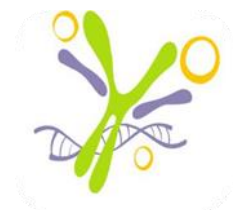




**UFAM**



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

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E**  
**DO INFLAMASSOMA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE**  
**HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C**

**DIANA MOTA TORO**

**MANAUS - AMAZONAS**  
**2019**

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

**DIANA MOTA TORO**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E  
DO INFLAMASSOMA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE  
HEPÁTICA EM PACIENTES COM HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientadora: Dra. Adriana Malheiro Alle Marie**

**Coorientadora: Dra. Aya Sadahiro**

**MANAUS - AMAZONAS  
2019**

## Ficha Catalográfica

T686p Toro, Diana Mota  
Avaliação dos polimorfismos em genes de citocinas e do inflamassoma no desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes com hepatite C. / Diana Mota Toro . 2019  
98 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Adriana Malheiro Alle Marie  
Coorientadora: Aya Sadahiro  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Hepatite C. 2. Fibrose hepática. 3. Polimorfismos. 4. Citocinas.  
5. Inflamassomas. I. Marie, Adriana Malheiro Alle. II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

**DIANA MOTA TORO**

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E DO  
INFLAMASSOMA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA EM  
PACIENTES COM HEPATITE C.**

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada e aprovada em sua versão final pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas.

Prof. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria  
Coordenador PPGIBA

Apresentada perante a Banca Examinadora composta pelos professores:

Dra. Adriana Malheiro Alle Marie – Presidente  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr. Vanderson de Souza Sampaio  
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

Dr. Rajendranath Ramasawmy  
Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)

Manaus, 16 de julho de 2019

*Dedico este trabalho à minha Mãe, pela sua força e amor para criar seus filhos,  
independente de quaisquer adversidades.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por todo seu amor e misericórdia, por me proporcionar força e determinação nos momentos mais difíceis. A minha **Mãe**, meu maior exemplo na vida, que desde muito cedo me ensinou com seu exemplo a ser forte e buscar meus objetivos.

A uma pessoa especial tenho minha vida, **Cláudio Henrique Albuquerque Rodrigues**, você compartilha comigo a felicidade e o mérito por esta e tantas outras conquistas. Obrigada por todo o companheirismo, paciência e Amor. Eu amo você!

A minha querida orientadora, professora **Dra. Adriana Malheiro**, agradeço imensamente pela oportunidade, por acreditar na minha capacidade, pelo incentivo, paciência, conselhos, ensinamentos para a realização desse trabalho. Saiba que a Sra. é um exemplo como pessoa, profissional e pesquisadora. Muito obrigada!

A minha coorientadora, professora **Dra. Aya Sadahiro**, pela generosa acolhida, pelos ensinamentos e horas de conversas. A Sra. é maravilhosa e um grande exemplo para mim. Muito obrigada por tudo!

A professora **Dra. Andrea Tarragô**, eu não tenho palavras que possam expressar minha gratidão e carinho por você. Obrigada por me acolher, pela paciência, pelas longas conversas e por acreditar em mim quando nem eu mais acreditava.

Ao professor **Dr. Mauricio Ogusku** do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, muito obrigada por me receber e por todo o suporte necessário nos testes moleculares.

Ao querido **Nilberto Dias**, amigo de tantas vidas, idas e vindas, você é um irmão que ganhei de presente, obrigada por tanto.

Ao meu amigo querido e parceiro de vida **Pedro Vieira**, eu precisaria de muitas páginas para falar da minha gratidão pela nossa amizade e parceria. Muito obrigada pelas madrugadas que estive ao meu lado, foram as primeiras de muitas que virão.

Aos meus **amigos do mestrado**, gratidão pela amizade e parceria, juntos fomos capazes de vencer todas as dificuldades no decorrer das disciplinas, acho que já estou sentindo saudades das nossas manhãs corridas e com bastantes café, após madrugadas estudando. Amo vocês! A minha amiga **Mariana Brasil**, te agradeço muito pela amizade, paciência e apoio sempre que precisei. Muito obrigada e conte comigo para sempre.

A **Dra. Alessandra Pontillo, Dra. Jaila Borge, Dr. Sidney Chalub e Allyson Guimarães** obrigada pelas sugestões e correções no exame de qualificação.

Aos meus queridos amigos, colegas e colaboradores do **laboratório de Genômica e NAEP – HEMOAM**, obrigada pela amizade e apoio sempre que necessário.

A **Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)** e **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)**, em especial a **Dra. Marilú Victoria** e **Dr. Flamir Victoria** pela excelente parceria.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a concretização deste trabalho e por viabilizarem a Ciência e Tecnologia no Brasil.

A **UFAM**, Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - **PPGIBA**, especialmente ao **Edson** e **Ana Paula**, por toda ajuda e suporte necessário. Aos **professores do PPGIBA-UFAM** pelos ensinamentos durante as aulas, vocês são um exemplo para nós.

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

## RESUMO

A hepatite C é uma doença inflamatória no fígado causada pelo vírus da hepatite C (HCV). Os indivíduos infectados com o HCV apresentam diferenças no prognóstico clínico da doença. Em torno de 70% apresentam hepatite C crônica e podem desenvolver fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular. As manifestações clínicas e a evolução da doença estão relacionadas com diferenças na resposta imunológica contra o HCV. Uma resposta imune bem-sucedida é essencial para eliminação do vírus, no entanto, as características genéticas do hospedeiro podem resultar em respostas imunes com alterações de ganho ou perda de função, as quais podem ser associadas à inflamação crônica e infecção persistente. As infecções virais estimulam a produção de IL-1 $\beta$  através da via de sinalização dos inflamassomas. A citocina IL-1 $\beta$  atua na resposta antiviral induzindo genes pró-inflamatórios, via ativação de NF- $\kappa$ B, recrutando leucócitos para o local da infecção e modulando a ação de células infiltradas. Por outro lado, a IL-1 $\beta$  também pode promover a produção de moléculas pró-fibrogênicas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças relacionadas com o HCV. Objetivo: Avaliar os polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma *NLRP3*, *CARD8*, *CTSB* e *AIM2* no desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes com hepatite C, atendidos em uma unidade de referência na Amazônia brasileira. Os polimorfismos nos genes da *IL1B* e *IL18* foram genotipados por PCR-RFLP, enquanto *NLRP3*, *CARD8*, *CTSB* e *AIM2* por PCR em Tempo Real. A quantificação sérica da citocina IL-1 $\beta$  foi realizada pela técnica de ELISA. Resultados: No presente estudo analisamos 151 amostras de pacientes com Hepatite C crônica, e 206 amostras do grupo controle. Entre os pacientes 84 apresentaram fibrose leve (<F2) e 67 fibrose avançada ( $\geq$ F2). Foi observada interação gênica entre *CARD8* rs2009373 C/T e *IL1B* rs16944 C/T ( $p_{\text{adj}}=0.039$ ), assim como para *CTSB* rs1692816 A/C e *AIM2* rs1103577 C/T ( $p_{\text{adj}}=0.008$ ), sugerindo que existe cooperação entre esses SNPs na proteção contra o desenvolvimento da hepatite C. Na análise de interação gênica entre os subgrupos de pacientes com hepatite C (<F2 vs  $\geq$ F2), foi observada uma interação entre *CARD8* rs2009373 T/T e *IL18* rs187238 G/C, após o valor de  $p$  ser ajustado por sexo e idade ( $p_{\text{adj}}=0.028$ ), sugerindo que existe cooperação entre esses SNPs na proteção contra o desenvolvimento da fibrose hepática. Conclusão: Nesse estudo, descrevemos as frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos estudados, além de observarmos que parece haver cooperação entre alguns genes, que codificam componentes dos inflamassomas, no sentido de conferir proteção contra a infecção pelo HCV e desenvolvimento de fibrose hepática.

**Palavras-chaves:** Hepatite C; Fibrose hepática; Polimorfismos; Citocinas; Inflamassomas.



## ABSTRACT

Hepatitis C is an inflammatory disease of the liver caused by the hepatitis C virus (HCV). Differences in the prognosis of infected individuals are observed, among which, in turn, 70% present chronic hepatitis C and may develop hepatic fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The clinical manifestations and the evolution of the disease are related to the way the immune system interacts and responds against HCV. A successful immune response is essential for virus elimination, however, host genetic characteristics may result in immune responses with gain or loss of function changes, which may be associated with chronic inflammation and persistent infection. Viral infections are known to induce production of IL-1 $\beta$  through the signaling pathway of inflammasomes. The IL-1 $\beta$  cytokine would act on the antiviral response by inducing proinflammatory genes via activation of NF- $\kappa$ B by recruiting leukocytes to the site of infection and modulating the action of infiltrated cells. On the other hand, IL-1 $\beta$  could also promote the production of pro-fibrogenic molecules, contributing to the development of diseases related to HCV. **Objective:** To evaluate the polymorphisms in the IL-1 $\beta$  and IL-18 cytokine genes and the inflammasomes NLRP3, CARD8, CTSB and AIM2 in the development of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C, attended at a reference unit in the Brazilian Amazon. Polymorphisms in the IL-1 $\beta$  and IL-18 genes were genotyped by PCR-RFLP, while NLRP3, CARD8, CTSB and AIM2 by Real-Time PCR. Serum quantification of IL-1 $\beta$  cytokine was performed by the ELISA technique. **Results:** In the present study we analyzed 151 samples from patients with chronic hepatitis C and 206 samples from the control group. Among the patients, 84 presented mild fibrosis (<F2) and 67 advanced fibrosis ( $\geq$ F2). Gene interaction was observed between CARD8 rs2009373 C/T and IL1 $\beta$  rs16944 C/T ( $p_{adj} = 0.039$ ), as well as for CTSB rs1692816 A/C and AIM2 rs1103577 C/T ( $p_{adj} = 0.008$ ), suggesting that there is cooperation between these SNPs in protection against the development of hepatitis C. In the analysis of gene interaction between the subgroups of patients with hepatitis C (<F2 vs  $\geq$ F2), a interaction was observed between CARD8 rs2009373 T/T and IL18 rs187238 G/C ( $p_{adj} = 0.028$ ), suggesting that there is cooperation between these SNPs in protection against the development of hepatic fibrosis. **Conclusion:** In this study, we described the allelic and genotype frequencies for the polymorphisms in the studied genes, in addition to observing that there seems to be cooperation between some genes, which encode components of inflammasomes, in order to provide protection against HCV infection and development of liver fibrosis.

**Keywords:** Hepatitis C; Hepatic fibrosis; Polymorphisms; Cytokines; Inflammasomes.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização de fibrose moderada e cirrose conforme valores de APRI e FIB4.	84
<b>Tabela 2:</b> Informações sobre os polimorfismos estudados.....	86
<b>Tabela 3:</b> Descrição dos polimorfismos, localização do genoma, temperaturas de hibridação, enzimas de restrição e fragmentos gerados durante os ensaios. ....	87
<b>Tabela 4:</b> Sequências das sondas utilizadas na genotipagem por PCR em Tempo Real.....	88

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática do vírus da hepatite C e seus principais componentes. ....	59
<b>Figura 2:</b> Organização do genoma do vírus da hepatite C. As peptidases de sinal do hospedeiro clivam as proteínas do core, do envelope e p7. As proteínas não estruturais são processadas por proteases virais. ....	60
<b>Figura 3:</b> Prevalência da infecção pelo HCV e distribuição global dos genótipos. ....	62
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da partícula lipoviral (LVP) formada pela associação do HCV com a lipoproteína LDL ( <i>Low Density Lipoprotein</i> ). ....	64
<b>Figura 5:</b> Esquema do ciclo de replicação do HCV. ....	66
<b>Figura 6:</b> Estrutura esquemática da microanatomia do fígado. (A) Visão do lóbulo hepático. A tríade portal é formada pela veia porta, artéria hepática e o ducto biliar, que é formado pelas células epiteliais biliares (ou colangiócitos). (B) Dentro de cada lóbulo há uma série de sinusoides que são revestidos pelas células endoteliais sinusoidais (LSECs). As células de Kupffer residem nos sinusóides e as células estreladas hepáticas (HSC) estão localizadas no espaço Disse, entre os cordões de hepatócitos e os sinusoides. CV: Veia Central. ....	67
<b>Figura 7:</b> Eventos imunes envolvidos na ativação das células estreladas hepáticas (HSC) e desenvolvimento da fibrose. ....	71
<b>Figura 8:</b> Modelo de ativação das células estreladas hepáticas (HSC) pela citocina IL-1 $\beta$ . A ativação do inflamassoma NLRP3 em hepatócitos e células imunes resulta na produção das citocinas pró-inflamatória IL-1 $\beta$ e IL-18. A IL-1 $\beta$ ativa e mantém a sobrevivência das células estreladas hepáticas (HSC). ....	72
<b>Figura 9:</b> Representação dos componentes dos inflamassomas, demonstrando a organização estrutural dos seus domínios. ....	73
<b>Figura 10:</b> Esquema proposto para exemplificar a estrutura do complexo inflamassoma NLRP3 ativado. ....	75
<b>Figura 11:</b> Eventos celulares e vias de ativação do inflamassoma NLRP3. A ativação do NF- $\kappa$ B promove a transcrição de genes que codificam componentes do inflamassoma. Os DAMPs desencadeiam a ativação do inflamassoma NLRP3 causando a ruptura da membrana do lisossoma e liberação da catepsina B. Os DAMPs e PAMPs intracelulares podem causar a	

abertura do canal iônico panexina-1, permitindo a saída de ATP intracelular. O ATP extracelular ativa o P2X7R e induz o efluxo de potássio. O inflamassoma NLRP3 é ativado e promove a maturação da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18. .... 76

**Figura 12:** Mecanismo molecular de ativação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> por células dendríticas mieloides (mDCs). .... 78

**Figura 13:** Fórmula para calcular o valor de APRI. .... 84

**Figura 14:** Fórmula para calcular o valor de FIB4. .... 84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2 – Ausente no melanoma 2  
ALT – Alanina Aminotransferase  
AP-1 – Proteína ativadora 1  
APC – Célula Apresentadora de Antígeno  
APRI – *AST to Platelet Ratio Index*  
AST – Aspartato Aminotransferase  
ASC – *Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD*  
ATP – Adenosina trifosfato  
CARD – *Caspase activation and recruitment domain*  
CARD8 – *Caspase recruitment domain family member 8*  
CARDINAL – *CARD inhibitor of NF- $\kappa$ B-activating ligands*  
CDC – Centro de Controle e prevenção de Doenças  
CD – Célula Dendrítica  
CD81 – *Cluster of Differentiation 81*  
CLDN1 – Claudina-1  
CTL – Linfócito T Citotóxico  
CTSB – Catepsina B  
DAAs – Antivirais de Ação Direta  
DAMP – *Danger-associated Molecular Pattern*  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
E1 – Glicoproteína do envelope viral 1  
E2 – Glicoproteína do envelope viral 2  
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ECM – Matriz Extracelular  
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
FIB4 – Fibrosis-4  
FIIND – *function-to-find domain*  
FMT-HVD – Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado  
Foxp3 – *Forkhead Box P3*  
GAG – Glicosaminoglicanos  
HBV – Vírus da hepatite B  
HCV – Vírus da hepatite C  
HCC – Carcinoma Hepatocelular  
HEMOAM – Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas  
HIN200 – *hematopoietic interferon inducible nuclear antigen with 200 amino-acid repeat*  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA – Antígeno Leucocitário Humano  
HMGB1 – *High-Mobility-Group-Protein B1*  
HPV – Papiloma Vírus Humano  
HSC – Células Estreladas Hepáticas  
HSPG – Proteoglicanos de sulfato de heparan  
HTLV – Vírus linfotrópico de célula T humana  
HVR – Região hipervariável  
HWE - Equilíbrio de Hardy-Weinberg  
IC – Intervalo de Confiança  
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus  
ID SNP – Identificação do SNP  
IFN – Interferon

IFN- $\gamma$  – Interferon-gama  
IFI16 – *Interferon Gamma Inducible Protein 16*  
IL – Interleucina  
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
INR – Razão normalizada internacional  
IP-10 – Proteína 10 induzida por interferon-gama  
IRF – Fator regulador de interferon  
IRES – *Internal Ribosome Entry Site*  
ISG – Genes estimulados por interferons  
JAK-STAT – JAK (cinase Janus), STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição)  
Kb – Kilo Base  
LD – Gotículas de lipídios/ *Lipid Droplet*  
LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade  
LDLR – Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade  
LRR – Repetições Ricas em Leucinas.  
LSEC – Células Endoteliais Sinusoidais do Fígado  
LVP – Partícula Lipoviral  
MAF – Frequência do Alelo Menor  
MAVS – Proteína de Sinalização Antiviral Mitocondrial.  
MDA5 – Proteína 5 associada à diferenciação do melanoma.  
mDC – Célula Dendrítica Mieloide  
METAVIR – *Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis*  
MIP-1 $\alpha$  – Proteína Inflamatória de Macrófagos 1-alfa  
MIP-1 $\beta$  – Proteína Inflamatória de Macrófagos 1-beta  
MMP – Metaloproteinases de Matriz Extracelular  
NAT – Teste de ácido nucleico  
NACHT – *Domain present in Naip, CIITA, HET-E (plant het product involved in vegetative incompatibility) and TP-1 (telomerase associated protein)*  
NF-kB – Fator nuclear kappa B  
NK – *Natural Killer*  
NK T – *Natural Killer T*  
NLR – Receptor do tipo NOD  
NLRC4 – *NLR family CARD domain-containing protein 4-like*  
NLRP1 – *NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins 1*  
NLRP3 – *NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins 3*  
NOD – *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*  
NPC1L1 – Receptor de absorção de colesterol Niemann-Pick C1-like 1  
NS – Não estrutural  
NTR – Região Não Traduzida, do inglês *Non-Translated Regions*  
NTPase – Nucleosil Trifosfato Hidrolase  
OCLN – Ocludina  
OR – Odds Ratio  
ORF – Quadro aberto de leitura, do inglês *Open Reading Frame*  
PAMPs – Padrões Moleculares Associados aos Patógenos  
Pb – Pares de bases  
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase  
PDL-1 – Ligante da Proteína de Morte celular Programada 1  
PYD – *Pyrin domain*  
PYHIN – *Pyrin and HIN-domain containing protein*  
PRRs – Receptores de Reconhecimento Padrão

P2X7R – Receptor purinérgico P2X7  
RANTES – *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*  
RE – Retículo endoplasmático  
RIG-I – Gene-I induzível pelo ácido retinóico  
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*  
RdRp – RNA dependente de RNA Polimerase  
RDW – Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos  
RNA – Ácido ribonucleico  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
RVS – Resposta virológica sustentada  
SCARB1 – Receptor *Scavenger* classe B tipo I  
SNP – *Single nucleotide polymorphism*  
SR-BI – Receptor *Scavenger* classe B tipo I  
SUS – Sistema Único de Saúde  
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCR – Receptor de célula T  
TGF- $\beta$  – Fator de Crescimento Transformador-beta  
Th0 – Células T *helper* (CD4<sup>+</sup>) naïve  
Th1 – Células T *helper* (CD4<sup>+</sup>) polarizadas para o perfil 1  
Th2 – Células T *helper* (CD4<sup>+</sup>) polarizadas para o perfil 2  
TIMP – Inibidores teciduais de metaloproteinases  
TLR – Receptor do Tipo *Toll*  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral-alfa  
TRIF – *TIR-containing adaptor inducing IFN (interferon)- $\beta$*   
TRIM – *Tripartite motif proteins*  
TUCAN – *Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine*  
UFAM – Universidade Federal do Amazonas  
VLDL – *Very-low-density lipoproteins*  
VDRL – *Venereal Disease Research Laboratory*  
WHO – *World Health Organization*  
 $\mu$ L – Microlitro  
3D – Associação dos fármacos ombitasvir, veruprevir/ritonavir e dasabuvir

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>1. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>59</b>
1.1 Aspectos gerais do vírus da hepatite C.....	59
1.2 Epidemiologia da hepatite C e genótipos virais .....	61
1.3 Aspectos clínicos da hepatite C.....	63
1.4 Imunopatogênese da infecção pelo HCV .....	64
1.4.1 Ciclo de replicação do HCV.....	64
1.4.2 Resposta imune inata ao HCV.....	66
1.4.3 Resposta imune Adaptativa.....	77
1.4.5 Fatores imunogenéticos do hospedeiro relacionados aos inflamassomas .....	79
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>81</b>
Objetivo geral.....	81
Objetivos específicos.....	81
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>82</b>
3.1 Tipo de estudo.....	82
3.2 Área de estudo.....	82
3.3 População de estudo .....	82
3.4 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão.....	82
3.5 Estadiamento da doença hepática.....	83
3.6 Aspectos éticos .....	85
3.7 Coleta de amostras .....	85
3.8 Extração de DNA .....	85
3.9 Genotipagem dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 .....	86
3.9.1 Genotipagem de polimorfismo nos genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 por PCR-RFLP. ....	86
3.9.2 Genotipagem dos polimorfismos nos genes do inflamassoma NLRP3, CTSB, CARD8 e AIM2 por PCR em Tempo Real.....	88
3.10 Dosagem de Citocina por ELISA Sanduíche .....	88
3.11 Análises estatísticas.....	89
<b>ARTIGO PUBLICADO:.....</b>	<b>91</b>
<b>EQUIPE DO PROJETO .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>123</b>





## INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença inflamatória no fígado causada pelo vírus da hepatite C (HCV), considerada um importante problema de saúde pública. Entre os indivíduos infectados, 70% a 85% apresentam a forma crônica da doença e podem desenvolver fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (CDC, 2015; WHO, 2016a).

