o único animal ideal na investigação sobre a patogênese e a imunidade

relacionados com o HCV, mas atualmente as pesquisas usando chimpanzés como modelos de estudo são restritas (TELLINGHUISEN et al., 2007).

O vírus de hepatite C se replica principalmente nos hepatócitos humanos, porém há relatos que o vírus é capaz de se replicar em outros tipos de células como as células mononucleares de sangue periférico (FEDERICO et al., 2014).

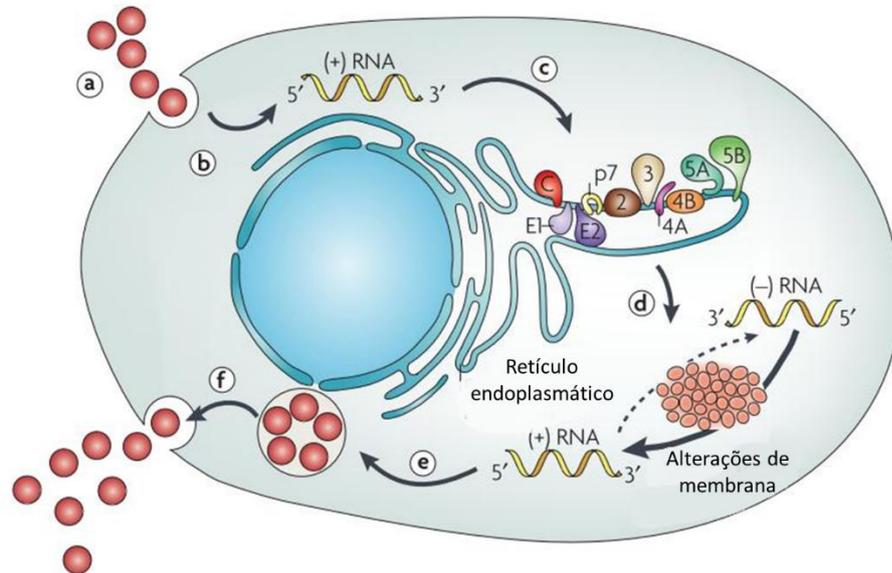
O ciclo viral do HCV é formado por várias etapas: a entrada do vírus, a liberação do genoma dentro do citoplasma da célula hospedeira, a tradução, a replicação do RNA, a montagem e a liberação das partículas virais (**Figura 3**).

A entrada do vírus é mediada pelo reconhecimento e pelas interações das proteínas do envelope viral (E1 e E2) com os receptores da célula hospedeira. Os primeiros receptores descritos para o HCV foram: a proteína *cluster of differentiation 81* (CD81) e o *receptor scavenger class B type 1* (SR-B1) (PILERI et al 1998; SCARSELLI et al 2002). Os receptores de lipoproteína (LDL) e os glicosaminoglicanos (GAG) são reconhecidos por mediar a ligação inicial às células suscetíveis antes da interação com CD81 e SR-B1. Além desses receptores, outras proteínas atuam como receptores e co-receptores para o HCV, tais como: as proteínas de junção celular claudina-1 (CLDN1) e ocludina (OCLN), o receptor de colesterol Niemann Pick C1 like 1 (NPC1L1), o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (EVANS et al., 2007; PLOSS et al., 2009; LUPBERGER et al., 2011; SAINZ et al., 2012).

A ligação do HCV aos receptores da célula hospedeira é seguida pela fusão do envelope viral com a membrana endossomal e a liberação do genoma viral no citosol, mediada por clatrina. A entrada do vírus é facilitada pelo baixo pH. No citoplasma, o genoma se acopla ao ribossomo, sofrendo a tradução de RNA mensageiro. E em seguida, a poliproteína é translocada para a membrana do retículo endoplasmático. Proteases do hospedeiro e do vírus participam do processo de pós-tradução da poliproteína do HCV, dando origem as proteínas estruturais e não estruturais (DUBUISSON; HELLE; COCQUEREL, 2008).

Uma vez que o genoma foi traduzido, inicia-se a replicação viral. Ela ocorre em membranas derivadas do retículo endoplasmático, onde fitas de RNAs de polaridade negativa servem como moldes para produzir numerosas fitas de RNAs de polaridade positiva que são subsequentemente usados para a tradução da poliproteína ou síntese de novos intermediários de replicação. As proteínas não estruturais NS3/4A, NS4B, NS5A e NS5B constituem a maquinaria da replicação. A RNA polimerase dependente de RNA (NS5B) é a enzima chave da síntese de RNA. Alguns cofatores do hospedeiro participam também na replicação, por exemplo: microRNA 122 (miR-122) e Ciclofilina A. Em seguida, ocorre a montagem do vírion

no complexo de golgi e posteriormente é libertado a partir da célula (PEZACKI; SINGARAVELU; LYN, 2010).



**Figura 3:** Replicação do HCV

a) a ligação e a entrada do vírus; b) Liberação no citoplasma; c) Tradução mediada-IRES e processamento da lipoproteína; d) Replicação do RNA; e) empacotamento e montagem; f) Liberação das partículas virais.

**Fonte:** MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007. (Modificado)

### 2.3 Genótipos de HCV

Devido à replicação defeituosa do genoma do vírus pela RNA polimerase, que provoca o surgimento de pequenas e constantes mutações; o genoma do HCV é altamente variável. Atualmente, os dados filogenéticos e a análise das sequências de genomas virais inteiras, permitem a caracterização do vírus em genótipos, subtipos e quasispecies (SMITH et al., 2014).

As quasispecies são variações dentro de um mesmo genótipo e subtipo, devido à pressão imunológica. A diversidade de quasispecies costuma ser pequena durante as fases iniciais da doença, com aminotransferases normais, e maior nos casos de doenças hepáticas mais avançada e/ ou baixa resposta terapêutica, desempenhando um papel importante na progressão da infecção viral (ROSEN; GRETCH, 1999).

Baseada na similaridade da sequência de nucleotídeos, o vírus da hepatite C é classificado em 7 genótipos e aproximadamente 67 subtipos diferentes (SMITH et al., 2014). Os diferentes subtipos apresentam diferença, nos padrões de virulência, na distribuição geográfica e na resposta à terapia antiviral. Os genótipos são definidos por números de 1 a 7, enquanto os

subtipos são representados por letras: a, b, c e assim por diante (CHAYAMA; HAYES, 2011; NEWMAN et al., 2013).

O genótipo 1 apresenta a maior taxa de prevalência e é encontrado em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 46 % de todas as infecções pelo HCV, seguido pelo genótipo 3 (30%), genótipo 2 (9,1%), genótipo 4 (8,3%), genótipo 6 (5,4%) e pelo genótipo 5 (1%). Os genótipos 2 e 6 são encontrados principalmente na Ásia Oriental. O genótipo 3 é mais comum no sul da Ásia. O genótipo 4 é mais prevalente no norte da África e no oriente Médio. O genótipo 5 é mais frequente no sul e no leste da África Subsaariana. O genótipo 7 foi encontrado somente uma vez no Canadá em um imigrante da África central (MESSINA et al., 2015).

Os genótipos encontrados no Brasil são: 1, 2, 3, 4, 5. O genótipo 1 é o mais comum (64%), seguido pelos genótipos 3 (30%) e 2 (5%). Os genótipos 4 e 5 têm as menores taxas de prevalência (<1%). O genótipo 1 é mais comum na região norte. O genótipo 2 é mais frequente na região centro-oeste. O genótipo 3 é mais prevalente na região sul (BRUGGMANN et al., 2014).

Na região norte, além do genótipo 1, estudos têm descritos os genótipos 2 e 3. Os subtipos 1b, 2b e 3a são os mais comuns (VIEIRA et al., 2011).

No Amazonas, os genótipos 1 e 3 têm as maiores taxas de prevalência, (64%) e (30%) respectivamente. Os genótipos 2, 4 e 5 são menos frequentes e têm como taxas de prevalência (4,6 %), (0,2) % e (0,1%) respectivamente. Entre os doadores de sangue, o genótipo 1 é o mais comum (87% na capital e no interior do estado), seguido pelo genótipo 3 (12,9 % apenas na capital) (TORRES et al., 2009).

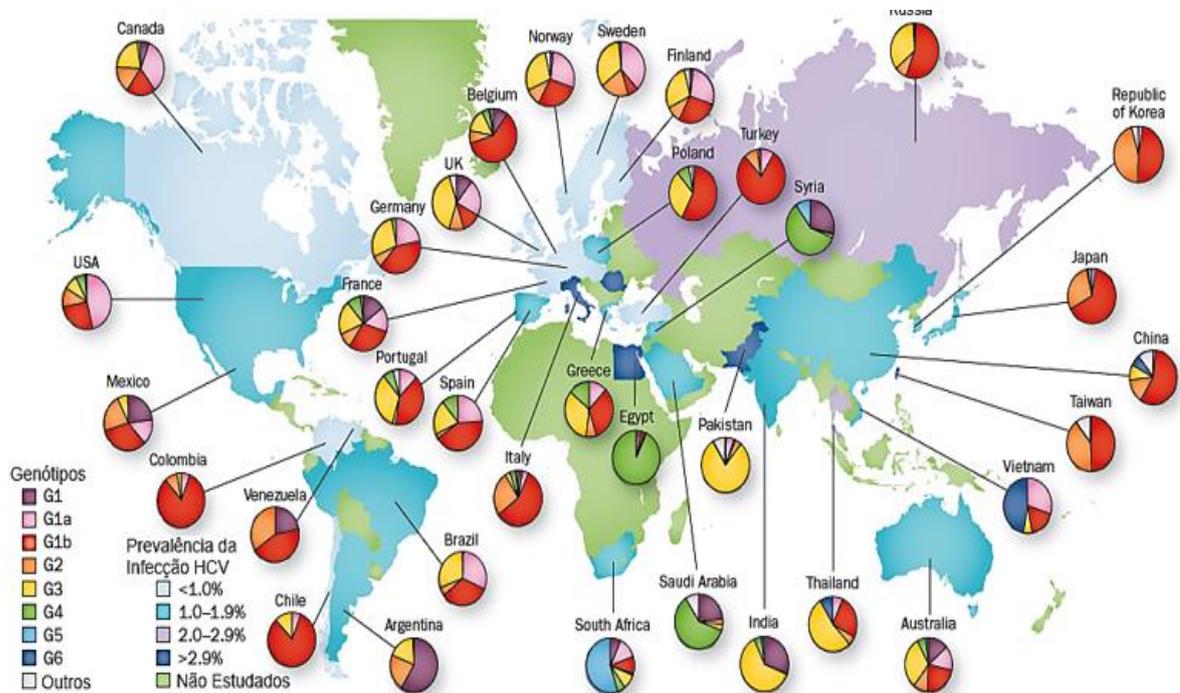
Na cidade de Manaus, de acordo com um estudo realizado por Araújo e colaboradores, em uma população de 69 pacientes portadores de hepatite C crônica, o genótipo 1 é o que tem a maior taxa de prevalência (54,2%), seguido pelo genótipo 3 (25%) e pelo genótipo 2 (20,8 %) (ARAÚJO et al., 2011).

## **2.4 Epidemiologia**

Estima-se que 71 milhões de pessoas são portadores da infecção crônica do HCV em todo mundo. E de acordo, com a organização mundial da saúde, a hepatite C é responsável pela morte de aproximadamente 399 000 pessoas por ano em todo mundo (WHO, 2018).

A prevalência da infecção pelo HCV é caracterizada por uma alta variabilidade entre as regiões geográficas e grupos populacionais. Segundo as estimativas globais, as regiões que apresentam uma alta prevalência (>5%) são: a África ocidental e o Oriente Médio, onde o Egito

é o país que tem a maior prevalência (>10%). As regiões com menor prevalência (<1,5%) são: a América do Norte, Austrália, Japão, Europa do Norte e ocidental (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013; ANSALDI et al., 2014) (**Figura 4**).

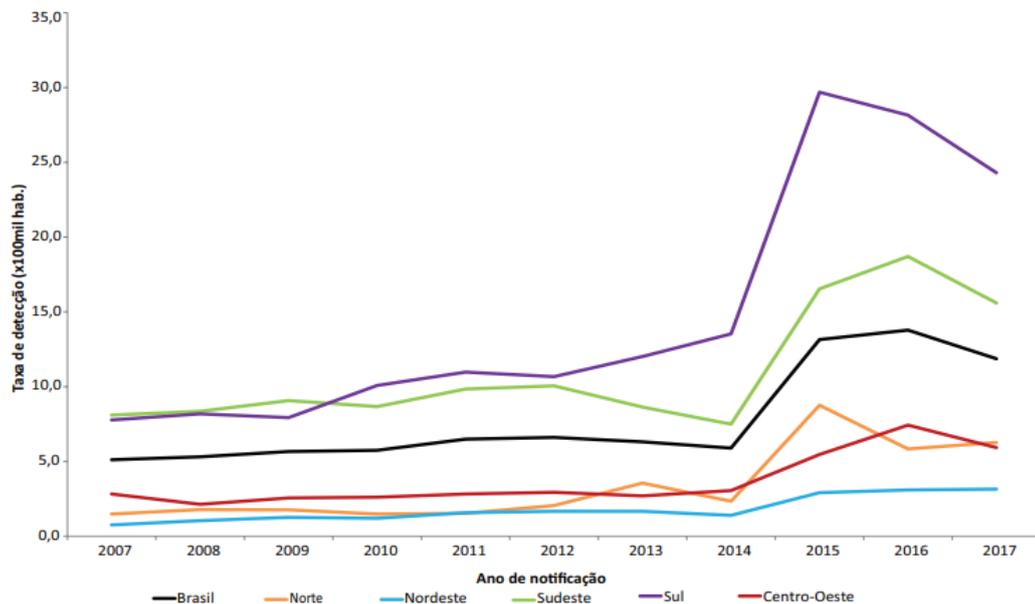


**Figura 4:** Estimativa global da prevalência da Hepatite c e a distribuição mundial dos genótipos  
**Fonte:** HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013; WHO, 2017.

No Brasil, a taxa de detecção da hepatite C na população em geral, em 2017, é de aproximadamente (10 casos por 100 mil) habitantes. A região sul tem a maior taxa de detecção (~ 30 casos por 100 mil habitantes), seguida pela região sudeste (~15). A região norte e a região centro oeste apresentaram a mesma taxa (~5). A menor taxa foi observada na região Nordeste (~3) (BRASIL, 2018) (**Figura 5**).

Em relação as capitais, a capital com maior taxa de detecção descrita foi Porto Alegre-Rs (90,7casos por 100 mil habitantes), seguida por São Paulo-SP (36,1 por 100 mil habitantes) e Brasília-DF como a capital com menor taxa de detecção (4,2) (BRASIL, 2018). Na região amazônica, as taxas de incidência de infecção pelo vírus da hepatite C na população geral, variam entre 1,1 % a 2,4 % e as taxas de prevalência entre os doadores de sangue, variam de 0,8 % a 5,9 % (FONSECA, BRASIL, 2004).

No Amazonas, de acordo com um estudo realizado por Torres e colaboradores, entre o ano 2005 a 2007, a infecção pelo vírus da hepatite C é responsável pelo descarte de 0,32 % dos sangues coletados de doadores de sangue (TORRES et al., 2009)



**Figura 5:** Taxa de detecção de hepatite C por 100 mil habitantes, região norte, Nordeste, Sul, sudeste, centro oeste, Brasil, 2007 a 2017.

**Fonte:** MS/SVS/Departamento de vigilância, Prevenção e controle das IST, do HIV/Aids e das hepatites virais.

## 2.5 Vias de Transmissão

A principal via de transmissão do HCV é a parenteral, através da exposição ao sangue e derivados contaminados (STOKMAN et al., 2014). No Brasil, a transfusão de sangue e hemoderivados era o principal fator de risco para transmissão da hepatite C antes de 1993. Porém a partir dessa data, com a inclusão dos métodos de triagem pré-doação houve uma redução significativa na transmissão do HCV por meio da transfusão de hemoderivados (BUSCH; KLEINMAN; NEMO, 2003).