Durante a infecção pelo HCV, diversos mecanismos protetores do sistema imune são ativados induzindo respostas antivirais e inflamatórias para conter a replicação viral, com produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$  e IL-18 (HORNER; GALE, 2013). A IL-1 $\beta$  estimula a ativação do fator de transcrição NF-kB e a expressão de diversos genes da resposta imune, amplificando o processo inflamatório (SIMS; SMITH, 2010). A IL-18 induz a produção de IFN- $\gamma$ , estimulando a ativação dos macrófagos inflamatórios, linfócitos Th1 e linfócitos T citotóxicos (MANCINI; BENEDETTI; JEZEQUEL, 1994; SERTI et al., 2014; SZABO; CSAK, 2012). No entanto, o HCV pode evadir, parcialmente, das respostas imunes e causar uma inflamação crônica, com danos teciduais progressivos e, conseqüentemente, pode levar ao desenvolvimento de doenças hepáticas (KANTO; HAYASHI, 2006).

Em decorrência da resposta inflamatória persistente, os mecanismos imunorreguladores do hospedeiro são ativados e estimulam a produção das citocinas regulatórias TGF- $\beta$  e IL-10. No entanto, o TGF- $\beta$ 1 é um potente ativador da transdiferenciação das células estreladas hepáticas (HSCs) em miofibroblastos que estimulam os mecanismos da fibrose hepática (FIBBI et al., 2001; IWASAKO et al., 2014; KAJDANIUK et al., 2013; PUCHE; SAIMAN; FRIEDMAN, 2013; TSUKADA et al., 2005; WELLS; KRUGLOV; DRANOFF, 2004). A citocina IL-1 $\beta$  também é capaz de estimular a fibrose através da ativação das células HSCs, as quais produzem componentes da matriz extracelular e contribuem ativamente para o desenvolvimento e manutenção da fibrose no fígado (PRADERE et al., 2013).

A produção das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 em suas formas bioativas requer a formação de complexos moleculares chamados de inflamassomas (LAMKANFI; DIXIT, 2014). A produção exacerbada dessas citocinas contribui para a ocorrência de danos teciduais e tem sido associada com doenças autoinflamatórias (GARLANDA; DINARELLO; MANTOVANI, 2013).

Visto que a hepatite é uma doença inflamatória no fígado, alterações de ganho ou perda de função de genes relacionados com os inflamassomas podem influenciar na história natural dessa doença. Embora ainda não esteja claro como esses fatores imunogenéticos influenciam na dinâmica das infecções pelo HCV, diversos trabalhos têm sido publicados mostrando que polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) em genes do sistema imunológico estão associados com a predisposição para diferentes desfechos em algumas doenças, como citado no decorrer deste trabalho (BATALLER; NORTH; BRENNER, 2003; GE et al., 2009; POWELL et al., 2000; SCHUPPAN et al., 2003; YUAN et al., 2012).

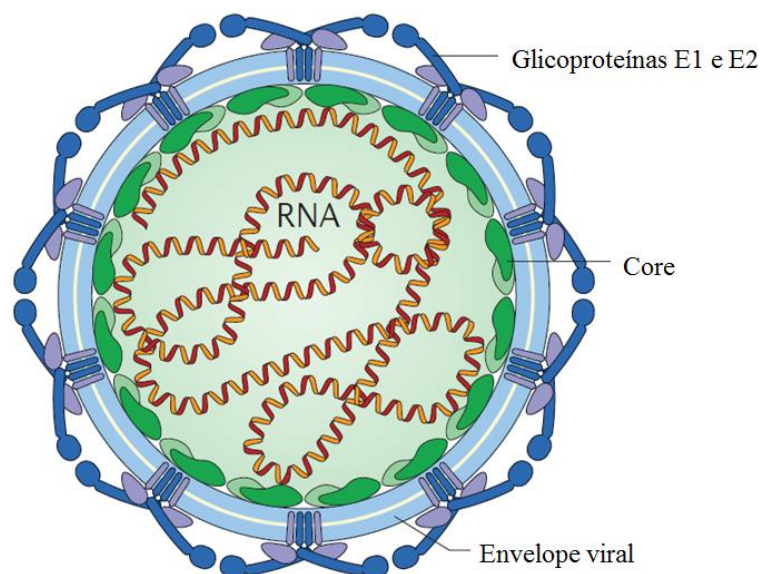
Além disso, os SNPs podem atuar como relevantes biomarcadores para o prognóstico de diversas doenças, como observado para o genótipo C/C do gene da citocina IL28B, que está associado à eliminação viral espontânea, após infecção aguda pelo HCV (MANTHIRAM et al., 2017; SHARMA; JORDAN, 2014; SHEN et al., 2015). Não obstante, estudos imunogenéticos relacionados aos diferentes componentes dos inflamassomas ainda são escassos e novos trabalhos precisam ser desenvolvidos no intuito de sugerir mecanismos envolvidos na resposta imune contra um mesmo estímulo. Neste contexto, achamos importante compreender se a presença dos polimorfismos em genes relacionados aos componentes dos inflamassomas, como NLRP3, AIM2, CARD8, CTSB, IL-1 $\beta$  e IL-18, podem contribuir com o processo inflamatório e se estão envolvidos no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática.

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 Aspectos gerais do vírus da hepatite C

A hepatite C, inicialmente chamada de hepatite não-A, não-B, foi descrita por Choo et al., (1989). O vírus da hepatite C pertence à família *Flaviviridae*, ao gênero *Hepacivirus* e está incluso no grupo IV pela classificação de Baltimore (ICTV, 2016; SIMMONDS, 2004). O HCV apresenta morfologia esférica, sendo envelopado por uma bicamada lipídica, proveniente do retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira (**Figura 1**). A partícula viral possui de 40-80nm de tamanho (CALATTINI et al., 2015; GASTAMINZA; KAPADIA; CHISARI, 2006).

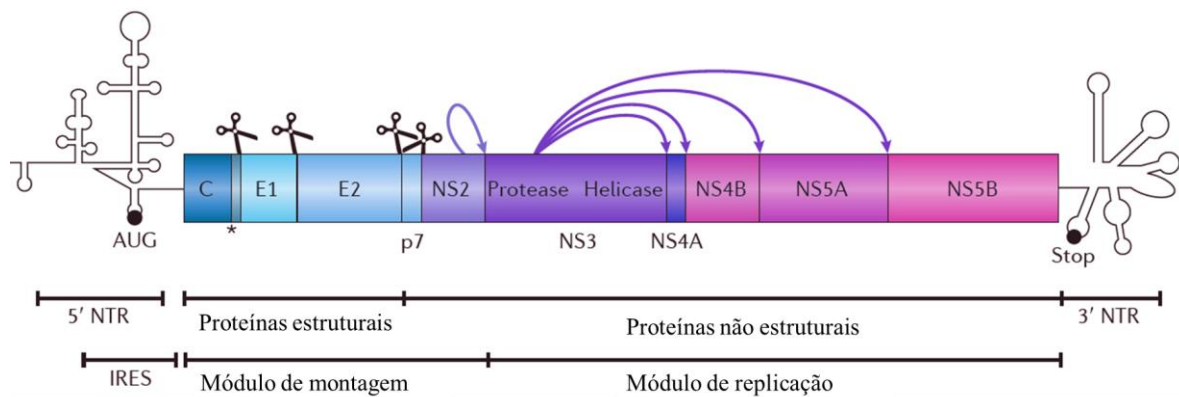
O HCV possui RNA de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 9600pb. Seu genoma contém uma única região aberta de leitura (ORF – *Open Reading Frame*), flanqueada por regiões 5' e 3' não traduzidas (NTR - *Non-Translated Regions*). A região 5' NTR contém um sítio interno de entrada de ribossomo (IRES-*Internal Ribosomal Entry Site*), onde inicia-se a tradução do RNA viral (HOFFMAN; LIU, 2011). Após a entrada do vírus, ocorre a formação de uma única poliproteína, que é processada e clivada por proteases celulares e virais. Esta clivagem dá origem às proteínas estruturais do Core (C) e do envelope (E1 e E2), a p7 e as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (**Figura 2**) (BARTENSCHLAGER et al., 2011; CHEVALIEZ; PAWLOTSKY, 2006).



**Figura 1:** Representação esquemática do vírus da hepatite C e seus principais componentes.

**Fonte:** (LINDENBACH; RICE, 2013).

As proteínas estruturais estão localizadas na extremidade N-terminal da poliproteína, e as proteínas não estruturais são encontradas na extremidade C-terminal. A proteína do core (C), as glicoproteínas do envelope (E1 e E2), a proteína p7 e a NS2 formam o módulo de montagem do HCV. Enquanto as proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B formam o módulo de replicação (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013). As junções entre as proteínas do core, E1, E2, p7 e NS2 são clivadas por peptidases de sinal do hospedeiro. As demais proteínas não estruturais são processadas pela protease viral NS3/4A (**Figura 2**) (LEMBERG; MARTOGLIO, 2002; OKAMOTO et al., 2004). A proteína NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), responsável por sintetizar as novas moléculas de RNA viral durante o processo de replicação do HCV (KARAM et al., 2014).



**Figura 2:** Organização do genoma do vírus da hepatite C. As peptidases de sinal do hospedeiro clivam as proteínas do core, do envelope e p7. As proteínas não estruturais são processadas por proteases virais.  
**Fonte:** (BARTENSCHLAGER; LOHMANN; PENIN, 2013).

O HCV é transmitido principalmente pela via parenteral, por transfusão de sangue e hemocomponentes contaminados, (principalmente antes da década de 1990, quando os Bancos de Sangue não realizavam a triagem para o HCV), hemodiálise, acidentes ocupacionais entre profissionais da saúde, uso comum de objetos de higiene pessoal e reutilização de objetos perfurocortantes, como descrito entre usuários de drogas ilícitas injetáveis (MANNIS et al., 2017). A transmissão vertical é a principal fonte de infecção em crianças, com a transmissão perinatal estimada em 40% - 50% dos casos, enquanto que a transmissão pós-parto é rara (FLOREANI, 2013; TOVO et al., 2016). A transmissão sexual do HCV é descrita, sobretudo, em indivíduos com múltiplos parceiros e práticas sexuais de risco, como sexo sem proteção (BRADSHAW; MATTHEWS; DANTA, 2013; DODGE; TERRAULT, 2014; TENGAN et al., 2001; TERRAULT et al., 2013; TOHME; HOLMBERG, 2010; VAN DE LAAR et al., 2010).

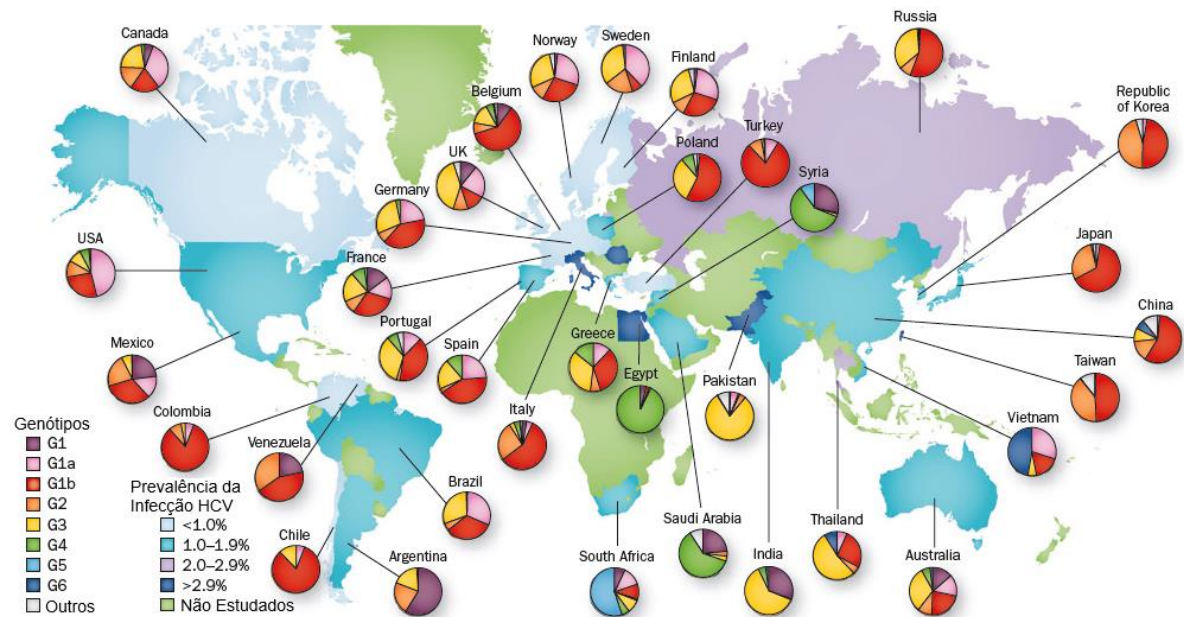
O diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da hepatite C pode ser feito por testes rápidos e ensaios imunoenzimáticos para detecção do anti-HCV. A confirmação do diagnóstico, mensuração da carga viral e a genotipagem é realizada por técnicas moleculares. Mas como as infecções agudas são geralmente assintomáticas, o diagnóstico da hepatite C ocorre de forma tardia ou eventualmente, após exames de rotina ou triagem sorológica do anti-HCV em bancos de sangue (BRASIL, 2017).

## 1.2 Epidemiologia da hepatite C e genótipos virais

Globalmente, calcula-se que 71 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com o HCV (WHO, 2017). Aproximadamente, 700.000 pessoas morrem a cada ano de complicações relacionadas ao HCV, que incluem cirrose, carcinoma hepatocelular e insuficiência hepática (WHO, 2016a). Os óbitos atribuídos à hepatite C na ausência do carcinoma hepatocelular aumentaram de 33,8%, em 1990, para 48,4% em 2015 (STANAWAY et al., 2016).

O HCV apresenta uma distribuição global heterogênea com taxas de prevalências acima de 2,9% observadas em países da Europa, Ásia, Norte da África e Oriente Médio. Nos países do Sul e Sudeste Asiático, Europa Central e Oriental, a prevalência varia entre 2,0% a 2,9%. As menores prevalências (abaixo de 2%) foram reportadas na América do Norte, Austrália e América Latina (**Figura 3**) (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013).

Devido à baixa fidelidade da enzima RNA-polimerase-dependente de RNA, o HCV apresenta altas taxas de variabilidade genética resultando em uma classificação de 7 genótipos e mais de 50 subtipos virais, os quais apresentam diferenças na sua distribuição, sendo o genótipo 1 o mais frequente (46%), seguido pelo genótipo 3 (30%), genótipo 2 (13%), genótipo 4 (13%), genótipo 5 (1%) e genótipo 6 (6%) (GOWER et al., 2014; MCGARVEY; HOUGHTON, 2005; MESSINA et al., 2015; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007; MURPHY et al., 2015; SMITH et al., 2014).



**Figura 3:** Prevalência da infecção pelo HCV e distribuição global dos genótipos.  
**Fonte:** (HAJARIZADEH; GREBELY; DORE, 2013).

Ao se observar os números absolutos de indivíduos infectados, as maiores prevalências foram descritas na China (9.795 milhões), Paquistão (7.172 milhões), Índia (6.245 milhões), Egito (5.625 milhões), Rússia (4.748 milhões), Estados Unidos (2.937 milhões), Nigéria (2.553 milhões), Brasil (1.787 milhões), Uzbequistão (1.292 milhões), Indonésia (1.289 milhões), Vietnã (1.066 milhões), Japão (857 mil), Itália (680 mil), Etiópia (647 mil), Filipinas (614 mil), Síria (554 mil), Romênia (547 mil), México (532 mil), Cazaquistão (508 mil), Turquia (492 mil), Taiwan (489 mil), Tailândia (463 mil), Colômbia (409 mil), Gana (399 mil), Argélia (388 mil) e Espanha (386 mil) (THE POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS, 2017).