Atualmente o uso de drogas injetáveis tornou-se o principal fator de risco de infecção pelo HCV, após a redução na transmissão por transfusão de hemoderivados (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011). Estima-se que mais de 64 % dos usuários de drogas injetáveis estejam infectados com o HCV (WARD, 2013). Nos países desenvolvidos, o uso de drogas injetáveis é responsável por cerca de 70 % a 80 % das contaminações (ALTER, 2007).

A transmissão vertical é uma via de transmissão do HCV durante a infância. Os fatores de risco para transmissão incluem: carga viral da mãe, trabalho de parto prolongado, monitoração fetal interna e co-infecção HIV/ HCV. O aleitamento materno não é considerado como um risco para aumentar a transmissão do HCV (MAST et al., 2005).

Procedimentos médicos e exposição nosocomial são umas das vias mais importantes de infecção pelo HCV. São considerados como principais modos de transmissão em países com alta prevalência, como o Egito. Nesse país, a maioria dos indivíduos foram contaminados pela reutilização de seringas durante a campanha de erradicação da esquistossomose entre 1950 e 1980. A transmissão nosocomial também é muito comum em pacientes que realizaram hemodiálise (MARTINS; NARCISO-SCHIAVON; SCHIAVON, 2011).

A exposição ocupacional é a principal via de transmissão entre os profissionais de saúde. A transmissão ocorre por acidentes com matérias perfurocortantes e exposição das mucosas. Cerca de 75 % das infecções por exposição ocupacional são de exposição percutânea e aproximadamente 25 % são de exposição por mucosas. Outras vias de transmissão do HCV incluem: a transmissão sexual e transplante de órgãos. Os fatores de risco para transmissão sexual são: maior número de parceiros sexuais, presença de doenças de transmissão sexual (COPPOLA et al., 2016).

## **2.6 Resposta imune contra HCV**

### **2.6.1 Resposta Imune Inata**

A resposta imune inata é considerada como a primeira linha de defesa do organismo contra o HCV, desempenha um papel importante no reconhecimento e na eliminação da infecção viral (TERILLI; COX, 2013).

A detecção do vírus é feita através dos receptores Toll like (TLRs). Os TLRs são uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem uma grande variedade de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs), incluindo lipídeos, lipoproteínas, proteínas, glicanos e ácidos nucleicos. São responsáveis pela ativação da expressão dos genes envolvidos em respostas imunes inflamatórias (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Os TLRs são expressos em várias células imunes, como: macrófagos, células dendríticas (DCs), células B, mas também em fibroblastos e células epiteliais. Existem pelo menos 10 TLRs em humanos descritos e quatro deles estão envolvidos no reconhecimento dos ácidos nucleicos: TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9. O TLR3 detecta dsRNA, o TLR-7 e o TLR-8 reconhecem ssDNA e o TLR9 interage com DNA metilado. Os TLRs envolvidos no reconhecimento dos ácidos nucleicos estão localizados em compartimentos endossomais (BARTON; KAGAN, 2009; HOWELL et al., 2013).

Outros TLRs estão envolvidos na detecção das proteínas do vírus, por exemplo: os TLRs 1,2 e 6 que reconhecem a proteína estrutural *core* e a proteína não estrutural NS3, e o TLR-4 que reconhece a proteína não estrutural NS5A. Esses TLRs estão localizados na superfície da célula (BARTON; KAGAN, 2009; HOWELL et al., 2013).

A detecção do vírus de RNA, dentro do citoplasma, durante a replicação, é feita pelo receptor do gene indutível por ácido retinólico 1 (RIG-I) e pelo receptor do gene de melanoma associado à diferenciação 5 (MDA5). A ligação desses receptores ao RNA viral, resulta na ativação do fator de resposta ao interferon 3 (IFR3) e do fator nuclear KB (NF- $\kappa$ B) (LOO; GALE, 2011; HEIM, 2013).

O reconhecimento e a ligação do vírus aos TLRs desencadeiam uma cascata de sinalização que conduz a liberação e a regulação de citocinas pró-inflamatórias, de quimiocinas e da produção de interferon (IFN), que são responsáveis por induzir o estado antiviral das células e a ativação de outros componentes celulares, como as células exterminadoras naturais (NK), células dendríticas e macrófagos (HEIM; THIMME, 2014).

Apesar de permitir a ativação dos TLRs, o vírus da hepatite C é capaz de escapar da sinalização desencadeada pelos TLRs por vários mecanismos. Há relatos de que NS3/4A é capaz de reduzir a associação da proteína *Tank binding kinase 1* (TBK1) com Fator de resposta ao interferon 3 (IFR3), conseqüentemente inibe a ativação de IRF3, e NS5A tem capacidade de interferir na expressão de mRNA de TLR7 e também na cascata de sinalização de TLR7 (SATO et al., 2007; HEIM, 2013).

As células exterminadoras naturais (NK) fazem parte das células mais importantes na defesa do organismo contra hepatites virais. São mais numerosas no fígado do que nos outros órgãos. São classificadas em CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup>. As células Nk CD56<sup>dim</sup> são citotóxicas de natureza e são mais numerosas. São responsáveis por destruir as células infectadas e iniciar o processo da hepatite. As células NK CD56<sup>bright</sup> são responsáveis pela produção de citocinas, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que promovem o recrutamento das células inflamatórias intra-hepáticas, a maturação das células dendríticas e o aumento da sua capacidade para estimular a resposta Th-1 (CHAN et al., 2007).

Durante a infecção crônica, as células NK tendem a ser reduzidas no sangue e no fígado. Há estudos que mostraram que a ligação da proteína E2 do HCV à proteína CD81 das células NK interfere na produção de IFN- $\gamma$  e na citotoxicidade das células NK (CROTTA et al., 2002).

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) no organismo. São caracterizadas pela sua capacidade de induzir potentes respostas de células

T. São classificadas em dois grupos: células dendríticas mielóides (mDCs) e células dendríticas plasmocitóides (pDCs). As mDCs representam a maioria das células dendríticas e atuam no processamento e na apresentação de antígenos e produzem várias citocinas, tais como: IL-12, IL-15, IL-18. A IL-12 é importante para a diferenciação das células Thelper (Th) em células Th1. As pDCs têm como principal função secretar IFN-1( $\alpha$  e  $\beta$ ) em respostas a infecções virais (SHAW, 2008).

O papel e a função das células dendríticas durante a infecção crônica da hepatite C não são bem definidos. Há estudos que mostraram que as células dendríticas são defeituosas durante a infecção crônica e que as proteínas do HCV (core, E1, E2, NS3) são responsáveis pela indução de fenótipos defeituosos (LONGMAN et al., 2004).

Os macrófagos, assim como as células dendríticas são as células apresentadoras de antígenos. São considerados como sendo importantes células efetoras imunitárias. Estão envolvidos na remoção de restos celulares gerados durante a remodelação de tecidos e na destruição das células que sofrem apoptose. Produzem a IL-6, e outras citocinas como: IL-8, IL-10, IL-12, e TNF- $\alpha$ , óxido nítrico (NO) (RACANELLI; REHERMANN, 2006). Há relatos de que a proteína *core* do HCV interfere na produção de IL-12 e do NO (LEE et al., 2001).

### **2.6.2 Resposta imune adaptativa**

Ao contrário da resposta imune inata que atua horas ou dias após a infecção, a resposta imune adaptativa aparece em torno de 6 a 8 semanas após a infecção pelo HCV. O aparecimento se dá pelo desenvolvimento das células T e estímulos dos linfócitos B com a produção de anticorpos (HEIM; THIMME, 2014).

Os anticorpos produzidos contra os epítopos das proteínas do vírus não possuem atividade antiviral para bloquear a infecção devido às constantes mutações no genoma do vírus (THIMME et al., 2008). Mas, há estudos que mostraram que a produção de anticorpos na fase inicial da doença é crucial para eliminação espontânea do vírus (LOGVINOFF et al., 2004).

As células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são consideradas essenciais na eliminação espontânea do vírus devido às suas respostas direcionadas aos vários epítopos de diferentes proteínas de HCV. Porém, estudos mostraram que o vírus consegue escapar da resposta das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> devido às constantes mutações dentro dos epítopos. Estas mutações ocorrem precocemente e são fixadas na quasispecies (ERICKSON et al., 2001).

A falha das células T CD4<sup>+</sup> para sustentar uma resposta das células T CD8<sup>+</sup> é uma característica marcante da persistência da infecção pelo HCV. Em geral, a diminuição das

respostas antivirais das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> nos indivíduos com a forma crônica da hepatite C está relacionada com o desenvolvimento de fibrose e de cirrose (POYNARD et al., 2003).

Em relação à diferenciação das células Th em Th1, as citocinas pró-inflamatórias, como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  são responsáveis por essa diferenciação e as citocinas anti-inflamatórias, tais como: IL-4, IL-5, IL-13, IL-15 induzem a diferenciação das células Th em Th2 (LIASKOU et al., 2012; PARK et al., 2014)

Há relatos de que as citocinas Th1 são necessárias para a resposta imune antiviral e que as citocinas Th2 podem inibir a ação efetora das células Th1, desempenhando um papel importante na persistência da doença (LIASKOU et al., 2012; PARK et al., 2014).

## **2.7 Interleucina 2 (IL-2).**

Descoberta em 1975, a interleucina 2 (IL-2), é uma glicoproteína com uma estrutura globular de quatro hélice  $\alpha$  dobradas. Se origina a partir de um peptídeo precursor de 153 aminoácidos. Após ser processada, forma-se uma proteína de aproximadamente 133 aminoácidos, com massa molecular em torno de 15 KDa (kilo Dalton) (JU et al., 1987 ; ROSS, CANTRELL, 2018)

É produzida por várias células, tais como: Células T CD4<sup>+</sup>, T CD8<sup>+</sup>, células B, células dendríticas, células exterminadoras naturais (NK), mastócitos e também pode ser sintetizada por células teciduais (PALIARD et al., 1988; GRANUCCI; VIZZARDELLI; PAVELKA et al., 2001; HERSHKO; SUZUKI; CHARLES et al., 2011)

### **2.7.1 Atividade pleiotrópica da IL-2**

Primeiramente conhecida como fator de crescimento de células T, a IL-2 induz vários efeitos sobre as células do sistema imune: Nas células T CD4<sup>+</sup>, aumenta a proliferação e a diferenciação, regula os mecanismos apoptóticos, também aumenta a produção de citocinas; além disso, é importante para diferenciação das células T em células Th1, e Th2. Nas células T CD8<sup>+</sup> aumenta a atividade citolítica, a produção de citocinas e provoca a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> de memória. Nas células B, promove a proliferação e aumenta a produção de imunoglobulina. Nas células NK, aumenta a atividade citolítica e a produção de citocinas. E aumenta a proliferação e a homeostase das células T reguladores (Tregs) (SAKAGUCHI et al., 2008; GAFFEN; LIU, 2004; LIAO; LIN; LEONARD, 2013).

Segundo a literatura, a IL-2 apresenta um papel muito importante na imunidade antitumoral. Além disso, é utilizada como adjuvante em vários tipos de doenças e cânceres. Nos Estados Unidos e em muitos outros países, a IL-2 é aprovada para tratamento de carcinoma de células renais e melanoma avançado. E existe um interesse de usar a IL-2 como terapia adjuvante no tratamento de indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (OKAMOTO et al., 2003; CHOU et al., 2013; JENNIFER; CHARLES; TAMARA, 2017). Várias estratégias estão sendo utilizadas para desenvolver novas e mais formulações eficazes de IL-2 que podem ser utilizadas na imunoterapia contra o câncer (POOJA; NANCY, 2017).

### 2.7.2 Via de sinalização da IL-2

A IL-2 exerce as suas atividades pleiotrópicas através da ligação ao receptor expresso na superfície celular que consiste em três componentes: a cadeia alfa ( $\alpha$ ) (IL2R $\alpha$ , CD25), beta ( $\beta$ ) (IL2R $\beta$ , CD122) e gama ( $\gamma$ ) (IL2R $\gamma$ , CD132). Esse complexo tem um papel importante no controle do sistema imune. (WANG; RICKERT; GARCIA, 2005; DHUPKAR; GORDON, 2017).

O heterotrímero  $\alpha\beta\gamma$  possui afinidade alta; o dímero  $\beta\gamma$  possui afinidade intermediária e o monômero  $\alpha$  possui afinidade baixa e não está relacionada na transdução do sinal de IL-2, pois a sua região intracelular está muito curta para funcionar como transdutor de sinal. (DHUPKAR; GORDON, 2017)

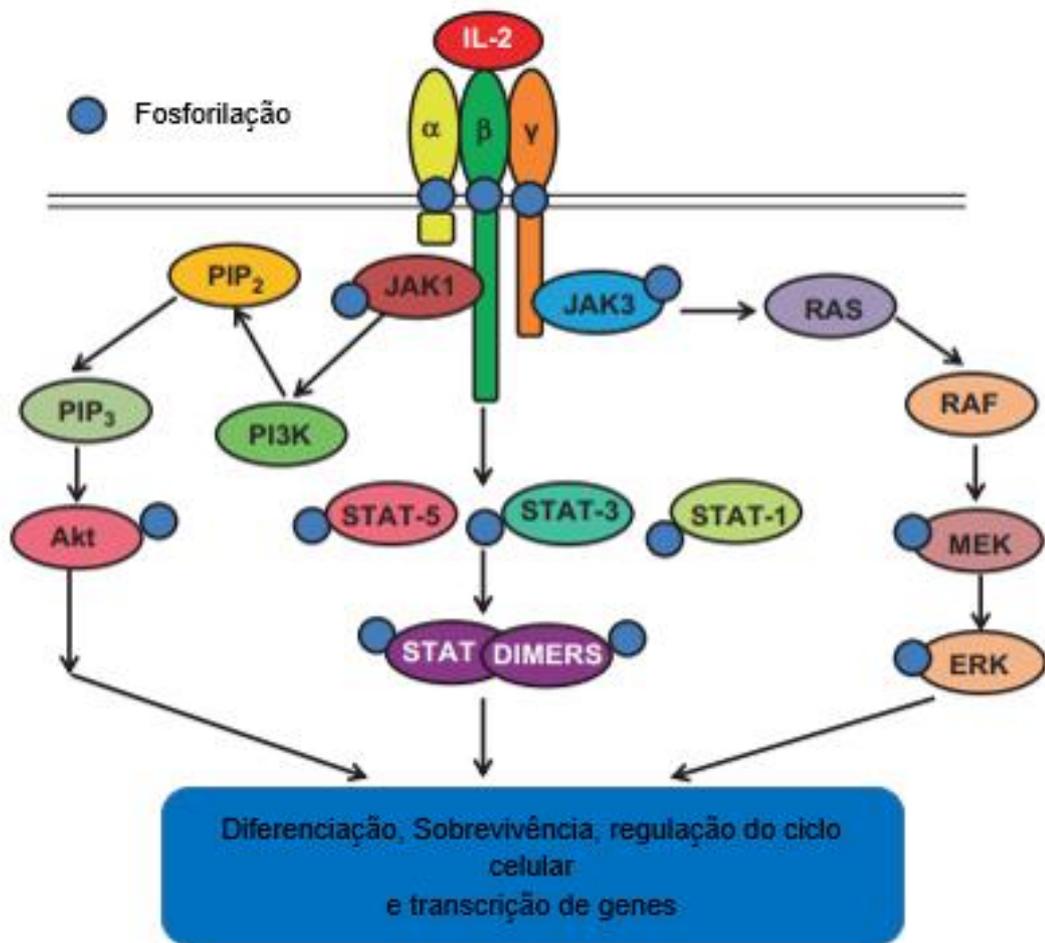
As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são expressas em células T CD8+ e células NK. As cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  são expressas em células T reguladores (T reg), células T ativadas e células B (WANG; RICKERT; GARCIA, 2005; STAUBER et al., 2006).