No Brasil, foram notificados 319.751 casos de hepatite C no período de 1996 a 2016, com anti-HCV ou HCV-RNA reagentes. Dentre esses, 155.032 casos são positivos para os dois marcadores (anti-HCV e HCV-RNA), com as seguintes prevalências observadas: 64,1% no Sudeste, 24,5% no Sul, 5,5% no Nordeste, 3,3% no Centro-Oeste e 2,5% no Norte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A distribuição dos dados epidemiológicos no Brasil pode variar conforme a população estudada e suas características demográficas, culturais e socioeconômicas (PEREIRA et al., 2013). Na população de detentos brasileiros, a prevalência do HCV foi estimada em 13,6% (MAGRI et al., 2015). Em contraste, um estudo realizado em uma universidade do Rio de Janeiro, em uma população composta por estudantes universitários,

funcionários e visitantes (n= 2.936) descreveu 0,44% de prevalência para o anti-HCV. Entre os participantes, 81,1% tinham pelo menos 12 anos de escolaridade (PINTO et al., 2015). Em doadores de sangue, a prevalência foi estimada em 0,62% na Região do Norte, seguida pela região Nordeste (0,55%), Sul (0,46%), Sudeste (0,43%), e Centro-Oeste (0,28%) (KRETZER et al., 2014).

Quanto à distribuição dos genótipos na população brasileira, são observadas as seguintes prevalências: genótipo 1 (64,9%), genótipo 3 (30,2%), genótipo 2 (4,6%), genótipo 4 (0,2%) e genótipo 5 (0,1%) (CAMPIOTTO et al., 2005). Na Região Norte, o genótipo 1 é o mais frequente, seguido pelos genótipos 3 e 2, respectivamente (ARAÚJO et al., 2011; CAMPIOTTO et al., 2005; TORRES et al., 2009). Em 2017, foi relatado a presença do genótipo 4 no estado do Amazonas (TARRAGÔ et al., 2017).

### **1.3 Aspectos clínicos da hepatite C**

A hepatite C pode apresentar-se de forma aguda e crônica, variando entre uma doença leve de curto prazo, até uma doença grave que se estende ao longo da vida (CDC, 2015). A hepatite C aguda é geralmente assintomática ou apresenta sintomas inespecíficos e cerca de 15% a 30% dos indivíduos infectados eliminam o vírus (*clearance viral*) espontaneamente dentro de até 6 meses. No entanto, 70% a 85% dos casos evoluem para a hepatite C crônica (CDC, 2015; PRECIADO et al., 2014).

Segundo o Ministério da Saúde, a hepatite C aguda é definida conforme os seguintes critérios: Soroconversão há menos de seis meses, anti-HCV não reagente no início dos sintomas ou no momento da exposição, anti-HCV reagente na segunda avaliação realizada com intervalo de 90 dias; ou então, anti-HCV não reagente e detecção do RNA viral em até 90 dias após o início dos sintomas ou a partir da data de exposição, quando esta for conhecida (BRASIL, 2017). O estabelecimento da infecção crônica é definido na presença do anti-HCV reagente, em conjunto com a detecção do RNA viral por mais de 6 meses (BRASIL, 2017; EASL, 2017).

A hepatite C crônica pode levar ao desenvolvimento de fibrose hepática, com progressão para cirrose e descompensação hepática (MINCIS, 2008). As estimativas indicam que 10% a 30% dos indivíduos acometidos com a forma crônica da doença apresentam graus de fibrose mais avançados (WHO, 2016b). Enquanto que, o carcinoma hepatocelular pode ocorrer em 4% a 5% dos pacientes com cirrose infectados com o HCV (EL-SERAG, 2012).

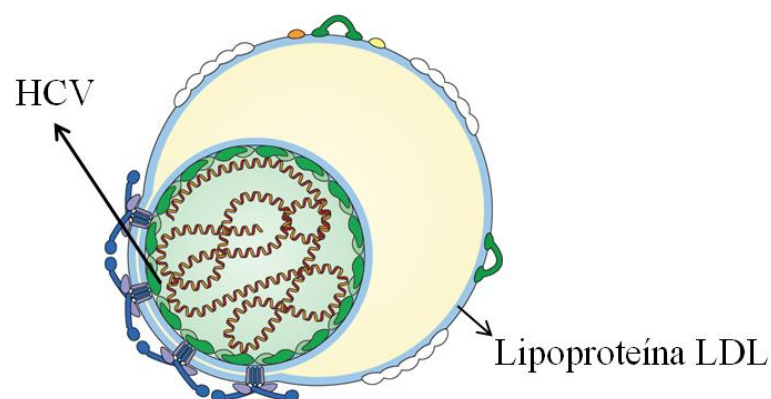


No Brasil, a terapia preconizada pelo Ministério da Saúde é baseada no uso dos Antivirais de Ação Direta (DAAs), que atuam diretamente nas proteínas não estruturais do HCV para interromper a replicação viral. O Sistema Único de Saúde (SUS) dispõe dos seguintes fármacos para o tratamento da hepatite C crônica: daclatasvir (inibidor do complexo enzimático NS5A); simeprevir (inibidor de protease NS3/NS4A); e sofosbuvir (análogo de nucleotídeo que inibe a polimerase NS5B do HCV). Também está disponível no SUS a associação dos fármacos ombitasvir (inibidor de NS5A), dasabuvir (inibidor não nucleosídico da polimerase NS5B), veruprevir (inibidor de protease NS3/4A) e ritonavir 3D (potencializador farmacocinético). Com o tratamento, espera-se obter uma resposta virológica sustentada (RVS), definida quando o RNA viral torna-se indetectável por 12 ou 24 semanas após a conclusão da terapia com os DAAs (BRASIL, 2017; EASL, 2017).

## 1.4 Imunopatogênese da infecção pelo HCV

### 1.4.1 Ciclo de replicação do HCV

O vírus da hepatite C possui tropismo por células hepáticas e sua replicação ocorre principalmente nos hepatócitos. O HCV associa-se com a lipoproteína LDL (*Low Density Lipoprotein*) do hospedeiro e forma uma partícula lipoviral (LVP - *Lipoviral Particles*) (Figura 4) (AGNELLO et al., 1999; ANDRÉ et al., 2002; GRASSI et al., 2016; NIELSEN et al., 2008). Diversos receptores presentes nas células hepáticas, que atuam no metabolismo das lipoproteínas, reconhecem a partícula lipoviral (LVP) e facilitam a adesão do HCV aos hepatócitos. Essas características têm sido relacionadas com o tropismo do HCV pelos hepatócitos (BARTOSCH et al., 2005; GRASSI et al., 2016; LINDENBACH; RICE, 2013).



**Figura 4:** Representação esquemática da partícula lipoviral (LVP) formada pela associação do HCV com a lipoproteína LDL (*Low Density Lipoprotein*).

Fonte: (LINDENBACH; RICE, 2013).

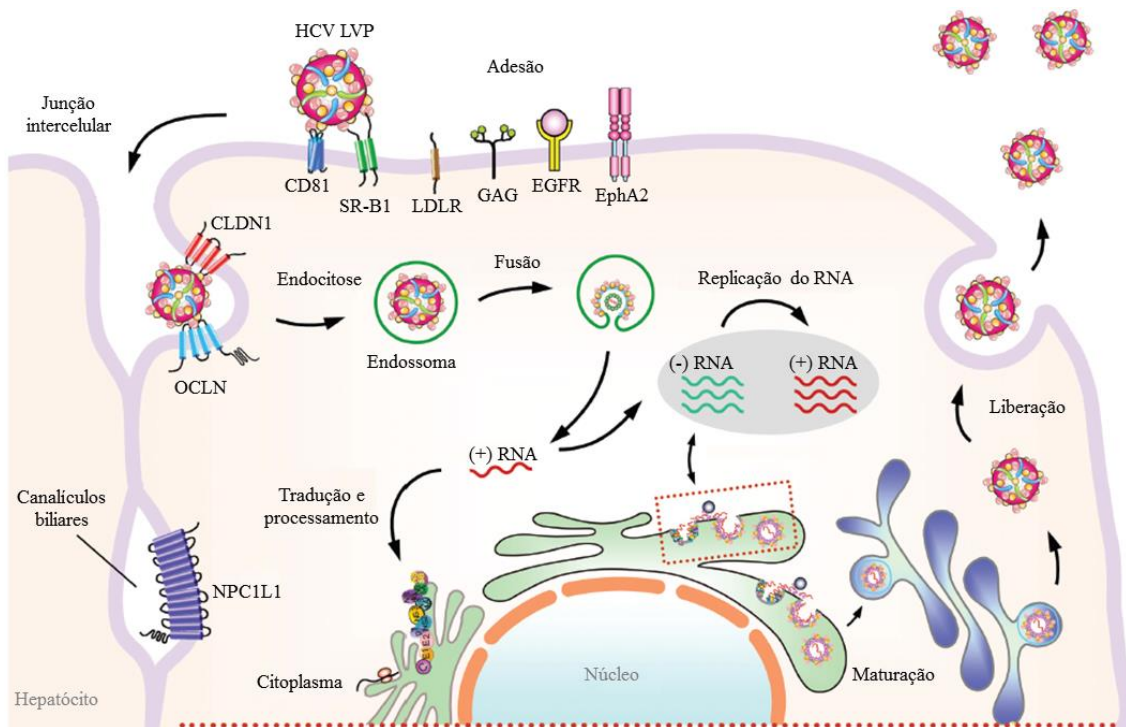
A adesão dos vírions à superfície dos hepatócitos é iniciada por interações de baixa afinidade entre as lipoproteínas associadas ao HCV com os receptores Glicosaminoglicanos (GAGs), presentes em proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPGs); Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLR) e Receptor *Scavenger* classe B tipo I (SR-BI ou SCARB1). Após a adesão, o HCV entra na célula por endocitose mediada pelos seguintes receptores celulares: CD81, SR-BI, moléculas da junção de oclusão Claudina-1 (CLDN1), Ocludina (OCLN) e Receptor de absorção de colesterol Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (GERMI et al., 2002; GRASSI et al., 2016; LINDENBACH; RICE, 2013).

A glicoproteína E2, do envelope viral, está envolvida na adesão e entrada do HCV nos hepatócitos, por meio de interações com os receptores SRB1 e CD81 (BANKWITZ et al., 2010; SCARSELLI et al., 2002). O receptor SRB1 se liga nas lipoproteínas associadas ao HCV, e, assim facilita a exposição dos sítios de ligação da glicoproteína viral E2, desta forma, auxilia na transferência da partícula viral para o receptor celular CD81 (BARTOSCH et al., 2005; DING; SCHAEWEN; PLOSS, 2014).

A interação entre E2 e o receptor CD81 promove o movimento dos complexos HCV-CD81 para a lateral dos hepatócitos, permitindo a interação do HCV com a proteína Claudina-1 (CLDN1) e entrada do vírus na célula. A internalização da partícula viral ocorre em poços revestidos por clatrin. Após a internalização, o pH ácido no endossoma desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando o RNA viral no citoplasma da célula (BRAZZOLI et al., 2008; DOUAM; LAVILLETTE; COSSET, 2015; LINDENBACH; RICE, 2013). A replicação do genoma viral ocorre em redes membranosas, próximas do retículo endoplasmático (RE), em um complexo que inclui fatores do hospedeiro e proteínas virais. A polimerase viral NS5B faz a síntese do RNA de cadeia negativa, formando o dsRNA, que por sua vez, é usado como molde para a síntese das fitas simples de RNA de cadeia positiva, ssRNA(+), que é traduzido no RE rugoso (KREKULOVA; REHAK; RILEY, 2006; MORADPOUR; PENIN; RICE, 2007).

A montagem da partícula viral é iniciada pelo recrutamento da proteína do Core, da superfície do retículo endoplasmático, para as gotículas de lipídios (LD - *Lipid Droplet*) da célula hospedeira (BOULANT et al., 2006; EL-HAGE; LUO, 2003; MCLAUCHLAN et al., 2002). As proteínas do Core e NS5A recrutam o complexo de replicação viral para as LDs, onde ocorre a formação do nucleocapsídeo (APPEL et al., 2008; MIYANARI et al., 2007). No lúmen do RE, o envelope lipídico é incorporado à partícula viral e as glicoproteínas virais E1 e E2 são inseridas. Em seguida, as partículas virais associam-se com lipoproteínas do

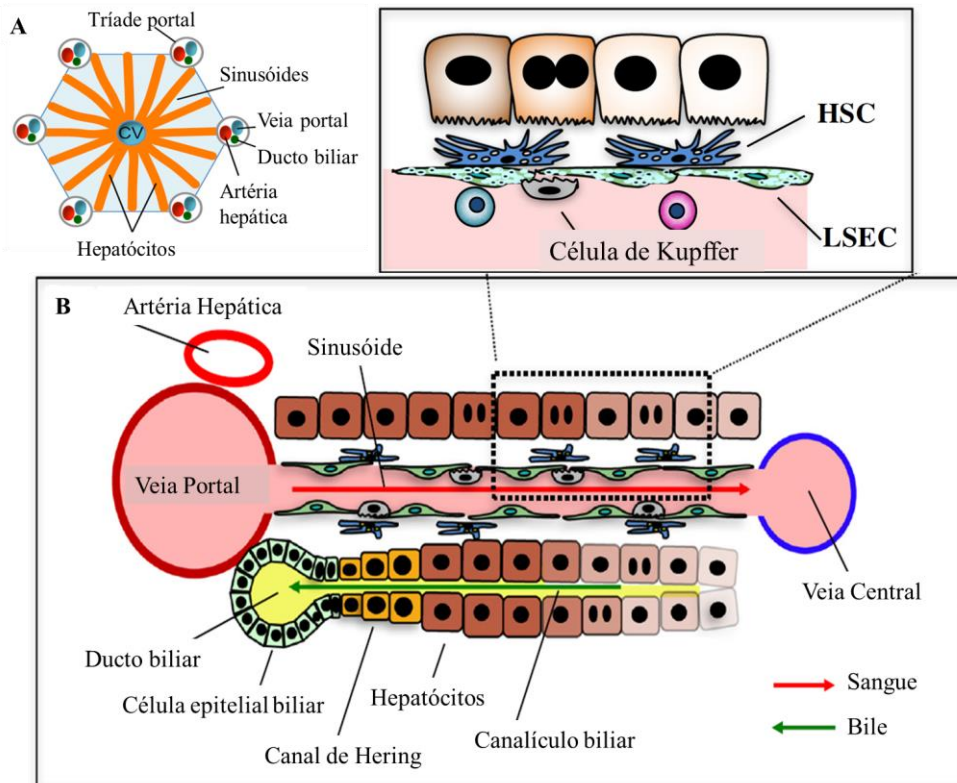
hospedeiro, formando a partícula lipoviral (LVP), que finalmente é liberada da célula pela via de secreção de lipoproteínas ou pela via secretora endossomal (**Figura 5**) (LINDENBACH; RICE, 2013).



**Figura 5:** Esquema do ciclo de replicação do HCV.  
**Fonte:** (WONG; CHEN, 2016).

#### 1.4.2 Resposta imune inata ao HCV

O fígado é um órgão altamente vascularizado, com fluxo sanguíneo lento e endotélio fenestrado, revestido por células endoteliais sinusoidais (LSEC). As células de Kupffer são macrófagos residentes nos sinusóides hepáticos. Em homeostase, as células estreladas hepáticas (HSC), localizadas no espaço Disse, em estado quiescente representam 5-8% do número total de células hepáticas humanas. Realizam o armazenamento de vitamina A e controlam a renovação da matriz extracelular (**Figura 6**) (GEERTS, 2001; GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015; HEYMANN; TACKE, 2016; TANAKA; MIYAJIMA, 2016).



**Figura 6:** Estrutura esquemática da microanatomia do fígado. (A) Visão do lóbulo hepático. A triade portal é formada pela veia porta, artéria hepática e o ducto biliar, que é formado pelas células epiteliais biliares (ou colangiócitos). (B) Dentro de cada lóbulo há uma série de sinusoides que são revestidos pelas células endoteliais sinusoidais (LSECs). As células de Kupffer residem nos sinusóides e as células estreladas hepáticas (HSC) estão localizadas no espaço Disse, entre os cordões de hepatócitos e os sinusoides. CV: Veia Central.

**Fonte:** Adaptado de (GORDILLO; EVANS; GOUON-EVANS, 2015; TANAKA; MIYAJIMA, 2016).

Durante a infecção pelo HCV, os hepatócitos, as células endoteliais, os macrófagos residentes no fígado e as células dendríticas reconhecem uma variedade de PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Pattern*) e DAMPs (*Danger-associated Molecular Pattern*), por seus receptores de reconhecimento de padrão (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) e ativam os mecanismos protetores da resposta imune para inibir a replicação viral (HORNER; GALE, 2013).

Ao infectar os hepatócitos, o HCV ativa as defesas antivirais inatas através da indução de IFNs tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), que estimulam a expressão de diversos ISGs (genes estimulados por interferons) e promovem um estado antiviral nas células infectadas e adjacentes para limitar a disseminação viral. (METZ et al., 2013; WIELAND et al., 2014). Diversas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias também são produzidas pelos hepatócitos em resposta ao HCV, como IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, TNF- $\alpha$ , RANTES (CCL5), MIP-1 $\alpha$  (CCL3),

MIP-1 $\beta$  (CCL4), IP-10 (CXCL10) para ativar e recrutar células imunes (LI et al., 2012; NISHITSUJI et al., 2013).

As proteínas do Core e a NS3 do HCV são reconhecidas pelo receptor TLR-2 associado com TLR-1/TLR-6, enquanto a proteína viral NS5A pode ser reconhecida pelo receptor TLR-4 (CHANG; DOLGANIUC; SZABO, 2007; MACHIDA et al., 2006; SATO K et al., 2007). Nos compartimentos endossomais, o receptor TLR-3 detecta a molécula de dsRNA (*double stranded RNA*), enquanto TLR-7 e TLR-8 reconhecem o ssRNA (*single stranded RNA*) (HORNER; GALE, 2013). No citoplasma, os receptores RIG-I (*Retinoic acid-inducible gene 1*) e MDA5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) representam os RLRs (RLRs - *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors*) melhor caracterizados e também reconhecem o ssRNA (*single stranded RNA*) do HCV, (ARNAUD et al., 2011; CAO et al., 2015; SCHNELL et al., 2012).

Após o reconhecimento dos PAMPs e DAMPs, os receptores de reconhecimento de padrão - PRRs induzem vias de sinalização intracelular que levam à ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, IRF3 e IRF7. Esses fatores de transcrição estimulam a expressão de diversos genes inflamatórios e a produção de IFNs tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, tais como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12, CCL2, CCL5, CXCL-8, além do aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e moléculas de adesão endotelial (HERTER; ZARBOCK, 2013; HORNER; GALE, 2013; KAWAI et al., 2004; SHI et al., 2017; TAKAHASHI et al., 2010; THOMAS et al., 2012).

Em relação as citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, sua maturação e liberação em suas formas bioativas, requer a participação de complexos moleculares chamados de inflamassomas. Esses complexos recrutam e ativam caspases pró-inflamatórias, responsáveis pelo processamento e maturação dessas duas citocinas (BURDETTE et al., 2012; KAYAGAKI et al., 2011; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002; SERTI et al., 2014).