A cadeia  $\alpha$  é especificamente para IL-2, ou seja, participa somente da sinalização da IL-2. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  participam também da transmissão da sinalização da interleucina 15 (IL-15). A cadeia gama ( $\gamma$ ) é necessária também para transdução de sinal de várias citocinas, tais como: IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (OZAKI; LEONARD, 2002)

A transmissão de sinal ocorre primeiramente pela ligação de IL-2 ao IL-2R $\alpha$ . Esse último possui um domínio citoplasmático curto, por isso não participa da sinalização intracelular. O complexo binário IL-2R $\alpha$ -IL-2 provoca uma pequena alteração conformacional na IL-2, e consequentemente a associação de IL-2R $\alpha$ -IL-2 ao IL-2R $\beta$ . Em seguida acontece a fosforilação do IL-2R $\beta$  e o recrutamento de  $\gamma c$ . Após esse evento, acontece a fosforilação e consequentemente a ativação de janus quinase 1 e 3 (Jak 1 e 3), que estão associados a IL-2R $\beta$  e  $\gamma c$  respectivamente. Jak 1 e 3 ativados fosforilam três resíduos de tirosina. Em seguida ocorre o recrutamento e a ativação das proteínas da família de fatores de transcrição (STAT) 1, 3, 4 e

5. Depois da fosforilação e dimerização de STAT, são translocados para o núcleo onde modulam a expressão gênica, a diferenciação e a sobrevivência celular (RICKERT et al., 2005; SIM, 2014).

A proteína tirosina cinase Src também pode ligar ao receptor ativado, e conseqüentemente ativa as proteínas (Erk-1) e 2 (Erk-2) resultando na ativação do ciclo celular. Além disso, a ligação de IL-2 ao seu receptor ativa a proteína fosfatidilinositol-3 (PI3K) através da proteína Akt, promovendo a sobrevivência e o crescimento celular (**Figura 6**)



**Figura 6:** Representação esquemática das vias de sinalização da IL-2

Fonte: DUPKAR; GORDON, 2017

## 2.8 Subunidade Beta do receptor da IL-2

O receptor da IL-2 desempenha um papel muito importante na resposta imune, pois é responsável pela transdução de sinais da IL-2 e IL-15, que são consideradas como umas das citocinas mais potentes do sistema imune. Além disso, a IL-2/IL-2R tem uma função importante

na modulação da resposta imune, mediando os efeitos da IL-2 nas células T, células B e células NK. (DHUPKAR; GORDON, 2017)

Como já foi mencionado, o receptor da IL-2 é formado por várias subunidades, tais como: IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) e IL-2R $\gamma$  (CD132) (MALEK, 2008; DHUPKAR; GORDON, 2017). Entre essas subunidades se destaca a IL-2R $\beta$ .

IL-2R $\beta$  (CD122) desempenha um papel indispensável na transmissão do sinal de IL-2, pois a sua região intracelular é longa e possui muitos locais de ligação para a fosforilação de proteínas (MALEK, 2008). É a principal subunidade responsável pela proliferação celular provocada pela IL-2, pelo desenvolvimento das células efectoras T CD4+ e T CD8 + e pelo desenvolvimento das células T reguladoras (Treg) (BAYER; YU; ADEEGBE et al., 2005; SETOGUCHI; HORI; TAKAHASHI et al., 2005)

Além disso, tem um papel importante em vias importantes nas doenças autoimunes, tais como: asma e artrite juvenil (MOFFATT et al., 2010). Em camundongos, a deficiência da IL-2R $\beta$  está relacionada a susceptibilidade a infecções, a não ativação das células T, a diminuição da atividade citolítica das células TCD8 +; a doenças autoimunes e a diminuição no desenvolvimento das células T reguladores. (SUZUKI et al. 1995; MALEK, 2008).

## 2.9 Polimorfismos Genéticos

Variações genéticas desempenham um papel muito importante no desenvolvimento de uma doença infecciosa. As alterações genéticas são do tipo polimorfismo quando a frequência do alelo comum é igual ou superior a 1 %, sendo diferentes das mutações. O projeto de genoma humano permitiu de identificar vários tipos de polimorfismo, tais como: deleção/ inserção, repetição em tandem de números variáveis (VNTR), substituições. (WRIGHT, 2005.)

Os mais comuns de polimorfismo são as alterações denominadas de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Consistem apenas em uma substituição de um nucleotídeo por outro e são responsáveis por aproximadamente 90 % da variabilidade entre os indivíduos. Estima-se que a cada 1000 pares de base (bp), ocorra um SNP. (BROOKES, 1999; SACHIDANANDAM et al., 2001)

O SNP pode acarretar em efeitos biológicos ou não dependendo da localização da alteração ao longo do genoma humano. Se a alteração for dentro de regiões gênicas que serão codificadas e expressas (éxons), isso pode implicar na perda da estrutura proteica e consequentemente na redução ou na perda da atividade da proteína codificada por esse gene (NUSSBAUM et al., 2002). Quando ocorrer na região promotora do gene ou em regiões não

codificantes (íntrons), pode resultar na redução ou no aumento da expressão da proteína (CALIBASI; BASBINAR, 2017).

Além disso, há relatos que os SNPs em genes de citocinas e receptores de citocinas podem ser responsáveis pela suscetibilidade de um indivíduo a doenças (SHASTRY, 2002; KENN, 2002). Muitos estudos sugeriram que os SNP em genes que codificam as citocinas afetam o resultado clínico, a gravidade das doenças e podem influenciar a resposta às drogas (LOHRER; TANGEN, 2000; OLLIER, 2004; TAN et al., 2015).

Na Hepatite C, vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados em genes que codificam as citocinas têm sido associados aos mecanismos de defesa do organismo, a depuração natural do HCV, a resposta à terapia antiviral (HORNER; GALE, 2013) e a susceptibilidade a Hepatite C (OLEKSYK et al., 2005; REHERMANN, 2000).

### **2.9. 1 Polimorfismos de IL-2**

O gene que codifica a IL-2 em humanos, está localizado no braço longo do cromossomo 4, região 4q26-q27, consiste em cinco exons e cinco íntrons. Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) têm sido descritos nesse gene, tais como: -475A/T, -384T/G, -330T/G, - 2811 G/A, +114G/T (JOHN et al., 1998; MATEZANZ et al., 2000). Os polimorfismos em destaque são -330T/G (rs2069762) e -2425G/A (rs 4833248).

Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) da IL-2 (rs2069762) e IL-2 (rs4833248) estão localizados na região promotora. Além disso, o SNP IL-2 (rs2069762) se encontra também próximo do fator nuclear de células T ativadas (NFAT) que tem um papel importante nos padrões de transcrição e tradução da IL-2 (CRABTREE; CLIPSTONE, 1994; HOFFMANN et al., 2001).

Os polimorfismos da IL-2 podem afetar a produção de IL-2, assim os indivíduos homocigotos mutados G/G são conhecidos por apresentarem um aumento de 3 vezes na produção de IL-2, em comparação aos indivíduos homocigotos selvagens T/T (HOFFMANN et al., 2001).

A desregulação na produção da IL-2 aumenta o risco de várias doenças, assim os SNPs da IL-2 estão implicados no aumento da suscetibilidade a vários tipos de doenças, incluídos doenças autoimunes, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer gástrico, carcinoma nasofaringe etc. (WU et al., 2009; WEI et al., 2010; HU; OUYANG; TANG, 2012, SHEN et al., 2012).

### 2.9.2 Polimorfismos de IL-2R $\beta$

O gene que codifica a IL-2R $\beta$  em humanos apresenta 49.217 pares de base (bp) e está localizado no braço longo do cromossomo 22, região 22q13. Codifica uma proteína de aproximadamente 515 aminoácidos e massa molecular 70-75 kD. (OSINALDE et al., 2017). Apresenta vários polimorfismos. O polimorfismo em destaque é o +10558G/A (rs 1003694), e está localizado no terceiro íntron.

Os íntrons eram considerados como (DNA lixo), pois são removidos durante o processamento do pré-mRNA. Atualmente são conhecidos por apresentar várias funções, tais como na evolução, na ligação de proteínas reguladoras e também contêm sequências específicas de splicing (ROGOZIN et al., 2003; KELLY et al 2015). Além disso, durante a transcrição, existe uma cooperação entre os promotores e as sequências reguladoras localizadas dentro dos íntrons. Essa cooperação é fundamental para a transcrição gênica (STADHOUDERS et al., 2012).

Os SNPs da IL-2R $\beta$  que afetam a transcrição de IL-2R $\beta$  podem afetar as respostas imunológicas e inflamatórias via IL-2/IL-2R. Assim os polimorfismos da IL-2R $\beta$  estão associados ao desenvolvimento de várias doenças autoimunes e inflamatórias, como diabetes tipo 1 (T1D) (FERJANI et al., 2016), esclerose múltipla (CAVANILLAS et al., 2010), doença inflamatória intestinal (BOUZID et al., 2013).

Na literatura não existem dados da associação do SNP + 10558G/A com Hepatite C, mas acreditamos que as variantes do gene do *IL-2R $\beta$*  poderá alterar o risco da doença por meio de seus efeitos pleiotrópicos em várias respostas dependentes da IL-2.

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar os polimorfismos em genes de IL-2 e IL-2R $\beta$  e o nível sérico das citocinas Th1, Th2 e Th17 em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C, atendidos na Fundação da medicina Tropical Doutor-Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a frequência dos polimorfismos genéticos de base única (SNP) (-330 T/G e -2425 G/A) em gene de IL-2 e (+10558G/A) em gene de IL-2R $\beta$  no grupo de pacientes e no grupo controle;
- Verificar a associação dos SNPs estudados com a progressão da doença hepática em pacientes com HCV;
- Avaliar o nível sérico das citocinas Th1, Th2 e Th17 em pacientes e em controles;
- Avaliar a influência dos polimorfismos (-330 T/G e -2425 G/A) em gene de IL-2 sobre o perfil das citocinas em pacientes e em controles;
- Verificar a relação do perfil de citocinas séricas com a fibrose hepática em pacientes com hepatite C.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo descritivo, transversal, realizado em pacientes com hepatite C (HCV+), atendidos no ambulatório de Hepatopatia da Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV) e doadores de sangue que se apresentaram na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

### **4.2 População de estudo**

Foram analisadas 149 amostras de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, que procuraram atendimento na FMT-HVD, localizada na cidade de Manaus, Estado do Amazonas, no período do 2016 e 2017 e 100 amostras de candidatos a doação de sangue que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM), no período de 2016 e 2017.

### **4.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos neste estudo pacientes adultos com idade entre 18 a 65 anos, com diagnóstico de infecção pelo HCV por teste sorológico e confirmado por RT-PCR.

Foram excluídos pacientes que apresentaram co-infecção com os vírus da hepatite B (anti-HBc), vírus da imunodeficiência adquirida-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 relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios psiquiátricos, pacientes renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica.

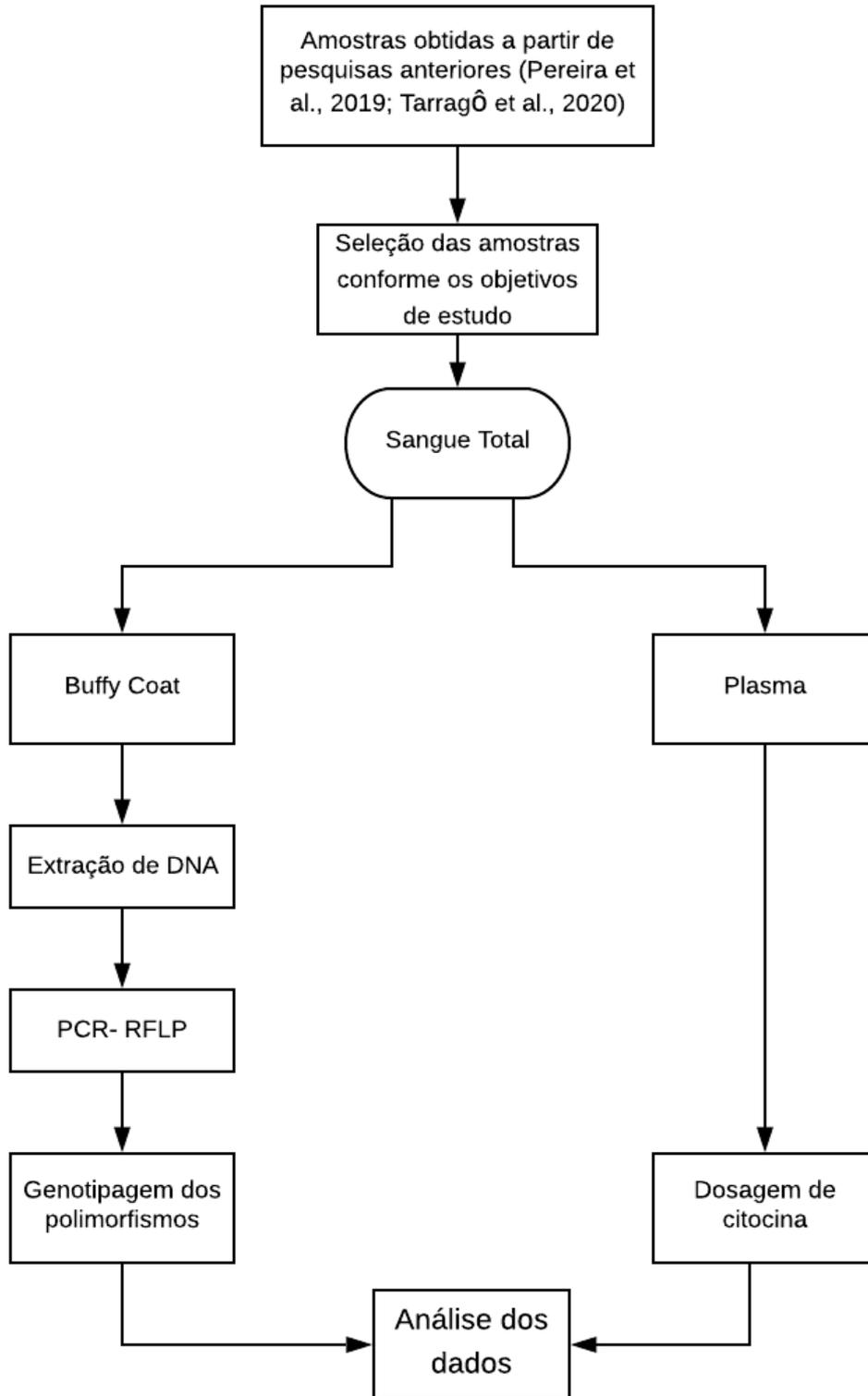
Para o grupo controle, foram selecionados doadores de sangue, com idade entre 18 a 65 anos, residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-I e II), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL), confirmado por teste ácido nucleico (NAT).

#### **4.4 Aspectos Éticos**

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de projetos aprovados nos CEPs da FMT-AM (CAAE 1.405.965/2015) e da Fundação HEMOAM – (CAAE 00240112000-10/2010).

#### **4.5 Coleta dos dados e do material biológico**

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas através de punção venosa. Foi coletado um volume total de 10 mL de sangue periférico dos pacientes HCV+ e dos indivíduos controles. O sangue coletado foi distribuído em dois tubos: um tubo contendo anticoagulante EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*) para procedimentos referentes à determinação dos polimorfismos e um tubo com gel separador (*Gel BD SST® II Advance®*) para procedimentos referentes a dosagem de citocinas. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório genômica da Fundação de HEMOAM onde foram realizadas a extração de DNA, as reações em cadeia da polímeras (PCR) e as reações de restrição, e ao Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hematologia e Hemoterapia do Amazonas para dosagem de citocinas (**Figura 7**).



**Figura 7:** Fluxograma demonstrativo das etapas desenvolvidas.

#### 4.6 Quantificação de citocina

A quantificação das citocinas das amostras de plasma dos pacientes e controle foi realizada por Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array) no Laboratório Multidisciplinar do HEMOAM, com o Kit *BDTM Human TH1/TH2/TH17 Cytokine* (Cat. N° 560484, Lot: 29132, marca *BD® Biosciences, San Diego, CA, USA*), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. Foram quantificadas interleucina 2 (IL-2), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interferon gama (IFN-  $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 17A (IL-17A).

Por limitações técnicas foram quantificadas somente 34 amostras de pacientes e 34 amostras de controle.