O inflamassoma AIM2, pode atuar no reconhecimentos do genoma viral, durante a fase de replicação viral no citosol dos hepatócitos, e desta forma, ativar a caspase-1 e a consequente liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18 (CHEN et al., 2018; YOGARAJAH et al., 2017; ZHANG et al., 2017). A proteína viral p7, capaz de formar poros na membrana e induzir o efluxo de potássio, responsável pela ativação do inflamassoma NLRP3 e, conseqüentemente, produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (NEGASH et al., 2013).

Os macrófagos residentes são fagócitos ávidos e em resposta a infecção produzem mais citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-18, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, CCL2, CCL5 e CXCL16, as quais ativam e recrutam outras células imunes para o local da infecção (BOLTJES et al., 2014; LUEDDE; SCHWABE, 2011; VAROL; MILDNER; JUNG, 2015; WEHR et al., 2013). Já as células dendríticas plasmocitoides (pDCs) são uma fonte importante de IFNs tipo I e tipo III em respostas a infecções virais. Os IFN tipo III apresentam atividades anti-proliferativas e são importantes para estimular a resposta antiviral das células NK (*Natural Killer*). Seus três membros:  $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$  e  $\lambda 3$ , também são conhecidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente (YIN et al., 2012).

As células NK induzem a morte dos hepatócitos infectados por liberação de perforinas e granzimas presentes em seus grânulos citotóxicos. A ativação dessas células é regulada pelas citocinas IL-12, IL-18, IFNs tipo I e por seus receptores de ativação (NKG2D, NKG2C, NKp30, NKp44 e NKp46) e de inibição (KIRs, NKG2A e KLRG1). Quando ativadas, as células NK são uma fonte importante de IFN- $\gamma$ , que é uma citocina essencial na resposta imune por potencializar a ativação de macrófagos inflamatórios, assim como estimular o desenvolvimento dos linfócitos Th1 da imunidade adaptativa, (GATTONI et al., 2006; LEE; MIYAGI; BIRON, 2007; REHERMANN, 2015; WU et al., 2014; ZHANG et al., 2013).

Em relação a consequência da ativação dos inflamassomas para as células NK, foi descrito que a IL-18 tem um potencial maior na estimulação das células NK, em relação aos IFNs tipo I (SERTI et al., 2014). Além disso, a IL-18 aumenta a expressão de Fas ligante (FasL) na superfície de células NK, levando a morte por apoptose de células infectadas que expressam o receptor de morte Fas (CD95) (BACHMANN; PFEILSCHIFTER; MÜHL, 2018; FELICES et al., 2014; STRASSER; JOST; NAGATA, 2009; TRAMBAS; GRIFFITHS, 2003; TSUTSUI et al., 1996; ZHANG et al., 2011).

A apoptose dos hepatócitos é um evento comum na lesão hepática e os corpos apoptóticos contendo moléculas do HCV são internalizados por fagócitos do sistema imune, proporcionando a detecção dos componentes virais e ativação dessas células (CANBAY et al., 2003; RIBEIRO et al., 2004). As células hepáticas danificadas ou em processo de morte celular liberam diversos DAMPs, como as proteínas nucleares HMGB1 (*High mobility group box 1*) que são reconhecidas por TLR-2 e TLR-4 e induzem a liberação de TNF- $\alpha$  e ativação de NF- $\kappa$ B, amplificando a resposta inflamatória. Além disso, a proteína nuclear HMGB1 também pode induzir a ativação do inflamassoma NLRP3 (ARSHAD; PIQUET-PELLORCE;

SAMSON, 2012; KIM; KIM, 2013; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; TACKE; ZIMMERMANN, 2014).

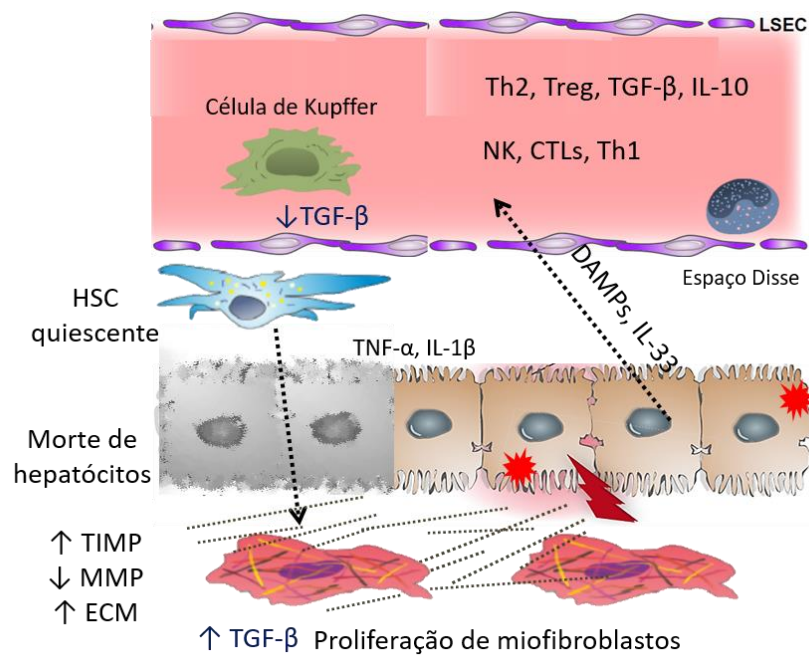
Contudo, durante a infecção, o HCV interfere em vias de sinalização do sistema imunológico e pode reduzir os mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro. A protease viral NS3-NS4A cliva as proteínas adaptadoras MAVS (proteína de sinalização antiviral mitocondrial) e TRIF (*TIR-containing adaptor inducing IFN (interferon)- $\beta$* ), reduzindo a sinalização pelos receptores RIG-I e TLR-3. Além disso, as proteínas do Core, E2 e NS5A reduzem a produção de IFNs ao inibir a via de sinalização JAK-STAT (JAK: janus cinase-STAT: transdutor de sinal e ativador de transcrição) (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; FOY et al., 2005; HORNER; GALE, 2013; KANTO; HAYASHI, 2006).

Ademais, foi descrito que a NS5A estimula a produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$  via receptor TLR-4. O TGF- $\beta$  regula negativamente a expressão do receptor de ativação NKG2D das células NK, resultando na deficiência funcional dessas células limitando a resposta imune antiviral, contribuindo com o desenvolvimento de uma infecção persistente e inflamação crônica (SÉNE et al., 2010).

Em decorrência da resposta inflamatória persistente induzida pelo HCV, os mecanismos imunorreguladores do hospedeiro são ativados e estimulam a produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$  para conter os danos teciduais progressivos decorrentes da inflamação. Além disso, o TGF- $\beta$  é um potente ativador da transdiferenciação das células estreladas hepáticas (HSCs) em miofibroblastos, estimulando-as a produzir componentes da matriz extracelular (principalmente o colágeno tipo I) (FIBBI et al., 2001; IWASAKO et al., 2014; KAJDANIUK et al., 2013; TSUKADA et al., 2005; WELLS; KRUGLOV; DRANOFF, 2004).

Além de sintetizar componentes da matriz extracelular, as células estreladas hepáticas ativadas (miofibroblastos) produzem os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), inibindo o remodelamento da matriz extracelular realizado pelas MMP (Metaloproteinases de matriz extracelular) (ARTHUR, 2000). Em consequência, ocorre a deposição de fibras de colágenos e o acúmulo de matriz extracelular, promovendo o desenvolvimento de fibrose hepática (**Figura 7**). Em estágios avançados de fibrose, o fígado contém aproximadamente 6 vezes mais matriz extracelular do que o normal, incluindo colágenos (I, III e IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano e proteoglicanos (ARTHUR, 2000; BATALLER; BRENNER, 2005; CUI; FU; LI, 2013; IWASAKO et al.,

2014; LEMOINNE et al., 2013; MEDERACKE et al., 2013; WELLS; KRUGLOV; DRANOFF, 2004).

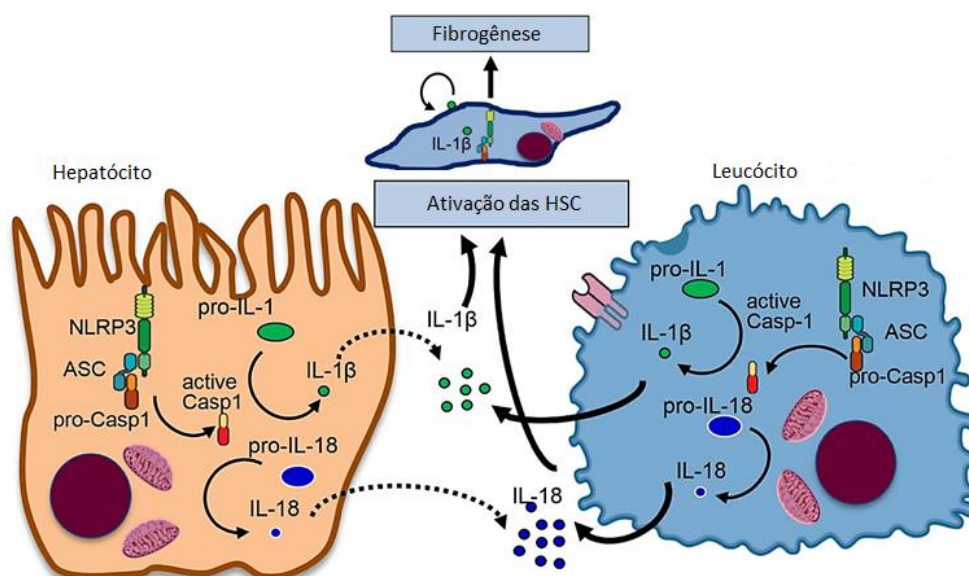


**Figura 7:** Eventos imunes envolvidos na ativação das células estreladas hepáticas (HSC) e desenvolvimento da fibrose.

**Fonte:** Adaptado de: (WEISKIRCHEN; TACKE, 2014).

A citocina IL-1 $\beta$  também pode ativar diretamente as HSCs e estimular a deposição de matriz extracelular e produção dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), contribuindo com o processo de fibrose (**Figura 8**) (JIANG et al., 2017; PRADERE et al., 2013; WREE et al., 2014).





**Figura 8:** Modelo de ativação das células estreladas hepáticas (HSC) pela citocina IL-1 $\beta$ . A ativação do inflamassoma NLRP3 em hepatócitos e células imunes resulta na produção das citocinas pró-inflamatória IL-1 $\beta$  e IL-18. A IL-1 $\beta$  ativa e mantém a sobrevivência das células estreladas hepáticas (HSC).

**Fonte:** Adaptado de: (WREE et al., 2014).

#### 1.4.2.1 Inflamassomas

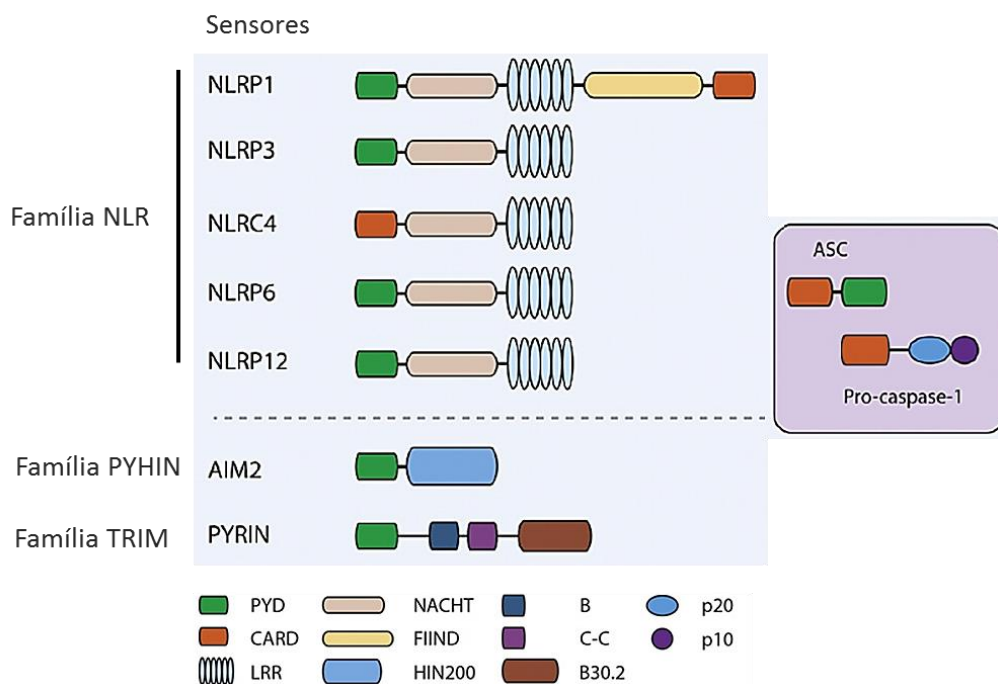
Os inflamassomas, caracterizados por Martinon et al. (2002), são complexos moleculares de alto peso molecular, formados no citoplasma em resposta a estímulos exógenos e endógenos. Esses complexos recrutam e ativam caspases pró-inflamatórias, responsáveis pelo processamento e maturação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 (KAYAGAKI et al., 2011; MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002).

Os inflamassomas canônicos são aqueles que ativam a pró-caspase-1, enquanto os não-canônicos promovem a ativação da pró-caspase-11 (KAYAGAKI et al., 2011; LAMKANFI; DIXIT, 2014). As caspases são zimogênios da família das cisteína-aspartato-proteases, envolvidas na inflamação e morte celular (ELLIOTT et al., 2009). O genoma humano codifica as caspases inflamatórias: caspase-1, caspase-4 e caspase-5. A caspase-11, expressa em camundongos, é o homólogo das caspases-4 e 5 expressas em humanos (LIN; CHOI; PORTER, 2000; MAN; KANNEGANTI, 2016).

De modo geral, os inflamassomas são formados pela oligomerização de três componentes principais: As proteínas que atuam como sensores, a proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e a caspase-1. Os sensores citosólicos NLRP1 (ou NALP1), NLRP2, NLRP3 (ou NALP3), NLRP6 e NLRC4 (ou IPAF) são membros da família dos receptores NLRs (*NOD-like receptor*). AIM2 (*Absent in*

*Melanoma 2*) e IFI16 (*Interferon Gamma Inducible Protein 16*) pertencem a família PYHIN (*PYD-like and HIN domain-containing proteins*). Enquanto a proteína sensora PYRIN está incluída na família TRIM (*Tripartite motif proteins*) (**Figura 9**) (DE TORRE-MINGUELA; DEL CASTILLO; PELEGRÍN, 2017; KERUR et al., 2011; LO et al., 2015; PLACE; KANNEGANTI, 2018; YU et al., 2018).

Os sensores NLRPs (exceto NLRP1) são formados por um domínio C-terminal rico em repetições de leucina (LRR), um domínio central de ligação a nucleotídeos (NACHT ou NBD) e um domínio efetor PYD na porção N-terminal. O NLRP1 humano difere-se dos demais NLRPs por possuir um domínio interno FIIND (*function-to-find domain*) e um domínio CARD na região C-terminal. O NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4-like*) possui um domínio CARD na porção N-terminal (STROWIG et al., 2012; YU et al., 2018). Os sensores AIM2 e IFI16 apresentam um domínio efetor PYD N-terminal e um domínio HIN200 (*hematopoietic interferoninducible nuclear antigen with 200 amino-acid repeat*) C-terminal, que reconhece o seu ligante (**Figura 9**) (BÜRCKSTÜMMER et al., 2009; ROBERTS et al., 2009).



**Figura 9:** Representação dos componentes dos inflamassomas, demonstrando a organização estrutural dos seus domínios.

**Fonte:** Adaptado de: (YU et al., 2018).

A proteína adaptadora ASC contém os domínios PYD e CARD, atuando no recrutamento da pró-caspase-1, por interações homotípicas CARD-CARD, para os

inflamassomas em formação. A proximidade entre as pró-caspases presentes no complexo induz sua ativação por autoproteólise (GUMUCIO et al., 2002; LIEPINSH et al., 2003; LU et al., 2014; PROELL et al., 2013; SRINIVASULA et al., 2002).

A caspase-1 ativada (subunidades p20/p10) cliva as formas precursoras pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18, levando a maturação das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18. Além disso, a caspase-1 promove a ativação da proteína gasdermina-D, a qual induz a morte celular por piroptose, formando poros na membrana da célula (LABBÉ; SALEH, 2008; LIU et al., 2016). Tem sido descrito que a gasdermina-D também facilita a secreção de IL-1 $\beta$  em células intactas pela formação de lipossomas (DING et al., 2016; EVAVOLD et al., 2018; HE et al., 2015; KOVACS; MIAO, 2017). As caspases-4, 5 e 11, também podem clivar a gasdermina-D (KAYAGAKI et al., 2015; LIU et al., 2016).

A ativação dos inflamassomas é regulada por moléculas presentes nas células do hospedeiro. A proteína CARD8 regula de forma negativa a atividade dos inflamassomas, inibindo a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e regulando a ativação de caspases inflamatórias (ITO; HARA; KUBOTA, 2014; JO et al., 2016). O CARD8, também conhecido como CARDINAL (*CARD inhibitor of NF- $\kappa$ B-activating ligands*) ou TUCAN (*Tumor-up-regulated CARD-containing antagonist of caspase nine*), pertence à família de domínio de recrutamento de caspase membro 8, codificada pelo gene CARD8, localizado no cromossomo 19q13.33 (BOUCHIER-HAYES et al., 2001; MCGOVERN et al., 2006; PATHAN et al., 2001).

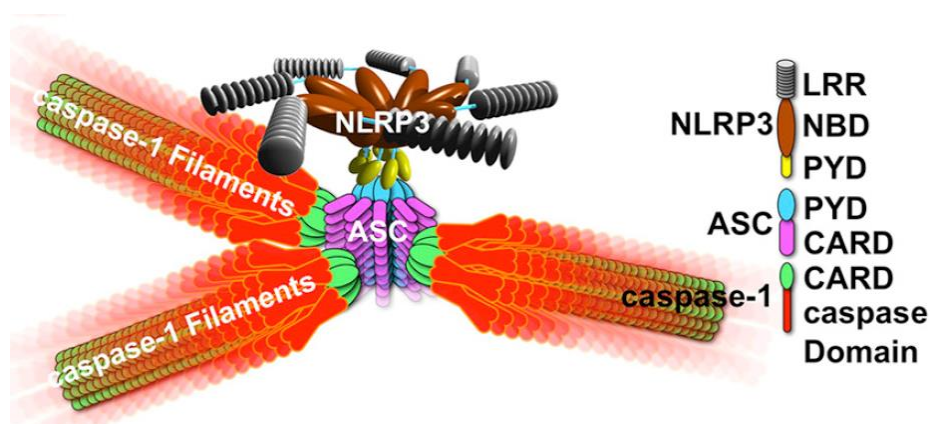
#### 1.4.2.2 Inflamassoma NLRP3

O sensor NLRP3 (*NOD-like receptors, pyrin-domain-containing proteins 3*), foi inicialmente descrito por Hoffman et al., (2001) ao estudar famílias com síndromes autoinflamatórias. Posteriormente, foi descrita a formação do complexo inflamassoma e o processamento da citocina IL-1 $\beta$  (AGOSTINI et al., 2004).