O Kit *BDTM CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada bead de captura está conjugada a um anticorpo específico para cada citocina.

A detecção das citocinas presentes na amostra foi realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) conjugado a anticorpos que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção foram quantificados através da citometria de fluxo. Para a aquisição das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACS Canto II (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) do HEMOAM.

#### 4.8 Extração de DNA

A extração do DNA das amostras foi feita a partir de 200 $\mu$ 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 CHOMOZYNSKI & SANCHI (2006). As amostras foram inicialmente lisadas em solução de Trizol à 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. Em seguida, 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  $\mu$ L de etanol 100% a 4°C, seguido de centrifugação por 15 minutos a 10.000 RPM em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante. A etapa de precipitação foi repetida, adicionando 500  $\mu$ L de etanol 100% seguida

de centrifugação por 12 minutos a 10.000 RPM 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.

#### 4.8 Genotipagem dos polimorfismos

A genotipagem dos polimorfismos de IL-2 e IL-2Rβ foi realizada por reações em cadeia da polimerase (PCR), seguida de reação de restrição com endonucleases (RFLP). Os primers utilizados encontram-se descritos no quadro abaixo (**Tabela 01**).

**Tabela 1:** Sequências dos primers e a ciclagem que foram utilizadas nas reações em cadeia da polimerase

Polimorfismo		Primes	Ciclagem
<i>IL-2</i>	rs 2069762	Senso 5'-CAGGAAACCAATACACTTCCTGTT-3'	95°C por 5 min, 40 x (95°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 30s) 72°C por 7 min
		Anti-Senso 5'-GTAAGTCAGAAAATTTTCTTGGTC-3'	
<i>IL-2</i>	rs 4833248	Senso 5'-GGCCTCTGGGTTTTCAAGATTCAG-3'	95°C por 5 min, 40 x (95°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 30s) 72°C por 7 min
		Anti-Senso 5'-TGGTGTTCATTATGGAGGGCC-3'	
<i>IL-2Rβ</i>	rs1003694	Senso 5'-GCTTGGATTTTGAGAGACCCT-3'	95°C por 5 min, 40 x (95°C por 30 s, 66.9°C for 30 s, 72°C por 30s) 72°C por 7 min
		Anti-Senso 5'-CCACCTCTCTGTGGTCTTCCTCT-3'	

**Tabela 2:** Descrição das enzimas de restrição e do tamanho dos fragmentos que foram obtidos a partir da reação de restrição.

Polimorfismo		Enzima de Restrição	Alelo (pb)
<i>IL-2</i>	rs 2069762	<i>Ava II</i>	T=141 G=117+24
<i>IL-2</i>	rs 4833248	<i>DdeI</i>	G=189 A=136+53
<i>IL-2Rβ</i>	rs1003694	<i>Rsa I</i>	G=184 A=121+63

#### 4.8.1 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs2069762

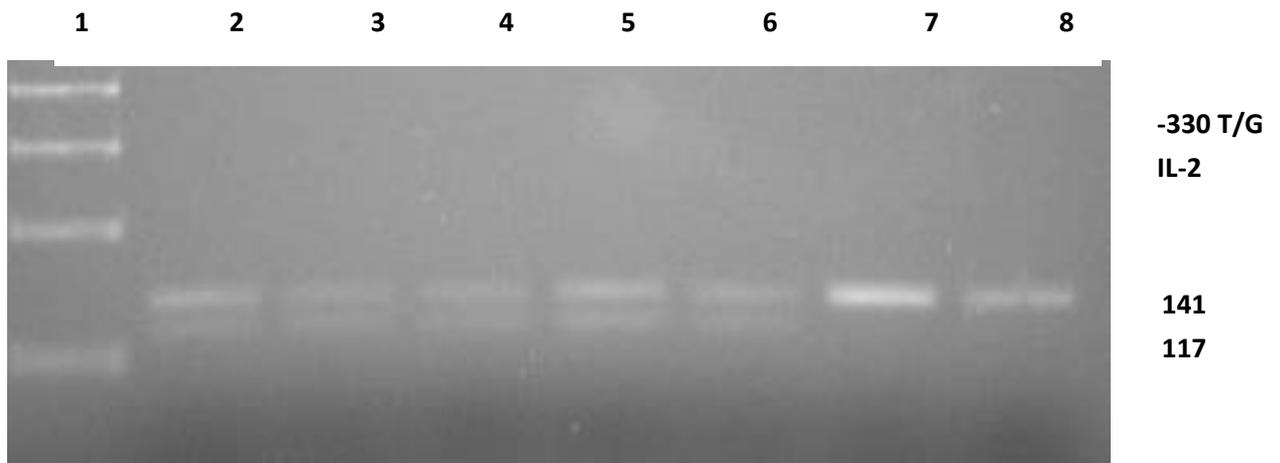
##### Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O sítio polimórfico T/G na posição -330 da região promotora do gene da *IL-2* (141 pares de bases) foi amplificado com os iniciadores 5`-CAGGAAACCAATACACTTCCTGTT-3` e 5`-GTA ACTCAGAAAATTTTCTTGGTC-3` (DE ARAÚJO et al., 2019) (**Tabela 1**). Foi preparado um mix para o PCR, com volume total de 25 µL, contendo: 4,0 µL (100 ng) de DNA genômico; 0,25 µL (0,1 µMol/L) de cada primer; 2,5 µL (200 µMol/L) de dNTPs (*CENT BIO®*); 0,75 µL (1,5 mMol/L) de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de tampão 10X de PCR (500 mM KCl e 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 0,2 µL (1U) de Taq DNA polimerase (*CENT BIO®*) e 14,55 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador (*Veriti® 96 Thermal Cycler, Carlsbad, USA*).

##### Reação de Restrição (RFLP)

O polimorfismo no gene da *IL-2* -330 T/G foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição *Ava II* (*BioLabs®, New England, Ipswich, MA, USA*) a 37°C por 4 horas, em um mix de reação de clivagem, com um volume final de 15 µL, contendo: 10,0 µL do produto de PCR; 1,0 µL de tampão de reação; 3,75 µL de água ultrapura, e 5U de enzima de restrição específica (**Tabela 2**)

Os produtos da PCR e reação de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2 e 3 % respectivamente, em tampão TBE 1x (*Tris- borato- EDTA*) e visualizados por fluorescência UV no transluminador de luz azul da *Invitrogen Corporation (Safer Imager™ S3702, Carlsbad, CA, USA)* após coloração com *brometo de etídio*. O marcador de peso molecular de 50 ou 100pb foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos. Foram definidos como genótipo TT os que apresentaram o fragmento de 141 pb, TG com fragmentos 141, 117 e 24 pb e GG com os fragmentos 117 e 24 pb (**Figura 8**)



**Figura 8:** Análise do polimorfismo -330 T/G da IL-2 em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).

Eletroforese em Gel de Agarose a 3 % corados com *brometo de etídio* do gene de *IL-2* (rs4833248) (189pb). Slot 1: peso molecular de 100pb; Slots 2-6: Heterozigoto (T/G); Slots 7,8: Homozigoto Selvagem (T/T).

#### **4.8.2 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs24833248**

##### **Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

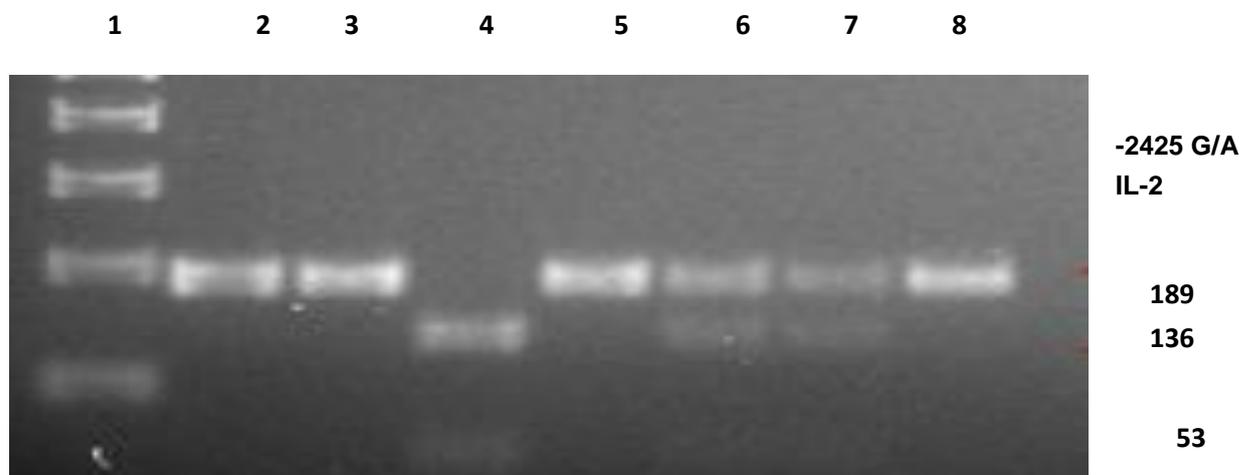
O sítio polimórfico G/A na posição -2425 da região promotora do gene da *IL-2* (189 pares de bases) foi amplificado com os iniciadores 5`- GGCCTCTTGGGTTTTCAAGATTCAG-3` e 5`-TGGTGTTCATTATGGAGGGCC-3` (DE ARAÚJO et al., 2019) (**Tabela 1**). Foi preparado um mix para o PCR, com volume total de 25 µL, contendo: 4,0 µL (100 ng) de DNA genômico; 0,25 µL (0,1 µMol/L) de cada primer; 2,5 µL (200 µMol/L) de dNTPs (*CENT BIO®*); 0,75 µL (1,5 mMol/L) de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de tampão 10X de PCR (500 mM KCl e 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 0,2 µL (1U) de Taq DNA polimerase (*CENT BIO®*) e 14,55 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador (*Veriti® 96 Thermal Cycler, Carlsbad, USA*).

##### **Reação de Restrição (RFLP)**

O polimorfismo -2425 G/A da *IL-2* foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição Dde I (*BioLabs® , New England, Ipswich, MA, USA*) a 37°C por 4 horas, em um mix de reação de clivagem, com um volume final de 15 µL, contendo: 10,0 µL do

produto de PCR; 1,0 µL de tampão de reação; 3,75 µL de água ultrapura, e 5U de enzima de restrição específica. (**Tabela 2**)

Os produtos da PCR e reação de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2 e 3 % respectivamente, em tampão TBE 1x (*Tris- borato- EDTA*) e visualizados por fluorescência UV no transluminador de luz azul da *Invitrogen Corporation (Safer Imager™ S3702, Carlsbad, CA, USA)* após coloração com brometo de etídio. O marcador de peso molecular de 50 ou 100pb foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos. Foram definidos como genótipo GG os que apresentaram o fragmento de 189 pb, GA com fragmentos 189, 136 e 53 pb e AA com os fragmentos 136 e 53 pb (**Figura 9**)



**Figura 9:** Análise do polimorfismo -2425 G/A da IL-2 em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).

Eletroforese em Gel de Agarose a 3 % corados com brometo de etídio do gene de IL-2 (rs4833248) (189pb). Slot 1: peso molecular de 100pb; Slots 2,3,5,8: Homozigoto selvagem (G/G); Slots 4: Homozigoto mutante (A/A); Slots 6,7: Heterozigoto (G/A).

#### **4.8.3 Ensaio para identificação do polimorfismo do gene da citocina IL-2 rs1003694**

##### **Reação em cadeia da Polimerase (PCR)**

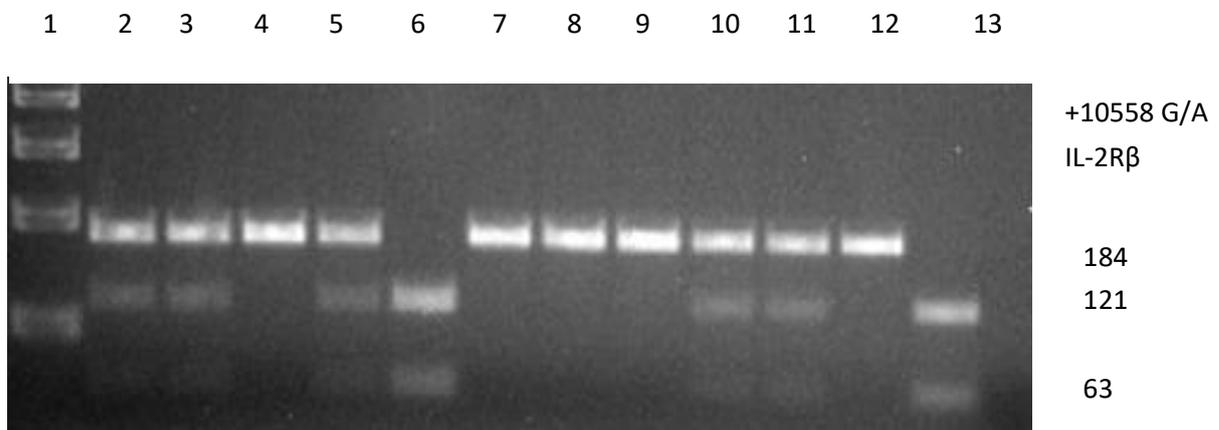
O sítio polimórfico G/A na posição +10558 localizado no terceiro intron do gene da *IL-2Rβ* (141 pares de bases) foi amplificado com os iniciadores 5`-GCTTGGATTTTGAGAGACCCT-3` e 5`-CCACCTCTCTGTGGTCTTCCTCTT-3` (DE ARAÚJO et al., 2019) (**Tabela 01**). Foi preparado um mix para o PCR, com volume total de 25 µL, contendo: 4,0 µL (100 ng) de DNA genômico; 0,25 µL (0,1 µMol/L) de cada primer; 2,5 µL (200 µMol/L) de dNTPs (*CENT BIO®*); 0,75 µL (1.5 mMol/L) de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de

tampão 10X de PCR (500 mM KCl e 200 mM Tris-HCl, pH 8,4), 0,2 µL (1U) de Taq DNA polimerase (CENT BIO®) e 14,55 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada em termociclador (*Veriti® 96 Thermal Cycler, Carlsbad, USA*).

### Reação de Restrição (RFLP)

O polimorfismo +10558 G/A da IL-2Rβ foi detectado após a digestão do produto de PCR com a enzima de restrição Rsa I (*BioLabs®, New England, Ipswich, MA, USA*) a 37°C por 4 horas, em um mix de reação de clivagem, com um volume final de 15 µL, contendo: 10,0 µL do produto de PCR; 1,0 µL de tampão de reação; 3,75 µL de água ultrapura, e 5U de enzima de restrição específica. (**Tabela 2**).

Os produtos da PCR e reação de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2 e 3 % respectivamente, em tampão TBE 1x (*Tris- borato- EDTA*) e visualizados por fluorescência UV no transluminador de luz azul da *Invitrogen Corporation (Safer Imager™ S3702, Carlsbad, CA, USA)* após coloração com *brometo de etídio*. O marcador de peso molecular de 50 ou 100pb foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA. Foram definidos como genótipo GG os que apresentaram o fragmento de 184 pb, GA com fragmentos 184, 121 e 63 pb e AA com os fragmentos 121 e 63 pb (**Figura 10**).



**Figura 10:** Análise do polimorfismo +10558 G/A do IL-2Rβ em pacientes com hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical-Doutor Heitor Vieira Dourado, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR-RFLP).

Eletroforese em Gel de Agarose a 3 % corados com brometo de etídio do gene de IL-2Rβ (rs1003694) (184pb). Slot 1: peso molecular de 100pb; Slots 2,3,5,10,11: Heterozigoto (G/A); Slots 4,7,8,9,12: Homozigoto selvagem (G/G); Slots 6,13: Homozigoto mutante (A/A).

#### 4.9 Análises Estatística

Os resultados foram tabulados e armazenados por meio do Software Microsoft Excel® (versão 2010 para windows). Os dados foram apresentados por meio de tabelas de frequência e gráficos.

Os testes Exato de Fisher e QuiQuadrado ( $\chi^2$ ) foram utilizados para comparação das frequências genótípicas e alélicas dos genes estudados nos pacientes HCV+ e no grupo controle. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi determinado comparando as frequências genótípicas observadas e esperadas. Testes para o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado usando o site <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. A comparação do nível das citocinas entre os grupos foi feita utilizando o software *GraphPad Prism 5.0* (San Diego, CA, EUA) através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney e Kruskal Wallis. Nos testes estatísticos foi considerado o valor de  $p < 0,05$  significativo e intervalo de confiança 95%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização da população.

Neste estudo foram incluídos 149 indivíduos infectados pelo vírus da Hepatite C atendidos na FMT-HVD e 100 candidatos a doação de sangue da FHEMOAM. Do total de indivíduos incluídos na pesquisa, o sexo masculino predominou sobre o sexo feminino, sendo no grupo de pacientes e no grupo controle, a porcentagem do sexo masculino foi de 55% e 67% respectivamente, em comparação ao sexo feminino, 45% no grupo dos pacientes e 33% no grupo controle.

Dados semelhantes foram obtidos por TORRES et al., (2009) em um estudo realizado em candidatos a doação de sangue na cidade de Manaus e ARAÚJO et al., (2011) descreveram ainda uma maior prevalência da infecção pelo HCV em indivíduos do sexo masculino. Essa diferença pode ser explicada pelas atividades ocupacionais exercidas pelos homens, sendo mais expostos aos fatores de risco.

Em relação à idade da população estudada, observou-se que a média de idade dos pacientes HCV+ foi 58 anos e a do grupo de doadores de sangue foi 32 anos ( $p < 0,0001$ ). A média de idade para o sexo feminino foi 59 anos no grupo de pacientes HCV+ e 33 anos no grupo de doadores de sangue e a média de idade para o sexo masculino no grupo de pacientes HCV+ e no grupo controle foi 57 anos e 31 anos, respectivamente. A faixa etária com maior prevalência foi entre 40 e 60 anos.

Foi observada diferença estatística significativa, em relação à média de idade, entre os grupos de pacientes e doadores de sangue, mas não houve diferença entre ambos os sexos. Na **tabela 03**, estão resumidas as características demográficas da população de estudo.

**Tabela 3:** Caracterização da população do estudo

	<b>Sexo</b>	<b>Média de idade</b>	<b>P value</b>
<b>Pacientes HCV+</b>	<b>Feminino</b>	59.1 ± 11.14	0,0001
	67 (45%)		
	<b>Masculino</b>	56.73 ± 10.56	
	82 (55%)		
<b>Grupo Controle</b>	<b>Feminino</b>	33.09 ± 8.96	
	33 (33%)		
	<b>Masculino</b>	30.83 ± 11.35	
	67 (67%)		

A faixa etária observada no grupo de pacientes também foi observada por SOUZA-CRUZ et al., (2016) em um estudo na população do Amazonas. Entendemos que as pessoas procuram os serviços da saúde principalmente na faixa etária entre 45 e 65 anos já que o desenvolvimento da doença pode levar 15 a 20 anos para ocorrer.

## 5.2 Frequências alélicas e genotípicas

Neste estudo, foram estudados três SNPs: dois do gene da *IL-2*: (*IL2rs4833248* e *IL2rs2069762*) e um SNP do gene de *IL-2R $\beta$*  (*IL-2R $\beta$ rs1003694*). Os SNPs da *IL-2* estão localizados na região promotora e o SNP da *IL-2R $\beta$*  está localizado no terceiro íntron. A distribuição das frequências dos genótipos e dos alelos está apresentada na **Tabela 4**.

**Tabela 4:** Frequência dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos em indivíduos controles e pacientes com hepatite C

SNP	Genótipos e Alelos	Controles (N= 100) n = 100	Pacientes (N= 149) n = 149	Comparação	p value	OR IC95%
<b><i>IL2 rs2069762</i></b>	T/T	52 (52%)	61 (41%)	G/G vs A/A	0.13	2.1 (0.7 - 5.8)
	T/G	42 (42%)	73 (49%)	G/G vs G/A	0.14	1.4 (0.8 - 2.5)
	G/G	6 (6%)	15 (10%)	G/G vs G/A+A/A	0.08	1.5 (0.9 - 2.6)
	T	146 (73%)	195 (65%)	G vs A	0.07	1.4 (0.9 - 2.1)
	G	54 (27%)	103 (35%)			
<b><i>IL2 rs4833248</i></b>	G/G	50 (50%)	61 (41%)	G/G vs A/A	0.21	1.9 (0.6 - 5.3)
	G/A	44 (44%)	74 (50%)	G/G vs G/A	0.23	1.3 (0.8 - 2.3)
	A/A	6 (6%)	14 (9%)	G/G vs G/A+A/A	0.15	1.4 (0.8 - 2.4)
	G	144 (72%)	196 (66%)	G vs A	0.14	1.3 (0.9 - 1.9)
	A	56 (28%)	102 (34%)			
<b><i>IL-2R<math>\beta</math> rs1003694</i></b>	G/G	51 (51%)	59 (40%)	G/G vs A/A	0.20	1.7 (0.7 - 4.0)
	G/A	39 (39%)	70 (47%)	G/G vs G/A	0.11	1.5 (0.9 - 2.6)
	A/A	10 (10%)	20 (13%)	G/G vs G/A+A/A	0.07	1.5 (0.9 - 2.6)
	G	141(71)	188 (63%)	G vs A	0.08	1.3 (0.9 - 2.0)
	A	59 (29%)	110 (37%)			

Para o SNP -330 T/G da *IL-2*, o genótipo TT apresentou frequência 52% no grupo controle e no grupo pacientes HCV+ teve como frequência 41%. Já, o genótipo GA teve frequência no grupo de pacientes 49% e sua frequência no grupo controle foi 42%. E a frequência do genótipo GG foi 6% e 10% nos grupos, controle e pacientes HCV+, respectivamente. O valor do p = 0,064. Vale ressaltar que os genótipos do polimorfismo *IL-2 rs2060762* estudado, estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos estudados.

A frequência do alelo T no grupo controle e no grupo pacientes HCV+ foi 73% e 65% respectivamente e o alelo menor (MAF) G apresentou frequência 27% no grupo controle e 35% no grupo pacientes HCV+. O valor de  $p=0,07$ .

A frequência do alelo menor G (MAF) encontrada na população do estudo assemelha-se à frequência observada na população do Porto rico G (0,28), na população chinesa G (0,29), na população do Japão G (0,26), na população de Utah com ascendência do norte e do oeste da Europa G (0,26), na população Espanhola (Iberiano) G (0,25). No entanto foi diferente quando comparada à população Africana G (0,03), à população da Nigéria G (0,02), à população da Gambia G (0,02). Disponibilizados no NCBI (Hap Map ou 1000 genomes). (HUGO, 2019)

Os polimorfismos da IL-2 vêm sendo bastante estudados. Dentre eles, o mais estudado é o -330 T/G, pois é associado a suscetibilidade a várias doenças e cânceres, tais como: carcinoma hepatocelular, artrite reumatoide, câncer de mama, câncer de bexiga (SHEN et al., 2012; HU et al., 2013; SAXENA et al., 2014). Portanto, os estudos de polimorfismo de IL-2 -330 T/G em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C são escassos.

Analisando a frequência genotípica entre o grupo de pacientes HCV+ e o grupo controle, observou-se uma maior frequência dos genótipos TG, GG na população de pacientes quando comparada a população controle. Mas essa diferença não foi significativa.

Nossos dados divergem de GAO et al., (2010), que observaram uma maior frequência do genótipo GG no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes e uma maior frequência do genótipo TT no grupo de pacientes. Mas, nossos dados assemelham com um estudo feito por EMELYANOVA; VITKOVSKY, (2013) em uma população da Zabaikalski na Rússia, onde observaram uma maior prevalência do genótipo GG no grupo de pacientes comparado ao grupo controle e uma frequência maior do genótipo TT no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes. Portanto as diferenças entre as frequências genotípicas foram significativas, e de acordo com esse estudo o genótipo GG está relacionado a um maior risco da doença.

Diante do resultado obtido nesse estudo, não foi observada associação do SNP -330T/G com o desenvolvimento da hepatite C, ( $p=0,064$ ), provavelmente devido ao pequeno número amostral. Mas há indícios do que os genótipos G/G e T/G apresentam um importante papel na suscetibilidade a hepatite C, aumentando o risco da doença ( $r=1,5$ ). Portanto estudos com maior número amostral é necessário.

Com relação ao SNP -2425 G/A da IL-2, a frequência do genótipo GG no grupo controle e no grupo de pacientes HCV+ foi 50% e 41% respectivamente. O genótipo GA teve como frequência 44% no grupo controle e 50% no grupo dos pacientes HCV+. E o genótipo AA

apresentou frequência 6% no grupo controle e 9% no grupo dos pacientes. Vale ressaltar que os genótipos de polimorfismo IL-2rs4833248 estudado, estavam distribuídos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos estudados.

A frequência do alelo G foi 72% no grupo controle e 66% no grupo dos pacientes HCV+ e a frequência do alelo menor (MAF) A no grupo controle e no grupo dos pacientes HCV+ foi 28% e 34% respectivamente. O valor de  $p=0,16$ .

A frequência do alelo menor (MAF) A (0,28) observada nessa população é semelhante à população do Porto-Rico A (0,28), à população de Utah com ascendência do norte e oeste da Europa A (0,26), à população chinesa (Pequim) A (0,29), à população Japonesa A (0,27). Mas foi diferente em comparação à população Africana A (0,03), à população da Kenya A (0,04), à população da Gambia (0,02), à população da Nigéria (0,02). Disponibilizados no NCBI (Hap Map ou 1000 genomes) (HUGO, 2019)

Analisando a distribuição genotípica entre o grupo de pacientes HCV+ e o grupo controle, houve uma diferença na distribuição dos genótipos GA, AA, estando esses genótipos em maior frequência na população de pacientes em comparação a população controle. Mas essa diferença não foi significativa ( $p=0,12$ ).

De acordo com resultado obtido nesse estudo, não foi encontrada associação de polimorfismo -2425 G/A com o desenvolvimento da Hepatite C. Dados similares a esse estudo, foram descritos em um estudo realizado por XU et al., (2015) em uma população na província de Guizhou na China em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C, onde, não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados. Inversamente, o polimorfismo IL-2 rs2069762 que é muito estudado, o polimorfismo IL-2 rs4833248 é pouco estudado no mundo. Isso impossibilita a comparação com outros estudos.

Quanto ao SNP +10558 G/A do IL-2R $\beta$ , a frequência do genótipo GG foi 51% no grupo controle e 40% no grupo pacientes HCV+. Já, a frequência do genótipo GA no grupo controle e no grupo pacientes HCV+ foi 39% e 47% respectivamente. E a frequência do genótipo AA no grupo controle foi 10% e no grupo pacientes HCV+ 13%. Vale ressaltar que as distribuições genotípicas no grupo de pacientes e no grupo de controle se apresentaram em equilíbrio de Hardy Weinberg.

O alelo G foi teve como frequências no grupo controle 71% e no grupo pacientes HCV+ 63%. E a frequência do alelo menor (MAF) A no grupo controle foi 29 % e 37% no grupo pacientes HCV+. O valor de  $p=0,10$ .

A frequência do alelo menor (MAF) A observado na população de estudo é semelhante à frequência observada na população da Finlândia A (0,29), na população da Ásia do Sul A (0,29), na população da Sri Lanka A (0,29). Assemelha-se com a frequência da população da Bangladesh A (0,27). No entanto foi diferente quando comparada à população africana A (0,40), à população da Nigéria (Esan) (0,42). Disponibilizados no NCBI (Hap Map ou 1000 genomes) (HUGO, 2019).

Os estudos dos polimorfismos de IL-2R $\beta$  são escassos. Para a hepatite C, não existem dados na literatura que avaliem a associação entre o polimorfismo na posição +10558 do gene da IL-2R $\beta$  a essa doença, sendo esse é o primeiro estudo.

Ao analisar a distribuição genotípica do polimorfismo entre grupo de pacientes HCV+ e grupo de controle, observou-se, no presente estudo que a frequência dos genótipos GA e AA foi maior do grupo de pacientes comparado ao grupo controle. Mas a diferença não foi significativa, pois o valor do  $p=0,09$ .

Diante do resultado obtido nesse estudo, não foi observada associação desse polimorfismo com a Hepatite C. Mas há indícios que esse polimorfismo poderia aumentar o risco da doença ( $r=1,4$ ). Estudos com maior poder amostral é necessário para tal confirmação.

### **5.3 Associação dos Polimorfismos estudados com o grau de fibrose.**

Com o objetivo de identificar o papel desses polimorfismos nas formas mais graves da doença, foram analisadas a frequência dos genótipos e dos alelos no grupo de pacientes, classificando os grupos de acordo com a escala de METAVIR (*Meta-analysis of Histological Data in viral Hepatitis*), que consiste em F0, F1, F2, F3. O grupo de pacientes foi classificado em  $\leq F2$  e  $> F2$  (**Figura 5**).

**Tabela 5:** Frequência dos genótipos e dos alelos dos polimorfismos em pacientes com hepatite C, conforme o grau de fibrose

SNP	Genótipos e Alelos	≤ F2 (N= 83)	> F2 (N= 66)	Comparação	p value	OR IC95%
<b>IL2 rs2069762</b>	T/T	36 (43%)	25 (38%)	G/G vs A/A	0.38	1.6 (0.5 - 5.1)
	T/G	40 (48%)	33 (50%)	G/G vs G/A	0.62	1.1 (0.5 - 2.3)
	G/G	7 (9%)	8 (12%)	G/G vs G/A+A/A	0.49	1.2 (0.6 - 2.4)
	T	112 (67%)	83 (63%)	G vs A	0.40	1.2 (0.7 - 1.9)
	G	54 (33%)	49 (37%)			
<b>IL2 rs4833248</b>	G/G	36 (43%)	25 (38%)	G/G vs A/A	0.27	1.9 (0.5 - 6.2)
	G/A	41 (50%)	33 (50%)	G/G vs G/A	0.67	1.1 (0.5 - 2.3)
	A/A	6 (7%)	8 (12%)	G/G vs G/A+A/A	0.49	1.2 (0.6 - 2.4)
	G	113 (68%)	83 (63%)	G vs A	0.34	1.2 (0.7 - 2.0)
	A	53 (32%)	49 (37%)			
<b>IL-2Rβ rs103694</b>	G/G	34 (41%)	25 (38%)	G/G vs A/A	0.85	1.1 (0.3 - 3.0)
	G/A	37 (45%)	33 (50%)	G/G vs G/A	0.57	1.3 (0.4 - 3.6)
	A/A	12 (14%)	8 (12%)	G/G vs G/A+A/A	0.67	1.2 (0.4 - 3.1)
	G	105 (63%)	83 (63%)	G vs A	0.94	0.9 (0.6 - 1.5)
	A	61(37%)	49 (37%)			

Quanto ao SNP -330 T/G da IL-2, a frequência do genótipo TT no grupo ≤F2 foi 43 e no grupo >F2 foi 38%. O genótipo TG teve como frequências 48% e 50% no grupo ≤F2 e >F2 respectivamente. E a frequência do genótipo GG foi 9% no grupo ≤F2 e 12% no grupo > F2. O valor do p=0,38.

Analisando as frequências genotípicas entre os grupos não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Diante desse resultado não foi encontrada associação do polimorfismo -330 T/G da IL-2 com as formas mais grave da doença. Vale lembrar também que as distribuições genotípicas dos grupos se apresentaram de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg.

O fato de não encontrar diferenças estáticas significativas, pode ser explicado pelo pouco número amostral. Mais estudos com maior poder amostral é necessário. Esse é o primeiro estudo a avaliar o papel do polimorfismo -330 T/G da IL-2 nas escalas da fibrose.

Para o SNP SNP -2425 G/A da IL-2, o genótipo GG apresentou frequências no grupo ≤ F2 e no grupo >F2 43% e 38% respectivamente. Já, a frequência do genótipo GA foi 50% tanto no grupo ≤ F2 e no grupo >F2. E a frequência do genótipo GG foi 7% no grupo ≤F2 e 12% no grupo > F2. O valor do p=0,32. Vale ressaltar que as frequências genotípicas estavam distribuídas de acordo com o equilíbrio de Hardy Weinberg.