O inflamassoma NLRP3, o mais bem caracterizado e estudado até o momento, atua como um sensor de modificações citoplasmáticas e sua ativação requer dois sinais de iniciação (*priming*). O primeiro sinal ocorre após a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, que regulam positivamente a expressão gênica do NLRP3 e da pró-IL-1 $\beta$  (BAUERNFEIND et al., 2009; FRANCHI; EIGENBROD; NUNEZ, 2009; GURUNG et al., 2012; NETEA et al., 2009; TSUTSUI et al., 2010). O segundo sinal de ativação é fornecido por diversos

PAMPs e DAMPs, incluindo ATP extracelular; toxinas bacterianas formadoras de poros; cristais de sílica, ácido úrico, colesterol, amianto, hidróxido de alumínio; exposição à radiação ultravioleta; infecções bacterianas, fúngicas e virais, incluindo o vírus da hepatite C (BURDETTE et al., 2012; DOSTERT et al., 2008; FELDMEYER et al., 2007; FRANCHI et al., 2014; HORNUNG et al., 2008; ICHINOHE; PANG; IWASAKI, 2010; LAMKANFI; MALIREDDI; KANNEGANTI, 2009; MARIATHASAN et al., 2006; MARTINON et al., 2006; MUÑOZ-PLANILLO et al., 2013).

Os sinais de iniciação induzem a deubiquitinação do sensor NLRP3 causando uma mudança conformacional que expõe o seu domínio NBD/NACHT, promovendo a oligomerização dos sensores NLRP3 e iniciando a formação do inflamassoma (JULIANA et al., 2012; PY et al., 2013). Após oligomerização do NLRP3, o adaptador ASC é recrutado por interações homotípicas PYD-PYD. Assim, o domínio CARD do adaptador ASC interage com o CARD da pró-caspase-1, recrutando-a para o complexo inflamassoma (**Figura 10**) (LU et al., 2014; SBORGI et al., 2015).

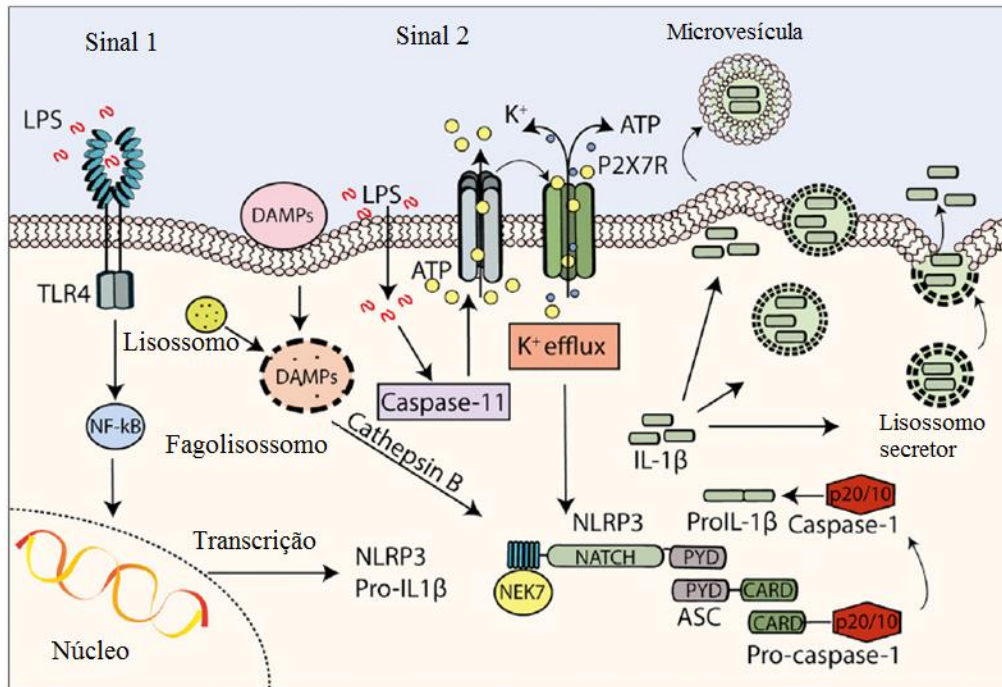


**Figura 10:** Esquema proposto para exemplificar a estrutura do complexo inflamassoma NLRP3 ativado.

**Fonte:** (LU et al., 2014).

Diante da grande diversidade de moléculas associadas com a formação do inflamassoma NLRP3, tem sido proposto que a ativação do sensor NLRP3 não é decorrente da sua ligação direta com esses PAMPs e DAMPs, ocorrendo com as alterações no metabolismo celular causadas por esses ativadores, que induzem a formação do inflamassoma NLRP3. Assim, diversos eventos celulares comuns foram propostos para explicar como o inflamassoma NLRP3 é ativado, incluindo o efluxo de potássio através da ativação dos receptores purinérgicos P2X7 por ATP extracelular, a cisteína protease catépsina B liberada após ruptura lisossômica, as espécies reativas de oxigênio (ROS), DNA mitocondrial oxidado

e a translocação de cardiolipina para a membrana externa das mitocôndrias (**Figura 11**) (HE; HARA; NÚÑEZ, 2016; HORNING et al., 2008; KESAVARDHANA; KANNEGANTI, 2017; MUÑOZ-PLANILLO et al., 2013; PÉTRILLI et al., 2007; PLACE; KANNEGANTI, 2018; RÜHL; BROZ, 2015).



**Figura 11:** Eventos celulares e vias de ativação do inflamassoma NLRP3. A ativação do NF- $\kappa$ B promove a transcrição de genes que codificam componentes do inflamassoma. Os DAMPs desencadeiam a ativação do inflamassoma NLRP3 causando a ruptura da membrana do lisossomo e liberação da cathepsina B. Os DAMPs e PAMPs intracelulares podem causar a abertura do canal iônico panexina-1, permitindo a saída de ATP intracelular. O ATP extracelular ativa o P2X7R e induz o efluxo de potássio. O inflamassoma NLRP3 é ativado e promove a maturação da pró-IL-1 $\beta$  e pró-IL-18.

**Fonte:** (DI VIRGILIO et al., 2017).

O P2X7R pertence à subfamília de receptores purinérgicos P2X (P2X1 a P2X7) e atua como um canal de cátions (NORTH, 2002). É reconhecido como o principal receptor de ATP (adenosina trifosfato) e está presente na superfície de grande parte das células imunes inatas e adaptativas, como monócitos, macrófago, células dendríticas, linfócitos T, linfócitos B e células NK (ADINOLFI et al., 2017; DI VIRGILIO et al., 2017). No fígado, o P2X7R é expresso nos hepatócitos, nas células endoteliais, células epiteliais biliares, células estreladas hepáticas e nos macrófagos residentes (BELDI et al., 2008; FAUSTHER; GONZALES; DRANOFF, 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

A ativação do inflamassoma NLRP3 via receptor P2X7 desempenha um papel importante na regulação das respostas inflamatórias durante a infecção viral aguda, por

aumentar a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 em células dendríticas e macrófagos (ENGLEZOU et al., 2015; GICQUEL et al., 2015; LEE et al., 2012).

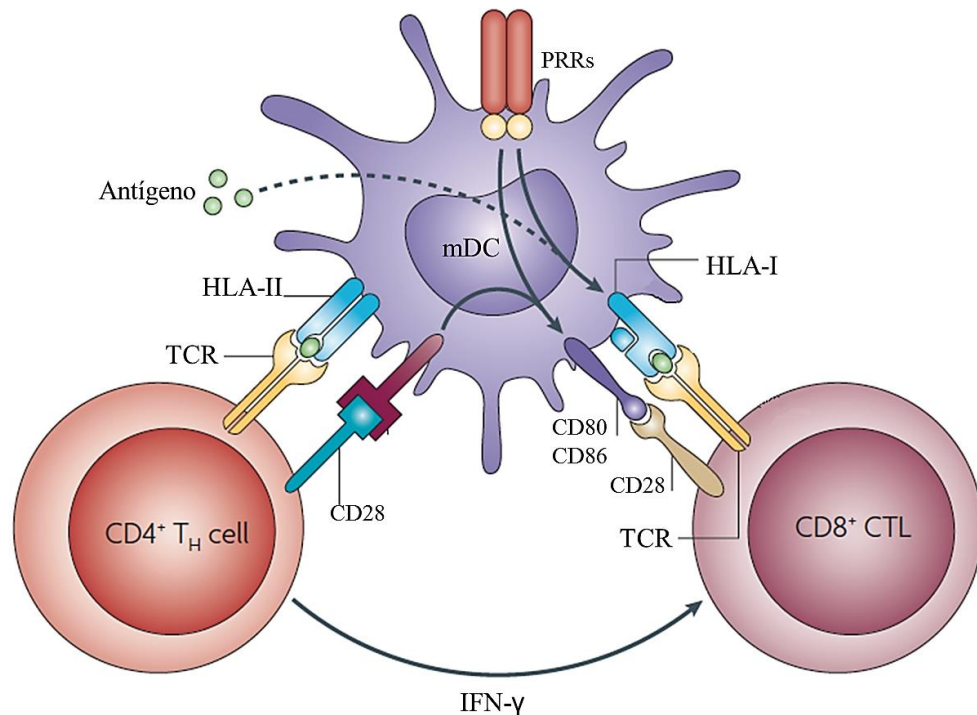
### 1.4.3 Resposta imune Adaptativa

As células dendríticas mieloides (mDCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais (APC), equipadas com um conjunto diversificado de PRRs, através dos quais reconhecem os antígenos virais (STEINMAN, 2007). Os fatores de transcrição NF- $\kappa$ B e AP-1, ativados pelos PRRs, estimulam a expressão de genes que induzem a maturação das mDCs em um fenótipo determinante para sua função como APC (BRUBAKER et al., 2015; KAGAN; MAGUPALLI; WU, 2014; O'KEEFFE; MOK; RADFORD, 2015). Dessa forma, as mDCs regulam positivamente a atividade lisossômica, resultando na degradação eficiente dos peptídeos virais, para apresentação via molécula de HLA (Antígeno Leucocitário Humano). A expressão na superfície celular das moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2, respectivamente) também é aumentada. As mDCs também regulam positivamente a produção de IL-12, uma citocina chave na indução do perfil Th1 (LAMBOTIN et al., 2010).

As mDCs migram para os linfonodos regionais mais próximos e apresentam os peptídeos virais aos linfócitos T naives, ativando suas funções efetoras. Os receptores dos linfócitos T helper CD4<sup>+</sup> (TCRs) reconhecem antígenos apresentados pela molécula HLA de classe II e linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem via apresentação pelo HLA-I (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013; GUO et al., 2012; ZHANG; BEVAN, 2011; ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

O reconhecimento do antígeno fornece o primeiro sinal para a ativação dos linfócitos T. A interação entre as moléculas coestimulatórias CD80 e CD86 na superfície das células dendríticas, com o CD28 expresso pelos linfócitos T fornece o segundo sinal de ativação. A citocina IL-12, produzidas pelas mDCs e o IFN- $\gamma$  presente no microambiente induzem a polarização dos linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup> para o perfil Th1, que responde contra patógenos intracelulares e é caracterizado pela produção de IFN- $\gamma$  (**Figura 12**) (KAMBAYASHI; LAUFER, 2014; LARRUBIA et al., 2014). O IFN- $\gamma$  potencializa a ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em Linfócitos T Citotóxicos (CTLs) (ZHANG; BEVAN, 2011).





**Figura 12:** Mecanismo molecular de ativação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> por células dendríticas mieloides (mDCs).

**Fonte:** Adaptado de: (KURTS; ROBINSON; KNOLLE, 2010).

A redução da carga viral do HCV está associada com uma resposta robusta e sustentada das células Th1 e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) (SU et al., 2002; THIMME et al., 2002). No entanto, a detecção dessas células específicas para o HCV é relatada de forma tardia, em torno de 6 a 8 semanas após a infecção primária, mesmo na presença de altos níveis de replicação viral (BOWEN; WALKER, 2005).

Os anticorpos produzidos durante a infecção pelo HCV têm como principal alvo as proteínas do envelope viral (E1/ E2), no entanto eles são pouco eficientes devido à alta taxa de mutação e rápida seleção de variantes virais (HELLE; DUVERLIE; DUBUISSON, 2011; JEULIN et al., 2013).

Durante a infecção crônica do HCV, a produção de citocinas e moléculas regulatórias, como IL-10, TGF- $\beta$ , galectina-9, PD-L1 e PD-L2, por macrófagos residentes, em resposta aos estímulos inflamatórios contínuos, pode reduzir a atividade antiviral dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (JU; TACKE, 2016).

A citocina IL-33, liberada das células hepáticas danificadas, pode estimular a ativação dos linfócitos Th2 (CHAN et al., 2012; PALOMO et al., 2015). As citocinas produzidas pelas células Th2 (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13), reduzem a ativação dos linfócitos Th1

e polarizam a resposta para o perfil Th2, promovendo um microambiente imunossupressor (LÓPEZ-NAVARRETE et al., 2011).

Nesse cenário, a população de linfócitos T regulatórios (Treg, Foxp<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) é regulada de forma positiva e amplificam os mecanismos imunorreguladores do hospedeiro (CARAMBIA et al., 2014; FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; FU et al., 2004). Embora esses mecanismos regulatórios tenham um papel importante no controle da resposta imune e reparação tecidual, eles levam à exaustão dos linfócitos T helper CD4<sup>+</sup> e T citotóxicos CD8<sup>+</sup> e falha da resposta imune protetora contra o HCV, colaborando para a persistência viral (ABDEL-HAKEEM; SHOUKRY, 2014; BATALLER; BRENNER, 2005).

#### **1.4.5 Fatores imunogenéticos do hospedeiro relacionados aos inflamassomas**

Estudos imunogenéticos têm investigado o papel de diversos SNPs (*single nucleotide polymorphism*) em genes que codificam proteínas imunorreguladoras, citocinas pró-inflamatórias e fatores fibrogênicos em pacientes com doenças hepáticas crônicas. Esses fatores genéticos podem ajudar a explicar as diferenças em respostas imunes contra o mesmo estímulo (BATALLER; NORTH; BRENNER, 2003; GE et al., 2009; POWELL et al., 2000; SCHUPPAN et al., 2003; YUAN et al., 2012). Além disso, os SNPs podem atuar como relevantes biomarcadores para o prognóstico de diversas doenças (MANTHIRAM et al., 2017; SHEN et al., 2015).

As variações genéticas do hospedeiro desempenham um papel crucial na suscetibilidade à infecção pelo HCV e no prognóstico da infecção viral. Vários polimorfismos nos genes de citocinas, como IL-18, IFN, IL-10 e IL-28, foram relatados como estando associados à suscetibilidade ao HCV e ao prognóstico da doença (AFZAL et al., 2011; SHAKER; SADIK, 2012).

Em pacientes com infecção crônica pelo HCV, o SNP -511C/T (rs16944) no gene que codifica a citocina IL-1 $\beta$  (2q14.1), foi associado com o risco de desenvolvimento de cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (MOREIRA et al., 2016; WANG et al., 2003). Em pacientes com hepatite B crônica, esse mesmo SNP também foi associado com o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (HIRANKARN et al., 2006).

O polimorfismo -137G/C (rs187238) na região promotora do gene da IL18 (11q23.1), foi associado com o desenvolvimento de infecções crônicas pelo vírus da hepatite



C e com o risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em pacientes infectados com o vírus da hepatite B (HBV) (LAU et al., 2016; YANG; LIU, 2015).

Em relação as proteínas relacionadas com a formação dos inflamassomas, os SNPs NLRP1-L155H A/T (rs12150220) e (rs2670660) A/G, no gene NLRP1 (17p13.2), foram associados com a doença de Addison, diabetes tipo 1, lúpus eritematoso sistêmico, doença inflamatória intestinal e doença celíaca (DE IUDICIBUS et al., 2011; MAGITTA et al., 2009; PONTILLO et al., 2011, 2012; YU et al., 2018).

O SNP NLRP3-Q705K, Gln705Lys (rs35829419), localizado no cromossomo 1q44, induz alteração de ganho de função com produção elevada de IL-1 $\beta$  e IL-18. Sendo associado com alta atividade inflamatória na artrite reumatoide, aneurismas da aorta abdominal, doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa, dermatite atópica e aumento da suscetibilidade à infecção pelo HIV-1. No câncer colorretal esse polimorfismo foi associado com proteção contra o desenvolvimento da doença (JENKO et al., 2016; VERMA et al., 2012; ZHANG et al., 2015).

O SNP rs10754558 (G/C) na região não traduzida 3' do gene NLRP3 (3'UTR) pode afetar a estabilidade do mRNA e está associado a suscetibilidade a infecção pelo HIV-1 e proteção contra o desenvolvimento da tuberculose pulmonar ativa (PONTILLO et al., 2010; SOUZA DE LIMA et al., 2016).

No gene do *CARD8* (19q13.33), o SNP rs2043211 foi associado com de perda de função e risco de desenvolvimento da artrite reumatoide e doença de Crohn, por ativação desregulada do inflamassoma NLRP3 (JENKO et al., 2016; MAO et al., 2018).

Em um estudo realizado em pacientes com tuberculose pulmonar ativa na Amazônia, o SNP rs2230911 no receptor P2X7 (12q24.31) foi associado com perda de função e aumento da suscetibilidade à infecção. Os pesquisadores também relataram que o SNP rs8898, no gene *CTSB* (8p23.1) que codifica a catepsina B (uma ativadora do inflamassoma NLRP3), mostrou desempenhar um papel protetor na tuberculose pulmonar ativa (SOUZA DE LIMA et al., 2016).

Portanto, os SNPs em genes relacionados com a ativação e formação dos inflamassomas podem levar a alterações de função e desregulação no equilíbrio da resposta inflamatória. No entanto, são poucos os estudos que têm avaliado o papel desses SNPs na imunopatogênese da hepatite C, principalmente associado com a progressão da doença (PARAMEL; SIRSJÖ; FRANSÉN, 2015), o que justifica a elaboração do presente estudo.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar os polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 no desenvolvimento da fibrose hepática em pacientes com hepatite C atendidos em uma unidade de referência na Amazônia brasileira.

### Objetivos específicos

- Estimar a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 em pacientes com hepatite C;
- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 com a infecção pelo HCV em pacientes com hepatite C.
- Avaliar se há associação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 com a fibrose hepática em pacientes com hepatite C;
- Investigar a influência dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 na concentração sérica da citocina IL-1 $\beta$  em pacientes com hepatite C;
- Investigar a associação dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2 com o controle da carga viral em pacientes com hepatite C.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo de transversal realizado na cidade de Manaus, Estado do Amazonas.