Não existem estudos ainda que avaliam os efeitos do polimorfismo -2425 G/A da IL-2 no grau de fibrose provocada pelo vírus da Hepatite C. Esse é o primeiro estudo. Ao analisar a

distribuição dos genótipos nos grupos, não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Diante desse resultado não foi encontrada associação do polimorfismo -2425 G/A da IL-2 com os graus de fibrose.

Em relação ao SNP +10558 G/A do IL-2R $\beta$ , o genótipo GG teve com frequência 34% no grupo  $\leq$  F2 e 25% no grupo  $>$  F2. A frequência do genótipo GA no grupo  $\leq$  F2 e no grupo  $>$  F2 foi 45% e 50% respectivamente. E o genótipo GG apresentou frequências 14% e 12 % no grupo  $\leq$  F2 e no grupo  $>$  F2 respectivamente. O valor do  $p=0,94$ . As distribuições dos genótipos nos grupos se apresentaram em equilíbrio de Hardy Weinberg.

Analisando as frequências genóticas, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos  $\leq$  F2 e  $>$  F2. Portanto não existe associação do polimorfismo IL-2R $\beta$  com os graus de fibrose.

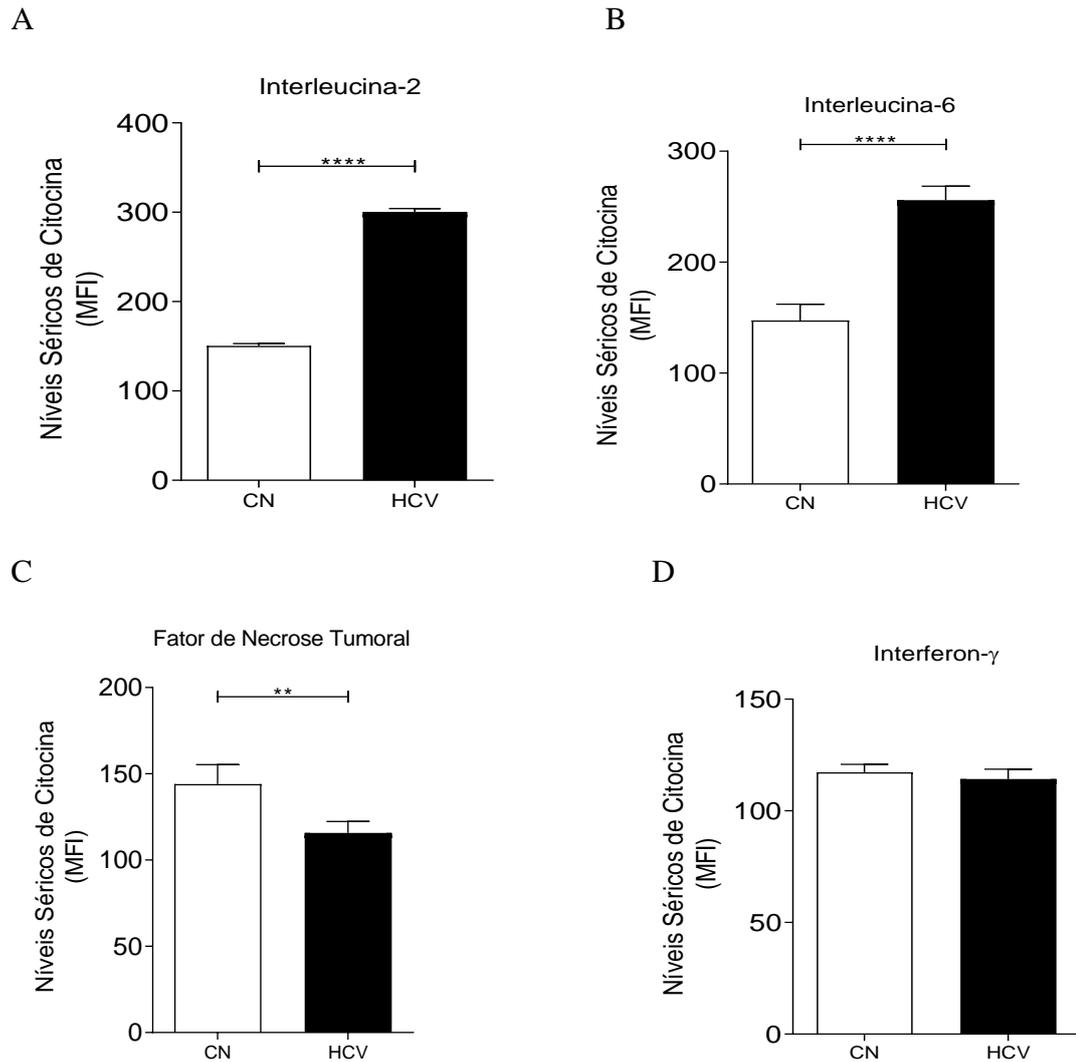
#### **5.4 Análise das citocinas séricas TH1, Th2 e TH17**

A análise das citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e IL-17A entre os grupos de pacientes HCV+ (n=34) e controle (n=34) foi realizada pelas medias de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a dosagem por citometria de fluxo CBA (Cytometric beads array).

##### **5.4.1 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas pró-inflamatórias e do perfil Th1 entre grupos de pacientes HCV + e Controle.**

Ao analisar os níveis séricos das citocinas no grupo de pacientes HCV+ e controle, foi observada para a maioria das citocinas, uma diferença estatística significativa, estando de uma concentração maior no grupo de pacientes HCV+ comparado ao grupo controle, exceto TNF-  $\alpha$  que a concentração foi maior no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes HCV+. Os valores de p foram: IL-2 ( $p<0,0001$ , **Figura 11A**), IL-6 ( $p<0,0001$ , **Figura 11B**), TNF-  $\alpha$  ( $p=0,0047$ , **Figura 11C**).

Em relação a IFN-  $\gamma$ . Não foi encontrada diferença estatística significativa, quando comparou-se o grupo de pacientes HCV+ ao grupo controle. Mas foi observada uma concentração maior no grupo controle. IFN-  $\gamma$  ( $p=0,594$ , **Figura 11D**).



**Figura 11.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) de citocinas séricas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF-  $\alpha$  (C) e IFN-  $\gamma$  (D) entre grupo controle (CN) e pacientes com Hepatite C (HCV). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são expressos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significante quando  $p < 0,05$ , representado por “\*”.

As citocinas são definidas como glicoproteínas imunomoduladores, que desempenham um papel importante na iniciação e na regulação do sistema imune. As citocinas Th1 estão associadas a imunidade mediada por células, desempenhando um papel importante na eliminação de patógenos intracelulares. Além disso, participam da proliferação e ativação de linfócitos T citotóxicos e de células NK. (GUIDOTTI; CHISARI, 2006).

Os estudos sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e do perfil Th1 em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C são conflituosos. Resultados semelhantes a este estudo foram obtidos por: TARRAGÔ et al., (2014) em um estudo em pacientes infectados pelo vírus da Hepatite C em Amazonas, onde foi observado um aumento no nível sérico da IL-2 no grupo

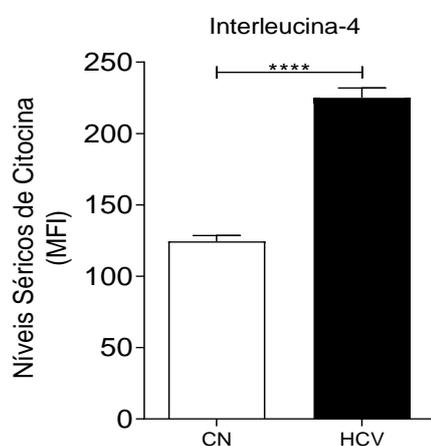
de pacientes em comparação ao grupo controle e por RODRIGUEZ (2007), em sua tese de doutorado, onde observou-se também que nos pacientes o nível sérico da IL-2 foi maior em comparação ao grupo controle, por OTHMAN et al., (2013) e por TARRAGO et al., (2014) onde foi observada uma concentração maior da IL-6 no grupo de pacientes comparado ao grupo controle, por BASKIC; VUKOVIC; POPOVIC et al., (2017), onde observou-se uma concentração maior de TNF-  $\alpha$  no grupo controle em comparação ao grupo de pacientes HCV+, por ABAYLI et al., (2003), onde não foi observada uma diferença na concentração do IFN-  $\gamma$  entre os grupos de pacientes HCV+ e controle.

Entendemos que o aumento na concentração das citocinas pró-inflamatórias pode contribuir com os processos inflamatórios e fibrogênese resultando em um aumento de grau de injúria no tecido hepático e a diminuição da citocina Th1 poderia estar relacionada à diminuição da resposta imune antiviral consequentemente à diminuição da eliminação do vírus.

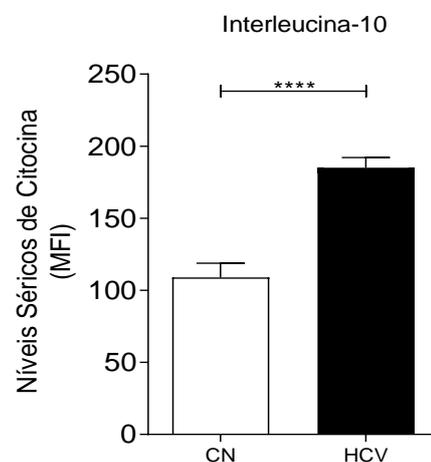
#### 5.4.2 Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas do perfil Th2 e Th17 entre grupos de pacientes HCV + e Controle.

Analisando os níveis séricos das citocinas do perfil Th2 e Th17 nos grupos de pacientes HCV+ e controle, foi observado que o nível sérico das citocinas foi maior nos grupos de pacientes HCV+ comparado ao grupo controle. Os valores de p foram: IL-4 ( $p < 0,0001$ , **Figura 14A**), IL-10 ( $p < 0,0001$ , **Figura 14B**), IL-17 ( $p < 0,0001$ ).

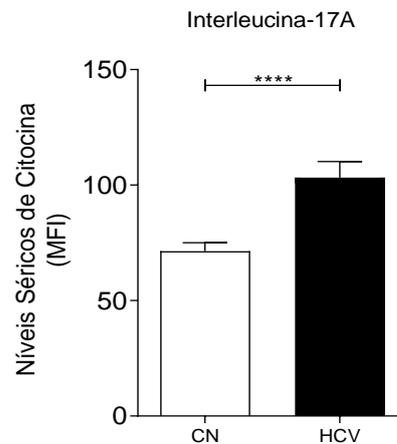
A



B



C



**Figura 12.** Média de intensidade de fluorescência (MFI) de citocinas séricas IL- 4 (A), IL- 10 (B) e IL-17A (C) entre grupo controle (CN) e pacientes com Hepatite C (HCV ). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Beads Array). Os resultados são com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significativa quando  $p < 0,05$ , representado por “\*\*”

As citocinas do perfil Th2 têm um papel importante na imunidade mediada por anticorpos. São responsáveis pela proliferação e ativação dos linfócitos B. Além disso participam na regulação da resposta inflamatória (GUIDOTTI; CHISARI, 2006). Portanto, podem inibir a resposta do perfil Th1, facilitando o escape do vírus. (FERRARI et al., 1999; REDPATH; GHAZAL; GASCOIGNE, 2001; NIETERS et al., 2005).

Os estudos sobre os níveis séricos das citocinas do perfil Th2 são controversos. Dados similares a este estudo foram obtidos por: RAMOS et al., (2012) onde foi encontrada uma concentração maior da IL-4 e da IL-10 no grupo de pacientes HCV+ comparado ao grupo controle, por BAHARLOU et al., (2018), onde foi observado um aumento no nível sérico da IL-17A no grupo de pacientes HCV+.

Em relação ao equilíbrio das citocinas do perfil Th1 e Th2. Foi observada uma predominância das citocinas do perfil Th2 no grupo de pacientes HCV+. Dados semelhantes foram obtidos por FAN et al., (2000).

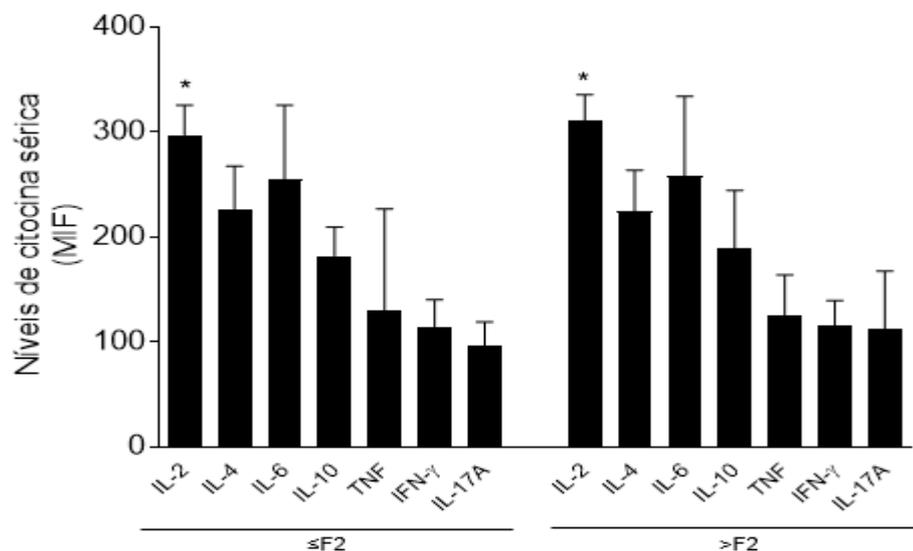
Entendemos que o desequilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 pode afetar o equilíbrio entre a imunidade mediada por células e a imunidade mediada por anticorpo, e conseqüentemente provocará o aumento na inflamação hepática, facilitando o desenvolvimento de fibrose.

### 5.5 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1, Th2, Th17.

Para esta análise, o grupo de 34 pacientes foi dividido em dois novos grupos. Levando em consideração o grau de fibrose  $\leq$ F2 (19 pacientes) e  $>$ F2 (15 pacientes). Essa classificação foi feita segundo a escala de METAVIR, que classifica a fibrose em F0, F1, F2, F3 e F4.

A comparação das citocinas séricas IL- 2, IL-4, IL- 6, IL- 10, TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e IL-17 entre os grupos foi realizada pelas medias de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a dosagem por citometria de fluxo CBA (Cytometric beads array).

Os resultados obtidos após as análises da concentração de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th2, demonstraram que houve diferença estatística significativa no nível sérico da IL-2 ( $p=0,019$ ) quando se comparam os grupos  $\leq$ F2 e  $>$ F2 (**Figura 13**)



**Figura 13.** Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas entre grupo de pacientes com hepatite classificado com o grau de progressão da fibrose  $\leq$ F2 e  $>$ F2 . As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico Mann Whitney. Foi considerada diferença estatística significativa quando  $p < 0,05$ , representado por “\*”.