#### **3.2 Área de estudo**

O estudo foi desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) em colaboração com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

#### **3.3 População de estudo**

A população de estudo é composta por pacientes diagnosticados com o vírus da hepatite C, atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e, como grupo controle, candidatos a doação de sangue que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

#### **3.4 Critérios de inclusão, não-inclusão e exclusão**

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica (HCV) confirmados com testes sorológicos e moleculares de detecção do RNA viral (HCV RNA<sup>+</sup>) NAT-HCV, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos, com e sem tratamento prévio, com e sem a presença de fibrose que procuraram atendimento pelo Ambulatório de Hepatopatias da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. Não foram incluídos indígenas nem mulheres grávidas.

Foram excluídos pacientes que apresentarem coinfeção com os vírus da hepatite B (HBsAg), vírus da imunodeficiência adquirida-HIV (anti-HIV-1e 2), HTLV (anti-HTLV- 1 e 2), doença de Chagas (anti-*T cruzi*) e sífilis (VDRL). Além disso, os pacientes que apresentaram quadro clínico-laboratorial de cirrose hepática descompensada, pacientes diabéticos descompensados, pacientes com história de uso de drogas ilícitas nos últimos sete anos, pacientes com relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios

psiquiátricos, pacientes renais crônicos e pacientes com síndrome plurimetabólica também não fizeram parte da amostragem.

Para o grupo controle, foram selecionados candidatos a doação de sangue atendidos na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com idade mínima de 18 anos residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-1e 2), HTLV (anti-HTLV 1 e 2), doença de Chagas (teste ELISA) e sífilis (VDRL).

### 3.5 Estadiamento da doença hepática

O estadiamento da doença hepática foi realizado para todos os portadores de hepatite C, com a finalidade de caracterizar o grau de acometimento do tecido hepático. Segundo a Sociedade Brasileira de Hepatologia, a biópsia hepática é considerada o padrão-ouro para o estadiamento da hepatite C, mas pode ser substituída por métodos não invasivos como a elastografia hepática transitória avaliada através do FibroScan® ou combinação dos índices APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) e FIB4 (*Fibrosis-4*), recomendados pela Organização Mundial de Saúde em abril de 2014 (WHO, 2014).

A elastografia transitória é um método baseado em ultrassom realizado com o equipamento FibroScan® (*Echosens, Paris*) que mensura a rigidez do fígado e permite a avaliação e identificação do grau de fibrose e cirrose hepática (LUPSOR et al., 2012; MORIKAWA, 2011). No Brasil, esse procedimento foi incorporado ao SUS por meio da Portaria nº 47, de 29 de setembro de 2015.

Neste estudo, os índices APRI e FIB4, foram utilizados pela equipe médica da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), para fazer o o estadiamento da doença hepática e estratificar os pacientes com hepatite C em  $< F2$ : fibrose leve ou  $\geq$  fibrose avançada. Os índices APRI (*AST to Platelet Ratio Index*) e FIB4 (*Fibrosis-4*) são usados para caracterizar o grau da fibrose hepática e avaliar a presença da doença hepática avançada. Os valores de APRI e FIB são obtidos por meio de um cálculo matemático (**Figuras 13 e 14**) utilizando os resultados dos exames laboratoriais de AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), contagem de plaquetas e a idade do paciente, devendo ser reavaliados a cada seis meses (BRASIL, 2017, 2018).

$$APRI = \frac{\text{Valor de AST (UI/L)}}{\text{Limite Superior Normal de AST (UI/L)}} \times 100$$

$$\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)}$$

**Figura 13:** Fórmula para calcular o valor de APRI.  
**Fonte:** (BRASIL, 2017).

$$FIB4 = \frac{\text{Idade (anos)} \times \text{AST (UI/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{ALT (UI/L)}}} \times 100$$

**Figura 14:** Fórmula para calcular o valor de FIB4.  
**Fonte:** (BRASIL, 2018).

Os valores de APRI e FIB4 obtidos devem ser correlacionados com a escala METAVIR (*Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis*), observando os pontos de cortes preestabelecidos conforme descrito na **Tabela 01** (BRASIL, 2018).

**Tabela 1:** Caracterização de fibrose moderada e cirrose conforme valores de APRI e FIB4.

METAVIR	APRI (baixo corte)	APRI (alto corte)	FIB4 (baixo corte)	FIB4 (alto corte)
METAVIR ≥ F2 (Fibrose moderada)	0,5	1,5	1,45	3,25
METAVIR F4 (Cirrose)	1,0	2,0	-	-

**Fonte:** (BRASIL, 2018).

O escore Child-Pugh (*Child-Turcotte-Pugh*) é um sistema de pontuação usado para avaliar o prognóstico da doença hepática crônica e diferenciar a cirrose compensada da descompensada (MANNNS et al., 2017). O valor de Child-Pugh é calculado somando-se pontos atribuídos à cinco fatores: Bilirrubina total, Albumina sérica, Tempo de protrombina (segundos de prolongamento) INR (Razão Normalizada Internacional), gravidade da ascite e grau de encefalopatia hepática. A somatória dos pontos varia entre 5 e 15 e as classes de Child-Pugh são: A (valor de 5 a 6), B (7 a 9) ou C (acima de 10). Em geral, a descompensação indica cirrose com um escore de Child-Pugh >7 (classe B) (BRASIL, 2018).

### 3.6 Aspectos éticos

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos intitulados “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV<sup>+</sup> e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” e “*Avaliação do perfil Celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus*”, coordenados pela Dra. Adriana Malheiro Alle Marie e Dra. Laura Patrícia Viana Chaves, respectivamente. Ambos os projetos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas sob os respectivos números de CAAE: 49652815.8.0000.0009 e CAAE 0024.112.000-10.

### 3.7 Coleta de amostras

Foram coletadas 156 amostras de pacientes diagnosticados com Hepatite C crônica, atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, entre 2016 e 2018. Destes, foram excluídas 5 amostras de pacientes que foram à óbito e coinfectados com HIV, restando 151 pacientes. Para o grupo controle, foram coletadas 206 amostras de candidatos a doadores de sangue, que se apresentaram na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

As amostras de sangue periférico, foram coletadas por punção venosa em tubos com sistema a vácuo. As coletas foram realizadas em tubo com gel separador (Gel BD SST<sup>®</sup> II Advance<sup>®</sup>) para dosagem de citocinas e tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) (BD Vacutainer<sup>®</sup> EDTA K2) para os testes moleculares.

### 3.8 Extração de DNA

A extração de DNA genômico do hospedeiro foi realizada com o kit comercial *QIAmp DNA kit* (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA), de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. A concentração do DNA extraído foi verificada por meio do espectrofotômetro *Nanodrop modelo 2000c* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Em seguida, as amostras de DNA foram congeladas a -20°C para realização de testes moleculares.

### 3.9 Genotipagem dos polimorfismos nos genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 e do inflamassoma NLRP3, CARD8, CTSB e AIM2

Os polimorfismos foram selecionados através de uma busca bibliográfica nos seguintes bancos de dados: NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) e Human genome GRCh37.p13 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>), observando a frequência do alelo menor (MAF - *Minor allele frequencies*) descrita, assim como os estudos de associação já publicados (**Tabela 2**).

Selecionamos polimorfismos com frequência aproximada ou superior a 10%, para viabilizar nossos testes de associação, caso contrário seria necessário um número amostral elevado de casos e controles para obtenção de um poder estatístico satisfatório (OLIVEIRA et al., 2011).

**Tabela 2:** Informações sobre os polimorfismos estudados.

Genes / ID SNP	SNP	MAF	GERAL	AFR	AMR	EUR	Cromossomo
<i>IL-1<math>\beta</math></i> (rs16944)	-511 T/C	0.49	T: 51% C: 49%	T: 57% C: 43%	T: 55% C: 45%	T: 35% C: 65%	2q14.1
<i>IL18</i> (rs187238)	-137 C/G	0.21	C: 79% G: 21%	C: 80% G: 20%	C: 69% G: 31%	C: 72% G: 28%	11q23.1
<i>CARD8</i> (rs2009373)	T/C Íntron	0.47	T: 53% C: 47%	T: 50% C: 50%	T: 41% C: 59%	T: 47% C: 53%	19q13.33
<i>CTSB</i> (rs1692816)	C/A Íntron	0.43	A: 43% C: 57%	A: 44% C: 56%	A: 41% C: 59%	A: 34% C: 66%	8p23.1
<i>NLRP3</i> (rs10754558)	3'UTR G/C	0.35	G: 35% C: 65%	G: 25% C: 75%	G: 25% C: 75%	G: 46% C: 54%	1q44
<i>AIM2</i> (rs1103577)	T/C Íntron	0.39	T: 61% C: 39%	T: 91% C: 9%	T: 36% C: 64%	T: 40% C: 60%	1q23.1-2

AFR: Africanos; AMR: Americanos; EUR: Europeus.

#### 3.9.1 Genotipagem de polimorfismo nos genes das citocinas IL-1 $\beta$ e IL-18 por PCR-RFLP.

Os polimorfismos no gene das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18 foram analisados por amplificação da região de interesse pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguida pela reação de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

As reações de PCR para a IL-1 $\beta$  foram realizadas com 17,3 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,5 $\mu$ L de tampão 10x, 2,0 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 $\mu$ L de dNTPs, 0,5 $\mu$ L de primer IL-1 $\beta$  *Forward* (F: 5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3'), 0,5 $\mu$ L de primer IL-1 $\beta$  *Reverse* (R:5'-

GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3'), 0,2µL de Taq DNA polimerase e 1,0µL de DNA genômico. A clivagem foi realizada no termociclador da *Applied Biosystems (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*, conforme a seguinte programação: 1 ciclo à 95°C por 4 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos à reação de RFLP, preparada com 7,8µL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,0µL de tampão Buffer4, 0,2µL da enzima de restrição *AvaI* (10U/µL, *Promega, Madison WI, USA*) e 15,0µL do produto da reação de PCR, com posterior incubação em termobloco à 37°C *overnight*. O produto da PCR-RFLP foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo.

As reações de PCR para a IL-18 foram realizadas com 17,3µL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 2,5µL de tampão 10x, 2,0µL de MgCl<sub>2</sub>, 1,0µL de dNTPs, 0,5µL de primer IL-18 *Forward* (F: 5'-CACAGAGCCCCAACTTTTACGGCAGAGAA-3'), 0,5µL de primer IL-18 *Reverse* (R:5'-GACTGCTGTCGGCACTCCTTGG-3'), 0,2µL de Taq DNA polimerase e 1,0µL de DNA genômico. A clivagem foi realizada no termociclador da *Applied Biosystems (Veriti® 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*, conforme a seguinte programação: 1 ciclo à 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados pela PCR foram submetidos à reação de RFLP, preparada com 7,7µL de H<sub>2</sub>O MiiQ, 2,0µL de tampão 10x Buffer, 0,3µL da enzima de restrição *MboII* (10U/µL, *Promega, Madison WI, USA*) e 15,0µL do produto da reação de PCR, com posterior incubação em termobloco à 37°C *overnight*.

As informações sobre as enzimas de restrição e o tamanho de cada fragmento estão descritos na **tabela 3**.

**Tabela 3:** Descrição dos polimorfismos, localização do genoma, temperaturas de hibridação, enzimas de restrição e fragmentos gerados durante os ensaios.

Polimorfismos	Localização no genôma	Temperatura de hibridização (°C)	Enzimas de Restrição	Alelos e fragmentos (bp <sup>rs</sup> )
IL-1β (rs16944)*	-511C/T (Região promotora)	56°C	<i>AvaI</i>	T: 304 C: 190 +104
IL18 (rs187238)	-137G/C (Região promotora)	60°C	<i>MboII</i>	C: 155 G: 116

\*rs: Sequência de referência; <sup>rs</sup>bp: Pares de bases.



### 3.9.2 Genotipagem dos polimorfismos nos genes do inflamassoma NLRP3, CTSB, CARD8 e AIM2 por PCR em Tempo Real.

As amostras de DNA extraídas foram testadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real (qPCR), para estudo dos polimorfismos nos genes conforme descritos na **tabela 4**. O ensaio foi realizado com a sonda alelo específico *TaqMan*<sup>®</sup> (*Reporter*: VIC e FAM; *Quencher*: MGB-NFQ) da marca *Applied Biosystems by Life Technologies*. O fluoróforo VIC marca o alelo selvagem e o FAM marca o alelo mutante. Os primers e as sondas foram construídos através dos serviços oferecidos pelo próprio fornecedor (*Applied Biosystems by Life Technologies*, São Paulo, SP) e suas sequências encontram-se descritas na **tabela 4**.

**Tabela 4:** Sequências das sondas utilizadas na genotipagem por PCR em Tempo Real.

Genes	ID SNP	Sondas <i>TaqMan</i> * (VIC/ FAM)
<b>CARD8</b>	rs2009373	TGCTATCAAAAAAAAAAAGCATGA[C/T]TGTGACACCTGGAAA AAATCTTTTT
<b>CTSB</b>	rs1692816	ACACAGCCCTCTCCCCAGCCCCTC[A/C]CCTGCCTGCCCAATCC AGCCCTATT
<b>NLRP3</b>	rs10754558	GACAATGACAGCATCGGGTGTGTGTT[G/C]TCATCACAGCGCCTC AGTTAGAGGA
<b>AIM2</b>	rs1103577	TAAAAGGCACTCCATTCATCATT[C/T]GCTCAAGCCAGAAAGC CGGGAATCA

\*Identificação dos fluoróforos (VIC e FAM) de acordo com seu respectivo alelo. O fluoróforo VIC marca o alelo selvagem e o FAM marca o alelo mutante.

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas com 3,5µL de água ultrapura, 5µL do *genotyping Master Mix* (1x), 0,5µL de ensaio *TaqMan*<sup>®</sup> (20x), contendo 36µM de cada primer e 8µM de cada sonda *TaqMan*<sup>®</sup>, 1µL de DNA genômico, com volume final de 10µL. O termociclador *Applied Biosystems QuantStudio*<sup>™</sup> 3 by *ThermoFisher Scientific* foi utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse, com os seguintes parâmetros de ciclagem: 95°C por 10 minutos para ativação, 50 ciclos à 92 °C por 15 segundos para desnaturação e 50 ciclos à 60°C por 90 segundos para anelamento e extensão.

### 3.10 Dosagem de Citocina por ELISA Sanduíche

As concentrações séricas da citocina IL-1β foram avaliadas pelo teste imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduíche. As dosagens foram feitas a partir do plasma/soro dos indivíduos dos grupos Controle e de pacientes com Hepatite C, conforme especificações do kit comercial da *BD*<sup>®</sup> *Biosciences* (San Jose, CA, USA), *Human BD*<sup>™</sup> *OptEIA*<sup>®</sup> *Set II* para a citocina IL-1β.

### 3.11 Análises estatísticas

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos indivíduos do estudo foram apresentados em formas de tabelas e gráficos, elaboradas com o programa Excel (*Microsoft Corporation*). As variáveis categóricas são expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). A normalidade dos dados foi avaliada pelos testes *Shapiro-Wilk* e *D'Agostino & Pearson test*. A análise estatística entre grupos independentes foi realizada pelo teste Qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas e *Mann-Whitney* (para dois grupos) ou *Kruskal-Wallis* e *Dunn* para três ou mais grupos de variáveis contínuas. A regressão logística (testes de associação) foi realizada para identificação dos fatores de risco associado ao desfecho específico (desenvolvimento da fibrose), bem como descrição do seu "odds ratio" e intervalo de confiança à 95%.

O *software* estatístico R, versão 3.4.3, ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), acoplado ao pacote *SNPassoc*, versão 1.9-2 foi utilizado para análise multivariada e verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, além disso, o *software* R foi empregado para realizar os testes de interação gênica. A análise de associação foi realizada para os modelos genéticos: Codominante, dominante, recessivo e overdominate. Foi apresentado o melhor modelo de herança genética, de acordo com o menor valor de *Akaike Information Criterion* (AIC), calculado no *software* R, para cada polimorfismo.

## *Resultados*

---

## ARTIGO PUBLICADO:

## PLOS ONE

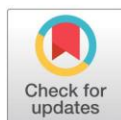
## RESEARCH ARTICLE

# Inflammasome genes polymorphisms may influence the development of hepatitis C in the Amazonas, Brazil

Diana Mota Toro<sup>1</sup>, Rajendranath Ramasawmy<sup>1,2,3,4,5</sup>, Pedro Vieira Silva Neto<sup>1</sup>, Grenda Leite Pereira<sup>1</sup>, Priscila Santos Sarmento<sup>1</sup>, Hanna Lara Silva Negreiros Dray<sup>6</sup>, Keyla Santos Sousa<sup>6,7</sup>, Juliana Santos Affonso<sup>6,7</sup>, Jéssica Albuquerque Silva<sup>6</sup>, Nadja Pinto Garcia<sup>6</sup>, Marilú Victória Barbieri<sup>2,3</sup>, Flamir Silva Victória<sup>2,3</sup>, Eduardo Antônio Donadi<sup>8</sup>, Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,5,7,6,9\*</sup>, Mauricio Morishi Ogusku<sup>1,5,10</sup>, Aya Sadahiro<sup>1,5</sup>, Andréa Monteiro Tarrago<sup>1,5,6,7</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,5,6,7\*</sup>

**1** Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **2** Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **3** Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brazil, **4** Faculdade de Medicina, Universidade Nilton Lins, Manaus, Amazonas, Brazil, **5** Genomic Health Surveillance Network: Optimization os Assistance and Research in The State of Amazonas -REGESAM, Manaus, Amazonas, Brazil, **6** Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **7** Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **8** Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **9** Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil, **10** Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

\* allyson.gui.costa@gmail.com (AGC); malheiroadriana@yahoo.com.br (AM)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Toro DM, Ramasawmy R, Silva Neto PV, Pereira GL, Sarmento PS, Dray HLSN, et al. (2021) Inflammasome genes polymorphisms may influence the development of hepatitis C in the Amazonas, Brazil. PLoS ONE 16(6): e0253470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470>

**Editor:** Cinzia Ciccacci, Unicamillus, Saint Camillus International University of Health Sciences, ITALY

**Received:** November 9, 2020

**Accepted:** June 6, 2021

**Published:** June 23, 2021

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470>

**Copyright:** © 2021 Toro et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Due to ethical restrictions regarding patient privacy, data are available upon request. Data are available upon request from the Ethics Committee for researchers

## Abstract

Hepatitis C is considered a major public health problem caused by the hepatitis C virus (HCV). Viral infections are known to induce production of IL1 $\beta$  through the signaling pathway of inflammasomes. Emerging evidences suggest that Inflammasome genes may influence the immune response against HCV as the host genetic background may contribute to the balance between acute and chronic inflammation. We investigated in 151 patients with chronic hepatitis C and 206 healthy blood donors' individuals (HD). Polymorphisms in the *IL1B* and *IL18* genes were genotyped by PCR-RFLP, while *NLRP3*, *CARD8*, *CTSB* and *AIM2* by RT-PCR. Serum assay of IL-1 $\beta$  cytokine was performed by ELISA. 84 patients presented mild fibrosis (<F2) and 67 advanced fibrosis ( $\geq$  F2). Among the HD individuals the *NLRP3*-rs10754558 C/C genotype correlated with higher IL-1 $\beta$  levels compared to the G/G genotype. Similar pattern was observed in patients with hepatitis C, mean circulating IL-1 $\beta$  levels were 21,96  $\pm$  4.5 and 10,62  $\pm$  3.3pg/mL among the C/C and G/G genotypes, respectively. This pattern holds even after stratification of the patients into mild fibrosis and advanced fibrosis, demonstrating that the *NLRP3*-rs10754558 or another polymorphism in linkage disequilibrium with it possibly has an influence on the processing of pro-IL-1 $\beta$ . Notably, higher levels of IL-1 $\beta$  (Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ) were observed among patients (mean  $\pm$  SEM: 19,24  $\pm$  3.3pg/mL) when compared with controls (mean  $\pm$  SEM: 11,80  $\pm$  1.0pg/mL). Gene-gene interaction showed that individuals heterozygotes for both *CARD8*-

from Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (CEP/FMT-HVD - [cep@fmt.am.gov.br](mailto:cep@fmt.am.gov.br)), for researchers who meet the criteria for access to confidential data. Additional requests for the data may be sent to the corresponding author or coauthors Allyson G. Costa ([allyson.gui.costa@gmail.com](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com)); Adriana Malheiro ([malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br)); Andréa Monteiro Tarragô ([andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com)); Rajendranath Ramasawmy ([ramasawmy@gmail.com](mailto:ramasawmy@gmail.com)).