A interleucina 2 (IL-2) é uma potente citocina imunomoduladora. Está envolvida no aumento da proliferação das células T, das células NK. De acordo com alguns estudos, a expressão aumentada de IL-2 está associada a um estágio mais avançado da Hepatite C (MAKRIS; PRESTON; RALPH, 1994; BOZKAYA et al., 2000). RODRIGUEZ (2007)

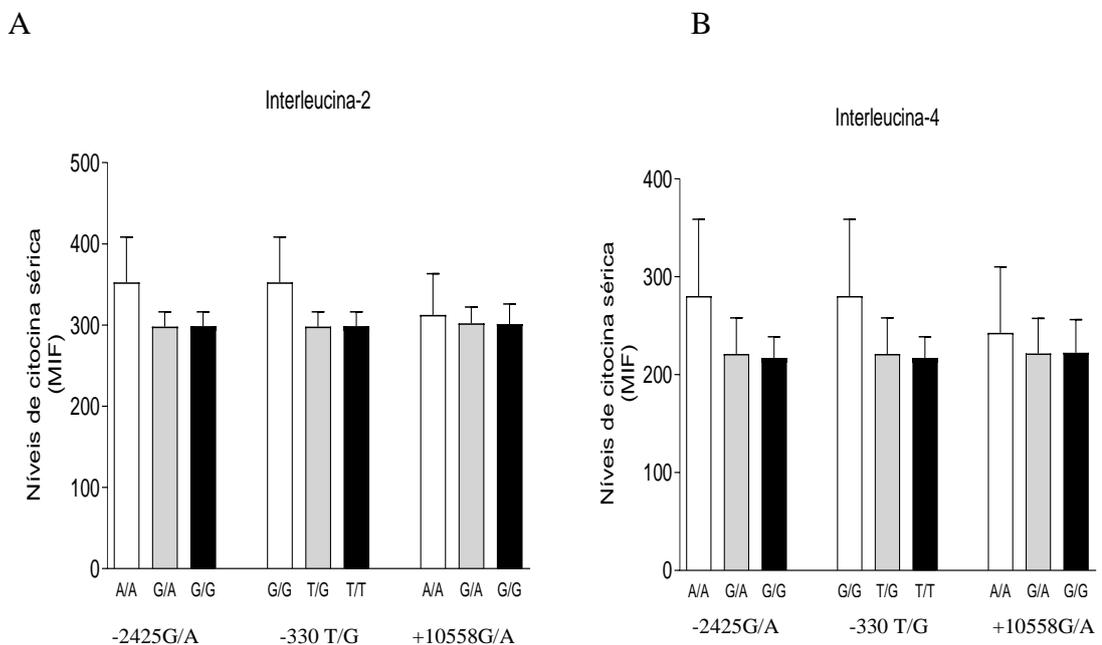
também observou, na sua tese de doutorado, uma concentração maior da IL-2 nas formas mais graves da Hepatite C.

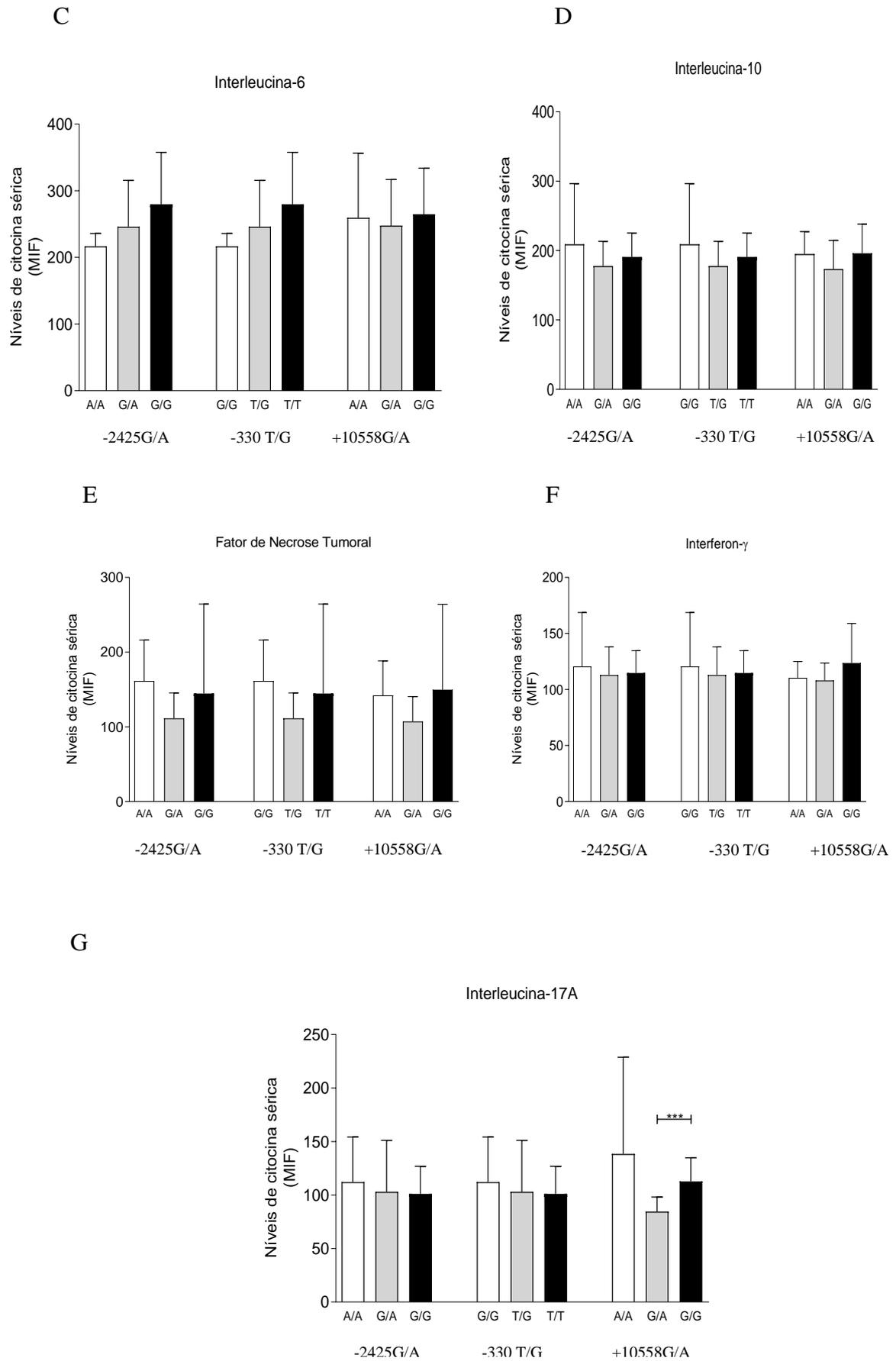
Os dados obtidos nesse estudo sugerem um papel importante da IL-2 na contribuição para a evolução da fibrose avançada como mostraram os estudos citados anteriormente.

### 5.6 Associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados e a média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th1, Th2, Th17.

A análise das citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e IL-17A entre os genótipos dos polimorfismos estudados no grupo de pacientes HCV+ (n=34) foi realizada pelas médias de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a dosagem por citometria de fluxo CBA (Cytometric beads array).

Comparando os níveis das citocinas entre os genótipos de cada polimorfismo, foi encontrada diferença estatística significativa somente nos genótipos do SNP +10558 G/A do IL-2R $\beta$  para interleucina 17 A (IL-17A) (p=0,0018). Comparando os genótipos entre si, foi observada diferença entre os genótipos A/A e G/A (p<0,0001).





**Figura 14.** Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL- 2 (A), IL- 4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF- $\alpha$  (E), INF  $\gamma$  (F), IL-17 A (G) entre os genótipos dos SNPs estudados. As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Beads Array). Os resultados são com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelos testes não paramétrico Mann Whitney e kruskal Wallis. Foi considerada diferença estatística significativa quando  $p < 0,05$ , representado por “\*”.

Ao analisar os níveis séricos das citocinas, foi observado que os indivíduos portadores do genótipo mutado (G/G) do SNP +10558 G/A do IL-2R $\beta$  apresentaram uma produção maior de IL-17A em comparação aos indivíduos portadores do genótipo heterozigoto (G/A). Não existem dados na literatura sobre a associação do SNP +10558 G/A do IL-2R $\beta$  a IL-17. Isso nos impossibilita de fazer comparação com outros estudos.

Em relação à IL-2 os estudos sobre a associação da produção da IL-2 com os genótipos do SNP -330 T/G são conflituosos. Hoffmann et al., (2001) mostraram que o alelo G está relacionado ao aumento na produção da IL-2. De acordo com eles, nos indivíduos portadores do genótipo mutado (G/G), a concentração da IL-2 é três vezes maior em comparação aos homozigotos selvagens (T/T). Entretanto, MARTISANZ et al., (2004), em um estudo em uma população espanhola mostraram que o alelo G está relacionado a uma expressão menor da IL-2.

Portanto nesse estudo não foi observada diferença estatística significativa entre os genótipos. Isso pode ser explicado pelo pequeno número amostral utilizado neste estudo. Vale ressaltar também que nesse estudo, os indivíduos portadores do genótipo mutado G/G apresentaram uma produção maior da IL-2 em comparação aos outros genótipos.

## 6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir:

- Os SNPs IL-2 rs4833248 e IL-2R $\beta$  rs1003694 não estão associados a suscetibilidade da Hepatite C.
- O SNP IL-2 rs2069762 poderia aumentar o risco para progressão da hepatite C. No entanto, um número amostral maior seria necessário para resultados conclusivos.
- Os dados demonstraram uma predominância das citocinas do perfil Th2.
- O aumento no nível sérico da IL-2 em pacientes com padrão de fibrose hepática > f2 está relacionado a um maior dano do tecido hepático.
- Esses resultados são importantes para auxiliar no pro-diagnóstico da Hepatite C e na determinação do perfil genético da população amazônica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAKEEM, M. S.; SHOUKRY, N. H. Protective Immunity Against Hepatitis C: Many Shades of Gray. **Frontiers in Immunology**. v. 5, 2014.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S. TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, fev. 2006.
- ALBERTI, A.; CHEMELLO, L.; BENVIGNÒ, L.; Natural history of hepatitis C. **Journal Hepatology**, v. 31, p. 17-24,1999.
- ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, p. 2436-2441, 2007.
- AMINI, M.; POUSTCHI, H. Hepatitis C virus spontaneous clearance: immunology and genetic variance. **Viral Immunology**, v. 25, p. 241–248, 2012.
- ANSALDI et al. Hepatitis C virus in the new era: Perspectives in epidemiology, prevention, diagnostics and predictors of response to therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, p. 9633-9652, 2014.
- ARAÚJO, A. R. et al. Characterization of hepatitis C virus in chronic hepatitis patients: genotypes in the state of Amazonas, Brazil. **Revista da sociedade Brasileira de medicina tropical**, v. 44, n. 5, p. 638-640, 2011.
- ARZUMANHA, A.; REIS, H. M.; FEITELSON, M. A. Pathogenic mechanisms in HBV-HCV-associated hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, p. 123-135, 2013.
- AZATYAN, V. et al. Evaluation of IL-2, IL-10, IL-4 and  $\gamma$ -interferon levels in the oral fluids of patients with hepatitis C, B and HIV. **Journal of Infection Developing Countries**, v. 13, p. 69-74, 2019.
- BAHARLOU, R. et al. Genotype-related variations in proinflammatory and regulatory cytokine levels in treated and treatment-naive HCV-infected patients. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 207, p. 65-74, 2018.

- BARTON, G. M.; KAGAN, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nature Reviews immunology**, v. 9, p. 535-542, 2009.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 209-218, 2005.
- BATSAIKHAN, B., et al. Elevated interleukin-4 levels predicted advanced fibrosis in chronic hepatitis C. **Journal of Chinese Medical Association**, v. 82, p.277-281, 2019.
- BAYER, A. L. ; YU, A.; ADEEGBE, D. et al. Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 769-777, 2005
- BOUZID, D. et al. Polymorphisms in the IL2RA and IL2RB genes in inflammatory bowel disease risk. **Genetic Testing & Molecular Biomarkers**, v. 17, p. 833–839, 2013.
- BOYMAN, O; SPRENT, J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. **Natura Revista Immunology**, v. 12, p. 180-190, 2012.
- BOZKAYA, H. et al. Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. **Infection**, v. 28, p. 309–313, 2000.
- BRASIL, Ministério de Saúde. Secretaria da vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológica de Hepatites virais**. Brasília 2018.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, p. 177-186, 1999.
- BRUGGMANN, P. et al. Historical epidemiology of hepatitis C virus (HCV) in selected countries. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 21, p. 5-33, 1 maio 2014.
- BUSCH, M. P.; KLEINMAN, S. H.; NEMO, G. J. Current and emerging infectious risks of blood transfusions. **Journal of the American Medical Association**, v. 289, p. 959-962, fev. 2003.
- CALIBASI, G. K.; BASBINAR, Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. **IntechOpen**, sept. 20017.

CAVANILLAS, M. et al., Polymorphisms in the IL2, IL2RA and IL2RB genes in multiple sclerosis risk. **European Journal of Human Genetics**, v. 18, p. 794–799, 2010.

CHAN, A. et al. CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. **Journal of immunology**, v. 179, p. 89-94, jul. 2007.

CHAKRAVARTI A. Single nucleotide polymorphisms: To a future of genetic medicine. **Nature**, v. 409, p.822-823, 2001.

CHAYAMA, K.; HAYES, C. N. Hepatitis C virus: How genetic variability affects pathobiology of disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 26, p. 83-95, jan. 2011.

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

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a Cdna clone derived from a blood-borne non-A, non B, viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-362, 1989.

CHOU, S. H. et al. Palmitate-derivatized human IL-2: a potential anticancer immunotherapeutic of low systemic toxicity. **Cancer Immunology and Immunotherapy**, v. 62, p. 597-603, 2013.

CHURLAUD, G et al. Sustained stimulation and expansion of Tregs by IL-2 control autoimmunity without impairing immune responses to infection, vaccination and cancer. **Journal of Clinical Immunology**, v. 151, p. 114-126, 2016.

COOKE, G. S. et al. Viral hepatitis and the Global Burden of Disease : a need to regroup. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 20, p. 600-601, 2013.

COPPOLA, NICOLA et al. Hepatitis B virus and hepatitis C virus infection in healthcare workers. **World Journal of Hepatology**, v. 8, p. 273-281, 2016.

CRABTREE, G. R.; CLIPSTONE, N. A. Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 1045-1083, 1994.

CROTTA, STEFANIA et al. Inhibition of Natural Killer Cells through Engagement of CD81 by the Major Hepatitis C Virus Envelope Protein. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 35-42, jan. 2002.

DE ARAÚJO, S. F. J et al. Single nucleotide polymorphisms of the genes IL-2, IL-2R $\beta$ , and JAK3 in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) guyanensis* in Manaus, Amazonas, Brazil. **Plos One**, v. 14, 2019.

DHUPKAR, POOJA; GORDON, NANCY. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhance Immune-Therapeutic Efficacy. **Imunoterapy**, p. 33-51, 2017.

DONDETI et al. Hepatitis-related hepatocellular carcinoma: Insights into cytokine gene polymorphisms. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, p. 6800-6816, 2016.

DUBUISSON, JEAN; HELLE, F.; COCQUEREL, L. Early steps of the hepatitis C virus life cycle. **Cellular Microbiology**, v. 10, p. 821-827, 2008.

DUBUISSON, JEAN; COSSET, FRANCOIS-LOÏC. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle-An update. **Journal of Hepatology**, v. 61, p. 3-13, 2014.

ECKELS, D. D. et al. In vitro human Th-cell responses to a recombinant hepatitis C virus antigen: failure in IL-2 production despite proliferation. **Human Immunology**, v. 60, p. 187-199, 1999.

ERICKSON, A. L. et al. The outcome of hepatitis C infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. **Immunity**, v. 15, p. 883-895, dez. 2001.

EMELIANOVA, A. N.; VITKOVSKY, Y. A. Polymorphism of genes of cytokine of IL-2 (T330G), IL-10(C919T) and IL-10 (G1082A) in Chronic virus Hepatitis C. **Revista Medicina Molecular**, nº 3, 2013.

EVANS, M. J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature**, v. 446, p. 801-805, 2007.

FECURY, A. A. et al. Association between histological findings, aminotransferase levels and genotype in chronic hepatitis C infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 90-92, 2014.

FEDERICO, A. DI LELLO et al. New evidence of replication of hepatitis C virus in short-term peripheral blood mononuclear cell cultures. **Virus Research**, v. 191, p. 1-9, 2014.

FEHNIGER, T. A. et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. **Blood**, v. 101, p. 3052–3057. 2003.

FERJANI, Z. et al. Association between the IL2RA polymorphism and type 1 diabetes risk: Family based association study. **Meta Gene**, v. 10, p. 118–122, 2016.

FERRARI, C. et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 31, p.31–8, 1999.

FONSECA, J. C. F.; BRASIL, L. M. Infecção pelo vírus da hepatite C na região Amazônica brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 1-8, 2004.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production, and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, p. 109-123, 2004.