**Funding:** This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - #002/2008, #007/2018 and #005/2019, PAMEQ Program - #004/2019, PAPAC Program - #005/2019 and PECTI-AM/SAÚDE Program #004/2020), Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (REGESAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal Program - #407818/2016), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Brazilian Ministry of Health.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

rs2009373 and *IL1B*-rs16944 are less prone to hepatitis C development ( $p_{\text{adj}} = 0.039$ ). Similarly, heterozygote carriers for *CTSB*-rs1692816 and *AIM2*-rs1103577 ( $p_{\text{adj}} = 0.008$ ) or for *IL18*-rs187238 and *NLRP3*-rs10754558 ( $p_{\text{adj}} = 0.005$ ), have less chances to the development of hepatitis C. However, between subgroups of  $<F2$  and  $\geq F2$ , individuals homozygous for the T allele of *CARD8*-rs2009373 and heterozygous for *IL18*-rs187238 ( $p_{\text{adj}} = 0.028$ ), have mild form of fibrosis.

## Introduction

Hepatitis C is an inflammatory liver disease caused by the hepatitis C virus (HCV). Nearly 71 million individuals are estimated to be infected worldwide and around 70% will progress to chronic form of the disease and may develop liver fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1, 2].

Persistent inflammatory response activates immunoregulatory mechanisms and stimulates the production of TGF- $\beta$  and IL-10, regulatory cytokines. TGF- $\beta$ 1 is a potent activator of hepatic stellate cell (HSCs) trans differentiation in myofibroblasts that stimulate the mechanisms of hepatic fibrosis [3–8]. IL-1 $\beta$  is also capable of stimulating fibrosis by activating HSCs cells and contributing to the development and maintenance of fibrosis in the liver [9].

IL-1 $\beta$  induces COX2, nitric oxide and TNF- $\alpha$ , and also modulates various cellular processes during chronic HCV infection [10]. Persistent hepatic macrophage IL-1 $\beta$  production in patients with chronic HCV attracts immune cells to the liver, enhancing inflammation [11, 12]. Exacerbated proinflammatory cytokine production contributes to tissue damage and development of autoinflammatory diseases [13].

Processing of pro-IL1 $\beta$  and pro-IL-18 proinflammatory cytokines into their bioactive forms requires the formation of molecular complexes called inflammasomes [14]. NLRP3 inflammasome is extensively studied and its gene expression is positively regulated by the transcription factor NF- $\kappa$ B [15–19]. *CARD8* negatively regulates inflammasome activity, inhibiting activation of transcription factor NF- $\kappa$ B and regulating activation of inflammatory caspases [20, 21]. *CARD8* regulates bioactive IL-1 $\beta$  secretion through inhibitory interaction with NLRP3 caspase-1 [20] and / or acting through inhibitory mechanisms in pro-IL-1 $\beta$  formation via the NF- $\kappa$ B pathway [20–23].

Growing evidence suggests that inflammasome genes may influence the immune response against HCV. Since nearly two-third of HCV-infected individuals progress to chronic form of the disease while the rest can eliminate the virus or remain asymptomatic, this suggests that the host genetic background may play an important role in the clinical outcome of HCV infection. In the present study, we analyzed whether polymorphisms in inflammasomes genes *IL1B* rs16944, *IL18* rs187238, *NLRP3* rs10754558, *CARD8* rs2009373, *CTSB* rs1692816 and *AIM2* rs1103577 are associated with susceptibility to HCV infection and liver fibrosis in hepatitis C patients in the Amazon population.

## Material and methods

### Ethics approval

This study was reviewed by the Ethics Committee of the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) and granted under the file (CAAE 49652815.8.0000.0009 and CAAE 0024.112.000–10). All of the study participants provided a



signed written informed consent form prior to the enrollment in the study, according to Declaration of Helsinki and Resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council for research involving human subjects. All patients were treated following the specifications of the Brazilian Ministry of Health [24].

### Samples and clinical data

The study was performed at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) in Manaus, the capital city of the Amazonas State, during 2016–2017. The study population was described elsewhere [25]. Briefly, 206 Healthy blood donors (HD) were randomly selected from HEMOAM and 151 HCV infected patients were recruited at the FMT-HVD. Among the HCV infected patients, 84 and 67 had  $< F2$  and  $\geq F2$ , respectively.

### Sample collection and genomic DNA extraction

Sample collection and genomic DNA extraction are also described elsewhere [25]. Briefly, genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Molecular analysis of polymorphisms

6 SNPs in inflammasome genes (CARD8, CTSB, NLRP3, AIM2, IL1B, IL18) were selected according to previously reported association studies and public databases (NCBI dbSNP and Human genome GRCh37.p13).

The NLRP3 rs10754558, CTSB rs1692816, CARD8 rs2009373 and AIM2 rs1103577 were identified by Real Time PCR. Whereas IL1B rs16944 and IL18 rs187238 of were identified by PCR-RFLP.

Real-time PCR reactions were performed with 3.5 $\mu$ L of ultrapure water, 5 $\mu$ L of Master Mix genotyping (1x), 0.5 $\mu$ L of TaqMan<sup>®</sup> assay (20x), containing 36 $\mu$ M of each primer and 8 $\mu$ M of each TaqMan<sup>®</sup> probe, 1 $\mu$ L genomic DNA, with final volume of 10 $\mu$ L (S1 Table). Applied Biosystems QuantStudio<sup>™</sup> 3 Thermocycler by ThermoFisher Scientific was used for amplification of fragments of interest, with the following cycling parameters: 95 $^{\circ}$ C for 10 minutes for activation, 50 cycles at 92 $^{\circ}$ C for 15 seconds for denaturation and 50 cycles at 60 $^{\circ}$ C for 90 seconds for annealing and extension.

PCR-RFLP were performed in the Eppendorf Mastercycler ep in a final volume of 25 $\mu$ L consisting of ~20ng genomic DNA, 2U Platinum<sup>™</sup>Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), 2.5 $\mu$ L10x buffer (100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3) and 500 mmol/L KCl), 1 $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (1.5 mmol/L), 1 $\mu$ L dNTPs (40 mmol/L), and 0.25 pmol/L each of forward and reverse primer. A total of 10 $\mu$ L of PCR product was digested with 5U of restriction enzyme (AvaI for IL1B rs16944 and MboII for IL18 rs187238) with their specified buffer. The restriction enzymes are from New England Biolabs, Ipswich, MA, USA. The primers, PCR cycling conditions, and restriction endonucleases are shown in S2 Table. After digestion with the restriction enzymes, the fragments generated were size-separated by electrophoresis in a 2% - 4% agarose gel stained with GelRed<sup>™</sup> Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized with the UV light Gel Doc<sup>™</sup> XR +System (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, USA) with a photo documentation system.

### Serum cytokine assay

Serum concentrations of IL-1 $\beta$  was measured by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sandwich immunoassay. Dosages were made from plasma of subjects in the Hepatitis

C patient group and controls. We use a commercial BD<sup>®</sup> Biosciences (San Jose, CA, USA) human BDTM OptEIA<sup>®</sup> Set II kit for cytokine IL-1 $\beta$ .

### Genotype association test and statistical analyzes

Demographic, clinical and laboratory data were presented in tables and graphs, prepared using the Excel program (Microsoft Corporation). Categorical variables are expressed as absolute value (n) and relative frequency (%). Statistical analysis between independent groups was performed by Chi-square or Fisher's exact test for categorical variables and Student's t-test, Mann-Whitney test or ANOVA for continuous variables. Logistic regression was performed to identify risk factors associated with the specific outcome (advanced fibrosis), as well as a description of their "odds ratio" and 95% confidence interval. A significant threshold of  $p < 0.05$  was adopted.

R software version 3.2.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) was used to perform genotypes association and inheritance modelling (package SNP assoc version 1.9–2). Data were adjusted for sex and age. Polymorphisms were evaluated for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and the association analysis with risk or protection for infection and fibrosis was performed for Codominant, dominant, recessive and Overdominate genetic inheritance models. The best genetic inheritance model was chosen according to the lowest value of Akaike Information Criterion (AIC).

## Results

### Basic characteristics of the study population

151 patients with chronic HCV infection and 206 healthy controls were included in the study. Among the HCV patients, 83 (55%) were males and 68 (45%) females, with a mean age of  $57.8 \pm SD 11.2$  years. Of the HD, 144 (70%) were males and 62 (30%) females, with a mean age of  $32 \pm SD 10.8$  years. The distribution of sexes was significantly different between the two studied groups ( $p < 0.05$ ). Males were predominant in both groups ( $p = 0.003$ ).

49 patients were treatment naïve. 84 patients (55.6%) had mild fibrosis ( $<F2$ ) and 67 (44.4%) ( $\geq F2$ ) advanced fibrosis according to APRI (AST to Platelet Ratio Index) and FIB4 (Fibrosis-4) indices. Patients with advanced fibrosis ( $\geq F2$ ) had a higher mean age ( $61.03 \pm 9.3$ ), with  $p = 0.001$ . About viral genotypes, we detected 103 (68%) genotype 1, 32 (21%) genotype 3, 10 (7%) genotype 2 and one patient had the hepatitis C genotype 4.

### Frequency of genotypes and alleles

The genotypes and allele frequencies of all the studied SNPs are shown in [Table 1](#). No significant deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was observed in any of the studied SNPs among the HD and the patients with HCV.

The frequency distribution of the *IL1B* rs16944 genotypes T/T, T/C, and C/C were 29%, 46%, and 25% among the patients and 33%, 50%, and 17%, among the HD, respectively ( $p = 0.2$ ). Comparison of *IL1B* C/T rs16944 genotypes between patients with HCV infection and HD showed that carriers homozygote for the C allele seem to be susceptible to HCV infection after adjusting for age  $p_{adj} = 0.054$ , [OR = 1.68 (95% CI = 0.99–2.85)] as shown in [Table 1](#). The other SNPs did show any significant association with susceptibility or resistance to HCV infection ([Table 1](#)).

We stratified the patients with HCV into mild fibrosis ( $<F2$ ) and advanced fibrosis ( $\geq F2$ ) patients to look for if any of the SNP may indicate severity of the disease, as shown in [Table 2](#). We observed that individual's homozygote for the A allele of *CTSB* rs1692816 SNP have mild fibrosis compared to individuals with the C allele  $p = 0.044$  [OR = 0.46 (95% CI = 0.21–1.00)].

Table 1. Relation of allele and genotype frequencies of SNPs with the hepatitis C susceptibility.

Genotype and Allele	HD (n = 203)	Patients (n = 151)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> <sub>adj1</sub>	OR (95% CI)	<i>p</i> <sub>adj2</sub>	Comparisons
<b>IL1β rs16944</b>										
T/T	66 (33%)	44 (29%)	0.242	(R) 1.56 (0.93–2.62)	0.094	(R) 1.68 (0.99–2.85)	0.054	(D) 1.75 (0.83–3.68)	0.138	T/Tvs C/T-C/C T/T-C/T vs C/C T/T-C/C vs C/T
C/T	102 (50%)	70 (46%)								
C/C	35 (17%)	37 (25%)								
T	234 (58%)	158 (52%)	0.159							
C	172 (42%)	144 (48%)								
<b>IL18 rs187238</b>										
C/C	22 (11%)	18 (12%)	0.727	(O) 84 (0.55–1.29)	0.428	(O) 0.86 (0.56–1.32)	0.491	(D) 0.72 (0.36–1.46)	0.363	G/G vs G/C-C/C G/G-G/C vs C/C G/G-C/C vs G/C
C/G	94 (46%)	63 (42%)								
G/G	86 (43%)	68 (46%)								
C	138 (34%)	99 (33%)	0.795							
G	266 (66%)	199 (67%)								
<b>CARD8 rs2009373</b>										
T/T	43 (21%)	28 (19%)	0.418	(D) 0.74 (0.47–1.17)	0.194	(D) 0.74 (0.46–1.18)	0.201	(R) 0.46 (0.18–1.16)	0.098	C/C vs C/T-T/T C/CC/T vs T/T C/C-T/T vs C/T
C/T	105 (52%)	73 (48%)								
C/C	54 (27%)	50 (33%)								
T	191 (47%)	129 (43%)	0.228							
C	213 (53%)	173 (57%)								
<b>CTSB rs1692816</b>										
C/C	56 (28%)	45 (30%)	0.472	(O) 0.85 (0.55–1.29)	0.439	(O) 0.84 (0.55–1.29)	0.420	(O) 0.52 (0.25–1.08)	0.772	C/C vs A/C-A/A C/C-A/C vs A/A C/C-A/A vs A/C
A/C	98 (49%)	67 (44%)								
A/A	48 (24%)	39 (26%)								
C	210 (52%)	157 (52%)	0.998							
A	194 (48%)	145 (48%)								
<b>NLRP3 rs10754558</b>										
G/G	13 (6%)	15 (10%)	0.450	(R) 1.64 (0.75–3.55)	0.211	(R) 1.71 (0.78–3.74)	0.179	(R) 0.55 (0.16–1.91)	0.352	C/C vs C/G-G/G C/C-C/G vs G/G C/C-G/G vs C/G
G/C	74 (36%)	53 (35%)								
C/C	119 (58%)	83 (55%)								
G	100 (24%)	83 (27%)	0.331							
C	312 (76%)	219 (73%)								
<b>AIM2 rs1103577</b>										
T/T	39 (20%)	29 (19%)	0.306	(D) 71 (0.45–1.12)	0.140	(D) 0.69 (0.43–1.10)	0.117	(D) 0.75 (0.35–1.61)	0.461	C/C vs C/T-T/T C/C-C/T vs T/T C/C-T/T vs C/T
T/C	108 (54%)	71 (47%)								
C/C	53 (27%)	51 (34%)								
T	186 (47%)	129 (43%)	0.318							
C	214 (54%)	173 (57%)								

HD: Healthy blood donors. OR: odds ratio. 95% CI: 95% confidence interval.  $P_{adj1}$ : *p* value adjusted by sex.  $P_{adj2}$ : *p* value adjusted by sex and age. The best genetic inheritance model was adopted for each SNP, according to the Akaike Information Criterion (AIC), where C = codominant, D = dominant, R = recessive, O = overdominant. The statistical analyses were conducted using the chi-square test.  $p < 0.05$  is considered significant. Genetic models: Codominant: comparison of homozygote frequency for polymorphic allele, with heterozygote and homozygote for wild allele, simultaneously expressing both alleles. Dominant: Homozygote frequency comparison for wild allele with heterozygote + homozygote for polymorphic allele. Recessive: Comparison of the frequency of Homozygote for wild + heterozygous allele with homozygous for polymorphic allele. Overdominant: Comparison of frequencies Homozygote for wild allele + homozygote for polymorphic allele with heterozygote, which evaluates the heterozygous genotype.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470.t001>

However, when correcting for gender and age, individual's homozygote for the A allele still have 50% less chances of developing advanced fibrosis  $p = 0.091$ ; [OR = 0.50 (95% CI = 0.22–1.13)].



Table 2. Relation of allele and genotype frequencies of SNPs with the fibrosis susceptibility.