GAO, Q. J. et al. Cytokine polymorphisms and hepatitis virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, p. 5610-5619, 2009.

GE, D.; FELLAY, J.; THOMPSON, A. J. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, p. 399-401, 2009.

GEORGEL, P. et al. Virus-host interactions in hepatitis C virus infection: implications for molecular pathogenesis and antiviral strategies. **Trends in molecular Medicine**, v. 16, n. 6, p. 277-286, 2010.

GRANUCCI, F.; VIZZARDELLI, C.; PAVELKA, N. et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. **Nature Immunology**, v. 2, p. 882-888, 2001.

GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. **Annual Review of Pathology**, v. 1, p.23–61, 2006.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Gastroenterology & Hepatology**, v. 10, p. 553-562, 2013.

- HEIM, M. H. Innate immunity and HCV. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 3, 564-574, 2013.
- HEIM, M. H.; THIMME, ROBERT. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **Journal of Hepatology**, v. 61, p. 14-25, 2014.
- HENGST, J. et al. Direct-Acting Antiviral–Induced Hepatitis C Virus Clearance Does Not Completely Restore the Altered Cytokine and Chemokine Milieu in Patients With Chronic Hepatitis C. **The Journal of Infectious Diseases**, 2016.
- HENNESSY. B. T.; SMITH, D. L.; RAM, P. T. et al. Exploiting the PI3k/AKT pathway for drug cancer discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, p. 988-1004, 2005.
- HERSHKO, A. Y.; SUZUKI, R.; CHARLES, N. et al. Mast cell interleukin-2 production contributes to suppression of chronic allergic dermatitis. **Immunity**, v. 35, p. 562-571, 2011.
- HOFFMANN, S. C. et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**, v.2, p.1444-1450, 2001.
- HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, p. 9-21, 2002.
- HORNER, S.M.; Gale M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature Medicine**, v. 19, p.879–88, 2013.
- HOWELL, J. et al. Toll-like receptors in hepatitis C infection: Implications for pathogenesis and treatment. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 28, n. 5, p. 766-776, 1 maio 2013.
- HU, X. B. ; OUYANG, L. Z. ; TANG, L. L. Interleukin-2 gene polymorphisms and prognosis of breast cancer. **Genetic Testing and molecular Biomarkers**, v.17, p. 453-457, 2013.
- Human Genome organization. Cambridge: 1000 genomes Project. Disponível em <<http://www.internationalgenome.org>>. Acesso em: 15 abr. 2020.
- JENNIFER, ONWUMEH; CHARLES, OKWUNDU; TAMARA, KREDO. Interleukin-2 as an adjunct to antiretroviral therapy for antiretroviral therapy for HIV-positive adults. **Cochrane Database of Systematic Review**, 2017

JHON, S. TURNER et al. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. **European Journal of Immunogenetics**, v. 25, p. 419-420, 1998.

JU, G. et al. Structure-function analysis of human interleukin-2. Identification of amino acid residues required for biological activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5723-57331, 1987.

KELLY, S. Splicing of many human genes involves sites embedded within introns. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. 4721-4732, 2015.

KENN, L. J. The extent and analysis of cytokine na cytokine receptor gene polymorphism. **Transplant Immunology**, v. 10, p. 143-146, 2002.

LARRUBIA, J. R. et al. Role of chemokines and their receptores in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World journal Gastroenterology**, v. 14, p. 7149-7159, 2008.

LAUER, GEORG M.; WALKER, BRUCE D. Hepatitis c virus infection. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 41-52, 2001.

LEE, C. H. et al. Hepatitis C virus core Protein Inhibits Interleukin 12 and Nitric Oxyde Production from Activated Macrophages. **Virology**, v. 279, p. 271-279, 2001.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 25, p. 195-206, 2011.

LI, K.; LEMON, S. M. Innate Immune Responses in Hepatitis C Virus Infection. **Seminars in immunopathology**, v. 35, n. 1, p. 53-72, jan. 2013.

LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. **Immunity**, v. 38, p. 13-25, 2013.

LIASKOU, E. et al. Innate Immune cells in liver inflammation. **Mediators of Inflammation**, 2012.

LOGVINOFF, C. et al. Neutralizing of antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. **Medical Sciences**, v. 101, n. 27, p. 10149-10154, 2004.

LOHRER, H. D.; TANGEN, U. Investigations into the molecular effects of single nucleotide polymorphism. **Pathobiology**, v. 68, p. 283–290, 2000.

LONGMAN, R. S. et al. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. **Blood**, v. 103, p. 1026-1029, 2004.

LOO, Y. M.; GALE, M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 680-692, 27 maio 2011.

LUPBERGER, J. et al. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. **Nature Medicine**, v. 17, p. 589-595, 2011.

MA, J. et al. TGF- $\beta$ 1 polymorphism 509 C>T is associated with an increased risk for hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 4461-4468, 2015.

MAKRIS, M.; PRESTON, F. E.; RALPH, S. Increased soluble IL-2 receptor levels in HCV-infected haemophiliacs: A possible indicator of liver disease severity. **Journal of Haematology**, v. 87, p. 419–21, 1994.

MALEK, T. R. The biology of Interleukin-2. **Annual Review of Immunology**, v. 26, p. 453-479, 2008.

MANNS, M. P et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, 2017

MARTINS, T.; NARCISO-SCHIAVON, J. L.; SCHIAVON, L. DE L. et al. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, p. 107-112, 2011.

MAST, E. E. et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis C virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. **The journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 1880-1889, 2005.

MATESANZ, F. et al. Allelic selection of human interleukin-2 gene. **European Journal Immunogenetics**, v. 30, p. 3516–3521, 2000.

- MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 61, p. 77-87, 2015.
- MOFFATT, M. F. et al. A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 1211-1221, 2010.
- MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 453-463, 2007.
- MORGAN, D. A. et al. Selective in vitro growth of T lymphocytes from Normal human bone marrows. **Science**, v.193, p. 1007-1008, 1976.
- NAPOLI, J. et al. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. **Journal of Hepatology**, v. 24, p. 759-765, 1996.
- NIETERS, A. et al. Effect of cytokine genotypes on the hepatitis B virus-hepatocellular carcinoma association. **Cancer**, v. 103, p. 740-748, 2005.
- NUSSBAUM R. L. et al. Variação Genética em Indivíduos: Mutação e Polimorfismo. In: *Genética Médica: Thompson & Thompson*. 6. ed., p. 47-62, 2002.
- OKAMOTO, A. T. et al. Noguchi Inhibition of peritoneal metastasis in an animal gastric cancer model by interferon-gamma and interleukin-2. **Anticancer research**, v. 62, p. 597-603, 2013.
- OLEKSYK, T. K. et al. Polimorfismos de nucleotídeo único e haplótipos na região IL-10 associados à depuração do HCV. **Genes Immunity**, v. 6, p. 347-57, 2005.
- OLLIER, W. E. R. Cytokine genes and disease susceptibility. **Cytokine**, v. 28, p. 174-178, 2004.
- Organizacion Panamericana de la Salud (OPS). La hepatitis B y C bajo la lupa. La respuesta de salud pública en la Región de las Americas 2016. Washington, DC. OPS, p. 88, 2016.
- OSINALDE, N. Characterization of Receptor-Associated Protein Complex Assembly in interleukin (IL)-2 and Il-15-Activated T-cell Lines. **Journal of Proteome Research**, v. 16, p. 106-121, 2017.

- OTHMAN, M. S. et al. Serum Levels of Interleukin-6 and Interleukin-10 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. **ISRN Hepatology**, 2013.
- OZAKI, K; LEONARD, W. J. Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 29355-29358, 2002.
- PALIARD, X. et al. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. **The journal of Immunology**, v. 141, p. 849-855, 1988.
- PARK, S. H. et al. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. **Immunity**, v. 40, n. 1, p. 13-24, 2014.
- PAWLOTSKY, J.; CHEVALIEZ, S.; MCHUTCHISON, J. G. The Hepatitis C Virus Life Cycle as a Target for New Antiviral Therapies. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 1979-1998, 2007.
- PEREIRA, G. L. et al. Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experienced HCV Chronic-Infected Patients. **Mediators of Inflammation**, 2019.
- PEZACKI, J. P.; SINGARAVELU, R.; LYN, R. K. Host-virus interactions during hepatitis C virus infection: a complex and dynamic molecular biosystem. **Molecular Biosystems**, v. 6, n. 7, p. 1131-1142, 2010.
- PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, v. 282, p. 938-941, 1998.
- POOJA, D.; NANCY, G. Interleukin-2: Old and New Approaches to Enhances Immune-Therapeutic Efficacy. **Immunotherapy**, v. 9, p. 33-51, 2017.
- PLOSS, A. et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, v. 457, p. 882-886, 2009.
- POYNARD, T. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 38, p. 257-265, 2003.
- RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver of as an imunological organ. **Hepatology**, v. 43, p. 54-62, 2006.

RAMOS, J. A. et al. 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 Res Notes** v. 5, p.508, 2012.

REDPATH, S.; GHAZAL, P.; GASCOIGNE, N. R. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. **Trends In Microbiology**, v. 9, p. 86-92, 2001.

REHERMANN, B. Interação entre o vírus da hepatite C e o sistema imunológico. **Seminars in Liver Disease**, v. 20, p. 127–41, 2000.

RICKERT, M. et al. Structural Biology: The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. **Science**, v. 308, p. 1477-1480, 2005.

RODRIGUEZ, A. T. V. Hepatite C crônica e citocinas. Tese (doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2007.

ROGOZIN, I. B. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. **Current Biology**, v. 13, p. 1512-1517, 2003.

ROSEN, H. R.; GRETCH, D. R. Current understanding and prospects for future therapies. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 393-399, set. 1999.

SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 millions single nucleotide polymorphism . **Nature**, v. 4091, n. 682, p. 928-933, 2001.

SAINZ, B. J. et al. Identification of the Niemann-Pick C1-like 1 cholesterol absorption receptor as a new hepatitis C virus entry factor. **Nature Medicine**, v. 18, p. 281-285, 2012.

SAKAGUCHI, S. et al. On Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v, 133, p. 775-787, 2008.

SAKAGUCHI, E. et al. Th1/Th2 imbalance in HCV-related liver cirrhosis. **Nihon Rinsho**, v. 59, p. 1259-1263, 2001.

SATO, K. et al. Expression of Toll-like receptors in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, n. 10, p. 1627-1632, 1 out. 2007.

SAXENA, R. et al. Effect of IL-12B, IL-2, TGF-beta1, and IL-4 polymorphism and expression on hepatitis B progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, p. 117-128, 2014.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type 1 is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO Journal**, v. 21, p. 5017-5025, 2002.

SCHEEL, T. K.; RICE, C. M. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. **Nature Medicine**, v. 19, p. 837-849, 2013.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **The journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 94, p. 1195-1202, 1994.

SETOGUCHI, R.; HORI, S.; TAKAHASHI, T. et al. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. **The Journal of Experimental of Medicine**, v. 201, p. 723-735, 2005.

SHASTRY, B. S. SNP alleles in human disease and evolution. **Journal of Human Genetics**, v. 47, p. 561-566, 2002.

SHAW, A. S. How T cells 'find' the right dendritic cell. **Nature Immunology**, v. 9, p. 229-230, 2008

SHEN, Y. et al. The association between -330T/G polymorphism of interleukin 2 gene and bladder cancer. **DNA and Cell Biology**, v. 31, p. 983-987, 2012.

SIEGEL, J. P et al. The IL-2 receptor  $\beta$  chain (p70): role in mediating signals for LAK, NK, and proliferative activities, **Science**, v. 238, p. 75-78, 1987.

SMITH, DONALD B. et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. **Hepatology**, v. 59, p. 318-327, jan. 2014.

SOUZA-CRUZ, S. et al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver fibrosis score: a proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned by IL-10. **Microbiology**, 2016.

STADHOUDERS, R. et al. Transcription regulation by distal enhancers: who's in the loop? **Transcription**, v. 3, p. 18-186, 2012.

STOCKMAN, L. J. et al. Rapid hepatitis C testing among persons at increased risk for infection-Wisconsin, 2012-2013. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 63, p. 309-311, 2014.

SUWA, H. Dysregulated expression of the IL-2 receptor beta-chain abrogates development of NK cells and Thy-1+ dendritic epidermal cells in transgenic mice. **International Immunology**, v. 7, p.1441, 1995.

TAN, A. et al. (2015). Genetic variants in IL12 influence both hepatitis B virus clearance and HBV-related hepatocellular carcinoma development in a Chinese male population. **Tumour Biology**, v. 37, p. 6343–6348, 2015.

TARRAGÔ, A. M. et al. Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: genótipos no Estado do Amazonas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, sept. 2011.

TARRAGÔ, A. M. et al. Combined Impact of Hepatitis C Virus Genotype 1 and interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Polymorphisms on Serum Levels of Pro-Inflammatory Cytokines in Brazilian HCV-infected Patients. **Human Immunology**, v.75, p. 1075-1083, 2014.

TARRAGÔ, A. M. et al. Combination of genetic polymorphisms in TLR influence cytokine profile in HCV patients treated with DAAs in the State of Amazonas. **Cytokine**, v. 130, 2020.

TELLINGHUISEN, T. L. et al. Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus. **Journal of Virology**, v. 81, p. 8853-8867, 2007.

TERILLI, R. R.; COX, A. L. Immunity and Hepatitis C: A Review. **Current HIV / AIDS Reports**, v. 10, p. 51-58, 2013.

THIMME, ROBERT. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. **Biological Chemistry**, v. 389, n. 5, p. 457, 2008.

THURSZ, M.; YEE, L.; KHAKOO, S. Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C. **Seminars in Liver Disease**, v. 31, p. 115–127, 2011.

TILG, H.; KASER, A.; MOSCHEN, A. R. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. **Liver International**, v. 26, p. 1029-1039, 2013.

TORCHILIN, V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature**, v. 4, p. 145-160, 2005.

TORRES, K. L. et al. Hepatitis C Virus in Blood Donors, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 676-678, 2009.

WANG, X.; RICKERT, M.; GARCIA, K. C. Structural biology: Structure of the quarternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. **Science**, v. 310, p. 1159-1163, 2005.

WARD, J. W. The hidden epidemic of hepatitis C virus infection in the United States: occult transmission and burden of disease. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 21, p. 15-19, 2013.

WEI, Y. S. et al. Association of the interleukin-2 polymorphisms with interleukin-2 serum levels and risk of nasopharyngeal carcinoma. **DNA and Cell Biology**, v. 29, p. 363-368, 2010.

WILLIAMS, M. A. et al. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. **Nature**, v. 441, p.890–893, 2006.

WHO. World Health Organization. Disponível em: < <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 12 set. 2019.

VIEIRA, D. S. et al. Distribution of hepatitis c virus (hcv) genotypes in patients with chronic infection from Rondonia, Brazil. **Virology journal**, v. 8, p. 165-167, 2011.

WOLF, JANINA; ROSE-JOHN, STEFAN; GARBERS, CHRISTOPHE. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. **Cytokine**, v. 70, p. 11-20, 2014.

WU, J. et al. : Promoter polymorphisms of IL2, IL4 and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. **Molecular Carcinogenesis**, v. 48, p. 626-632, 2009.

WRIGHT, A. F. Genetic variation: Polymorphism and mutation. **Encyclopedia of life Science**, p. 1-10, 2005.

XU, XIUWEN et al. Correlation between IL-2 and TNF- $\alpha$  gene promoter polymorphisms in the host immune system and chronic infection with hepatitis C virus. **Journal of Guiyang Medical College**, 2015.

YANG, YONGHUI. Genetic analysis of the relation between IL2RA/IL2RB and rheumatoid arthritis risk. **Molecular Genetics & Genomic Medecine**, v. 7, 2019.

ZEISEL, M. B. et al. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral Therapies. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 3, p. 566-576, 2011.

Zhen-Qi, H. et al. Expression profile and kinetics of cytokines and chemokines in patients with chronic hepatitis C. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v, 8, p. 17995-18003, 2015.