Genotype and Allele	<F2	≥F2	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> value	OR (95% CI)	<i>p</i> <sub>adj1</sub>	OR (95% CI)	<i>p</i> <sub>adj2</sub>	Comparisons
<b>IL1β rs16944</b>	(n = 84)	(n = 67)								
T/T	20 (24%)	24 (36%)	0.498	(O) 0.58 (0.30–1.11)	0.095	(D) 0.54 (0.27–1.11)	0.091	(D) 0.51 (0.24–1.08)	0.076	T/Tvs C/T-C/C T/T-C/T vs C/C T/T-C/CvsC/T
C/T	44 (52%)	26 (39%)								
C/C	20 (24%)	17 (25%)								
T	84 (50%)	74 (55%)	0.665							
C	84 (50%)	60 (45%)								
<b>IL18 rs187238</b>	(n = 82)	(n = 67)								
C/C	9 (11%)	9 (13%)	0.720	(O) 0.62 (0.32–1.19)	0.147	(O) 0.61 (0.32–1.19)	0.143	(O) 0.53 (0.26–1.08)	0.075	G/G vs G/C-C/C G/G-G/C vs C/C G/G-C/C vs G/C
C/G	39 (48%)	24 (36%)								
G/G	34 (41%)	34 (51%)								
C	57 (35%)	42 (31%)	0.824							
G	107 (65%)	92 (69%)								
<b>CARD8 rs2009373</b>	(n = 84)	(n = 67)								
T/T	15 (18%)	13 (19%)	0.492	(D) 1.90 (0.94–3.84)	0.069	(D) 1.88 (0.93–3.80)	0.076	(O) 1.72 (0.87–3.39)	0.115	C/C vs C/T-T/T C/C-C/T vs T/T C/C-T/T vs C/T
C/T	36 (43%)	37 (55%)								
C/C	33 (39%)	17 (25%)								
T	66 (39%)	63 (47%)	0.402							
C	102 (61%)	71 (53%)								
<b>CTSB rs1692816</b>	(n = 84)	(n = 67)								
C/C	24 (29%)	21 (31%)	0.389	(R) 0.46 (0.21–1.00)	<b>0.044</b>	(R) 0.46 (0.21–1.00)	<b>0.045</b>	(R) 0.50 (0.22–1.13)	0.091	C/C vs A/C-A/A C/C-A/C vs A/A C/C-A/A vs A/C
A/C	33 (39%)	34 (51%)								
A/A	27 (32%)	12 (18%)								
C	81 (48%)	76 (57%)	0.339							
A	87 (52%)	58 (43%)								
<b>NLRP3 rs10754558</b>	(n = 51)	(n = 67)								
G/G	4 (5%)	11 (16%)	0.072	(C) 0.53 (0.26–1.09)	<b>0.012</b>	0.52 (0.25–1.08)	<b>0.012</b>	(C) 0.47 (0.22–1.01)	<b>0.016</b>	C/C vs C/G-G/G C/C-C/G vs G/G C/C-G/G vs C/G
G/C	36 (43%)	17 (25%)								
C/C	44 (52%)	39 (58%)								
G	44 (26%)	39 (29%)	0.853							
C	124 (74%)	95 (71%)								
<b>AIM2 rs1103577</b>	(n = 84)	(n = 67)								
T/T	14 (17%)	15 (22%)	0.909	(R) 1.44 (0.64–3.25)	0.376	(R) 1.46 (0.65–3.29)	0.363	(R) 1.31 (0.56–3.08)	0.534	C/C vs C/T-T/T C/C-C/T vs T/T C/C-T/T vs C/T
C/T	42 (50%)	29 (43%)								
C/C	28 (33%)	23 (34%)								
T	70 (42%)	59 (44%)	0.918							
C	98 (58%)	75 (56%)								

Fibrosis degree was assessed using METAVIR score. The statistical analyses were conducted using the chi-square test.  $p < 0.05$  is considered significant. OR: odds ratio. 95% CI: 95% confidence interval.  $p_{Adj1}$ : *p* value adjusted by sex.  $p_{Adj2}$ : *p* value adjusted by sex and age. The best genetic inheritance model was adopted for each SNP, according to the Akaike Information Criterion (AIC), where C = codominant, D = dominant, R = recessive, O = overdominant. Genetic models: Codominant: comparison of homozygote frequency for polymorphic allele, with heterozygote and homozygote for wild allele, simultaneously expressing both alleles. Dominant: Homozygote frequency comparison for wild allele with heterozygote + homozygote for polymorphic allele. Recessive: Comparison of the frequency of Homozygote for wild + heterozygous allele with homozygous for polymorphic allele. Overdominant: Comparison of frequencies Homozygote for wild allele + homozygote for polymorphic allele with heterozygote, which evaluates the heterozygous genotype.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470.t002>

**Table 3. Gene-gene interaction between healthy blood donors (n = 202) and patients with hepatitis C (n = 151).**

Gene-gene interaction	p value	Median	p value adjusted	Median	Association with
<b>CARD8 rs2009373 vs IL1B rs16944</b>					
CARD8 C/T: C/T IL1B	<b>0.032</b>	-0.907	<b>0.039</b>	-0.104	Protection
<b>CARD8 rs2009373 vs IL18 rs187238</b>					
CARD8 C/T: G/C IL18	0.056	-0.981	0.059	-0.104	-
<b>CTSB rs1692816 vs AIM2 rs1103577</b>					
CTSB A/C: C/T AIM2	<b>0.002</b>	-0.865	<b>0.008</b>	-0.089	Protection
<b>IL18 rs187238 vs NLRP3 rs10754558</b>					
IL18 G/C: C/G NLRP3	0.092	-0.913	<b>0.005</b>	-0.098	Protection

Median: Median value (Average of minimum and maximum residues) generated by the statistical program R is the parameter that determines whether it is a risk or protection factor. Median values greater than 1 are associated with risk and less than 1 with protection; Adjusted p value: p value adjusted by gender and age.  $p < 0.05$  is considered significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470.t003>

### Gene-gene interaction of the SNPs between healthy blood donors and patients with hepatitis C

To evaluate whether polymorphisms in different genes could have a combined effect and influence susceptibility to HCV infection and/or development of liver fibrosis, we performed a gene-gene interaction analysis. Statistically significant results are reported in Tables 3 and 4.

Gene-gene interaction showed that individuals heterozygotes for both *CARD8* rs2009373 and *IL1B* rs16944 are less prone to hepatitis C development ( $p_{\text{adj}} = 0.039$ ). Similarly, heterozygote carriers for *CTSB* rs1692816 and *AIM2* rs1103577 ( $p_{\text{adj}} = 0.008$ ) or for *IL18* rs187238 and *NLRP3* rs10754558 ( $p_{\text{adj}} = 0.005$ ), have less chances to the development of hepatitis C (Table 3).

### Gene-gene interaction of the SNPs between mild fibrosis (<F2) and advanced fibrosis (≥F2)

In the analysis of gene interaction between subgroups of mild fibrosis (<F2) and advanced fibrosis (≥F2), individuals homozygous for the T allele of *CARD8* rs2009373 and heterozygous for *IL18* rs187238 ( $p_{\text{adj}} = 0.028$ ), have mild form of fibrosis (Table 4).

### Influence of the SNPs on IL1β serum concentration

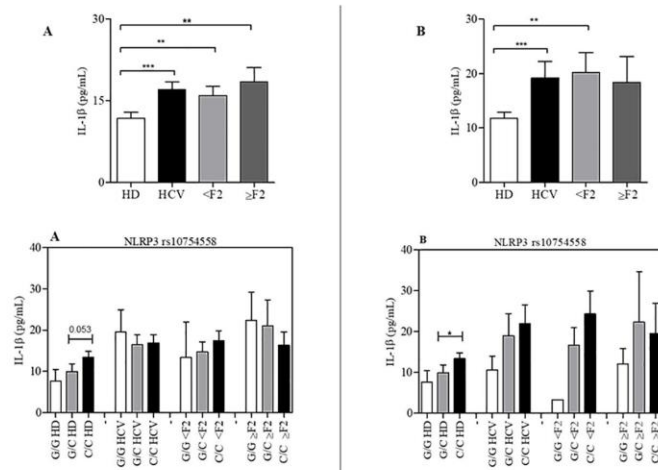
Of all the polymorphisms studied (S1 and S2 Figs), only *NLRP3* rs10754558 showed an influence on the serum cytokine concentration of IL-1β (Fig 1).

**Table 4. Gene-gene interaction between subgroups of patients with hepatitis C (<F2 n = 84 and ≥F2 n = 67) and relation of SNPs with the fibrosis.**

Gene-gene interaction	p value	Median	p value adjusted	Median	Association
<b>CARD8 rs2009373 vs IL18 rs187238</b>					
CARD8 T/T: G/C IL18	0.051	-0.633	<b>0.028</b>	-0.522	Protection
<b>CTSB rs1692816 vs AIM2 rs1103577</b>					
CTSB A/A: C/T AIM2	0.060	-0.417	0.052	-0.413	Protection

Median: Median value (Average of minimum and maximum residues) generated by the statistical program R is the parameter that determines whether it is a risk or protection factor. Median values greater than 1 are associated with risk and less than 1 with protection; Adjusted p value: p value adjusted by gender and age. Fibrosis degree was assessed using METAVIR score.  $p < 0.05$  is considered significant.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470.t004>



**Fig 1. Serum concentration of IL-1 $\beta$  cytokine in patients with hepatitis C.** Treated (A) and untreated (B), stratified according to the degree of hepatic fibrosis, analyzed as a function of the *NLRP3* rs10754558 polymorphisms. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of circulating concentration (pg/mL) of IL-1 $\beta$  cytokine. Statistical analyzes were performed by ANOVA (nonparametric analysis of variance), with Kruskal-Wallis test, followed Dunn's post-test to compare pairs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253470.g001>

Among the HD individuals the *NLRP3* rs10754558 C/C genotype correlated with higher IL-1 $\beta$  levels (mean  $\pm$  SD: 13.39  $\pm$  1.4 pg/mL) compared to the G/G genotype (mean  $\pm$  SD: 7.69  $\pm$  2.0 pg/mL). Similar pattern was observed in patients with hepatitis C, mean circulating IL-1 $\beta$  levels were 21.96  $\pm$  4.5 and 10.62  $\pm$  3.3 pg/mL among the C/C and G/G genotypes, respectively. This pattern holds even after stratification of the patients into mild fibrosis and advanced fibrosis, demonstrating that the *NLRP3* rs10754558 or another polymorphism in linkage disequilibrium with it possibly has an influence on the processing of pro-IL-1 $\beta$ .

Notably, higher levels of IL-1 $\beta$  (Mann-Whitney test,  $p < 0.0001$ ) were observed among patients (mean  $\pm$  SD: 19.24  $\pm$  3 pg/mL) when compared with controls (mean  $\pm$  SD: 11.80  $\pm$  1.0 pg/mL) (Fig 1). Our data show that individuals with the C/C genotype have a higher concentration of IL-1 $\beta$  than those with the G allele.

## Discussion

*NLRP3* inflammasome is a cytoplasmic sensor that, upon activation, recruits various proteins to form a multiprotein complex, activating caspase-1. Caspase-1 process pro-IL1 $\beta$  into IL-1 $\beta$  cytokine. *NLRP3* inflammasome is regulated by caspase recruitment domain 8 (CARD8) [20]. Recently, many studies have evidenced that the *NLRP3* inflammasome is involved in the recognition of HCV and processing pro-IL-1 $\beta$  in liver macrophages and also hepatocytes infected with HCV [26–28].

The genetic background of an individual may affect the control, susceptibility and chronicity of HCV infection [29]. A recent study evaluated 201 Egyptian hepatitis C patients and found that the *IL1B* rs1143629 located in intron A/A genotype was prevalent in HCV patients [OR = 1.7 (95% CI = 1–2.8)] [30]. In this study, we performed the rs16944 that is located in the promoter region at position -511 and showed that individuals with the C/C genotype were prevalent among the patients with HCV and have 58% chances higher of developing hepatitis (OR = 1.58 [95% CI 0.88–2.9]) compared to carriers homozygous for the T allele, suggesting



polymorphisms present in the *IL1B* gene may be associated to the development of hepatitis caused by HCV. Comparing the genotypes with circulating plasma levels of IL-1 $\beta$ , did show any influence of the SNP on the plasma levels.

Interestingly, the *IL1B* rs16944 allele C has been identified as a genetic marker for the development of hepatocarcinoma in patients with chronic HBV infection [31]. Furthermore, genome-wide association study in southwest China revealed 6 new loci, including the rs16944 SNP in the *IL1B* gene, associated with an increased prevalence rate of chronic hepatitis B [32]. Altogether, the rs16944 may be a genetic modifier of hepatitis caused by either HBV or HCV.

We observed higher plasma levels of IL1 $\beta$  among the patients with HCV compared to the HD. Similarly in other studies, higher concentrations of plasma circulating cytokines IL-18 and IL-1 $\beta$  were observed in hepatitis B patients [33]. In hepatitis C virus infection, studies show that serum IL-18 and IL-1 $\beta$  concentrations are higher in patients with chronic HCV infection and HCV-related cirrhosis compared with healthy controls [34–36].

NLRP3 rs10754558 polymorphism (3'UTR region) has been studied in several infectious diseases (HIV-1 and HTLV1 infection) [37, 38], neoplastic processes [39], hematological diseases [40], inflammatory and autoimmune disorders [41, 42]. The NLRP3 rs10754558 variant has been correlated with higher mRNA expression by either altering expression of an enhancer activity or mRNA stability [43]. In this study, individuals with the C/C genotype have a higher concentration of IL-1 $\beta$  than those with the G allele.

In one study among patients with Hepatitis C (sustained virological responders against non-responders groups), the NLRP3 rs10754558 had no influence on treatment [30]. We did not observe any differences in alleles or genotypes frequencies between the HD and the patients. However, heterozygosity for NLRP3 rs10754558 seems to associate with severe disease. The loss of heterozygosity among  $\geq$ F2, a decrease from 43% among the  $<$ F2 compared to 25% among the  $\geq$ F2, may suggest that individual with this genotype dies earlier compared to individuals homozygous for GG or CC. Notably, patients  $\geq$ F2 are older than the patients  $<$ F2. Interestingly, we observed an increase from 5% of the GG genotype among the  $<$ F2 to 16% among the  $\geq$ F2.

Considering that the various components of inflammasomes interact, we evaluated whether polymorphisms located in different genes could interact and have a combined effect on HCV infection and influence the development of liver fibrosis. Gene-gene interaction analysis was performed between cases and controls, as well as comparisons between groups of patients with mild ( $<$ F2) and advanced fibrosis ( $\geq$ F2).

Gene-gene interaction showed that individuals heterozygotes for both *CARD8* rs2009373 and *IL1B* rs16944 are less prone to hepatitis C development ( $p_{\text{adj}} = 0.039$ ). Similarly, heterozygote carriers for *CTSB* rs1692816 and *AIM2* rs1103577 ( $p_{\text{adj}} = 0.008$ ) or for *IL18* rs187238 and *NLRP3* rs10754558 ( $p_{\text{adj}} = 0.005$ ), have less chances to the development of hepatitis C.

In the analysis of gene interaction between subgroups of mild fibrosis ( $<$ F2) and advanced fibrosis ( $\geq$ F2), individuals homozygous for the T allele of *CARD8* rs2009373 and heterozygous for *IL18* rs187238 ( $p_{\text{adj}} = 0.028$ ), have mild form of fibrosis. Altogether, the approach of gene-gene interactions demonstrates that not only one gene but several genes are involved in the development of hepatitis.

The production of cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, resulting from the activation of inflammasomes, can modulate adaptive immune responses in complex and diverse ways. IL-18 stimulates the production of IFN- $\gamma$  and the proliferation of Th1 cells. IL-1 $\beta$  can induce the survival and proliferation of naïve T cells, via positive regulation of the IL-2 receptor. Humoral responses can also be increased by IL-1 $\beta$ , directly via increased proliferation of B cells or indirectly by the positive regulation of costimulatory molecules in T cells [42].

Therefore, the activation of the inflammasome can significantly affect an adaptive immune response, which is necessary for the successful elimination of HCV [26, 44]. However, it is necessary to maintain the balance in these immune responses, to avoid cell damage and tissue impairment, as in the case of patients with chronic hepatitis C, who have a disrupted immune response against HCV [45, 46].

This study has some limitations. Our sample size is small and does not allow intra-comparison of the genotype's combination studied with IL-1 $\beta$  cytokine. However, it showed that the combinations of these polymorphisms seem to influence in the chronic hepatic disease. Further studies are needed to confirm this preliminary finding.

## Conclusion

The present study demonstrated an association between inflammasomes genes and development of hepatitis C. We note that individuals homozygotes for the C allele of the *IL1B* C/T rs16944 seem to be susceptible to HCV infection and individuals homozygote for the A allele still have 50% less chances of developing advanced fibrosis. NLRP3 rs10754558 C/C genotype showed an influence on the serum cytokine concentration of IL-1 $\beta$ . Studies of these genes in different world populations should help understand the importance of these variants in the role of host genetic variability in the clinical presentation and development of hepatitis C and fibrosis hepatic. However, further studies are recommended to confirm our findings.

## Contribution to the field statement

Hepatitis C is an inflammatory liver disease caused by the hepatitis C virus (HCV). Nearly 71 million individuals are estimated to be infected worldwide and around 70% will progress to chronic form of the disease. Since nearly two-third of HCV-infected individuals progress to chronic form of the disease while the rest can eliminate the virus or remain asymptomatic, this suggests that the host genetic background may play an important role in the clinical outcome of HCV infection.

NLRP3 inflammasome is a cytoplasmic sensor that, upon activation, recruits various proteins to form a multiprotein complex, activating caspase-1. Caspase-1 process pro-IL1 $\beta$  into IL-1 $\beta$  cytokine. Recently, many studies have shown that the NLRP3 inflammasome is involved in the recognition of HCV and processing pro-IL-1 $\beta$  in hepatic macrophages and hepatocytes infected with HCV. The production of cytokines IL-1 $\beta$  and IL-18, resulting from the activation of inflammasomes, can modulate immune responses in complex and diverse ways.

We believe that genetic background of an individual, related to inflammasome complex proteins, may affect the control, susceptibility and chronicity of HCV infection, possibly because it influences the magnitude of the antiviral immune response and inflammation during infection, with consequences for the patient's clinical presentation.

## Supporting information

**S1 Fig. Serum concentration of IL-1 $\beta$  cytokine in 151 patients with hepatitis C, stratified according to the degree of hepatic fibrosis, analyzed as a function of the *IL1B* (rs16944), *IL-18* (rs187238), *CARD8* (rs2009373), *CTSB* (rs1692816), *AIM2* (rs1103577) polymorphisms.** Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of circulating concentration (pg/mL) of IL-1 $\beta$  cytokine. Statistical analyzes were performed by ANOVA (nonparametric analysis of variance), with Kruskal-Wallis test, followed by Dunns post-test to compare pairs. (TIF)

**S2 Fig. Serum concentration of IL-1 $\beta$  cytokine of 49 patients with hepatitis C, without treatment, stratified according to the degree of hepatic fibrosis, analyzed as a function of the *IL1 $\beta$*  (rs16944), *IL-18* (rs187238), *CARD8* (rs2009373), *CTSB* (rs1692816), *AIM2* (rs1103577) polymorphisms.** Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of circulating concentration (pg/mL) of IL-1 $\beta$  cytokine. Statistical analyzes were performed by ANOVA (nonparametric analysis of variance), with Kruskal-Wallis test, followed by Dunns post-test to compare pairs.

(TIF)

**S1 Table. Sequences of the probes used for Real Time PCR genotyping.**

(DOCX)

**S2 Table. Primers and PCR conditions for the studied polymorphisms.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We acknowledge the collaboration of Ambulatório de Hepatopatia da Fundação de Medicina Tropical -Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) and laboratory support of the Laboratório de Genômica da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Laboratório de Micologia (INPA) and Laboratório de Imunologia Celular (UFAM).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Diana Mota Toro, Marilú Victória Barbieri, Aya Sadahiro, Andréa Monteiro Tarragô, Adriana Malheiro.

**Data curation:** Diana Mota Toro, Nadja Pinto Garcia, Allyson Guimarães Costa, Aya Sadahiro.

**Formal analysis:** Diana Mota Toro, Rajendranath Ramasawmy, Nadja Pinto Garcia, Flamir Silva Victória, Eduardo Antônio Donadi, Allyson Guimarães Costa, Mauricio Morishi Ogusku, Aya Sadahiro, Andréa Monteiro Tarragô.

**Funding acquisition:** Marilú Victória Barbieri, Allyson Guimarães Costa, Aya Sadahiro, Adriana Malheiro.

**Investigation:** Pedro Vieira Silva Neto, Grenda Leite Pereira, Priscila Santos Sarmento, Hanna Lara Silva Negreiros Dray, Keyla Santos Sousa, Juliana Santos Affonso, Marilú Victória Barbieri, Flamir Silva Victória, Eduardo Antônio Donadi, Mauricio Morishi Ogusku, Aya Sadahiro, Andréa Monteiro Tarragô, Adriana Malheiro.

**Methodology:** Diana Mota Toro, Rajendranath Ramasawmy, Pedro Vieira Silva Neto, Grenda Leite Pereira, Priscila Santos Sarmento, Hanna Lara Silva Negreiros Dray, Keyla Santos Sousa, Juliana Santos Affonso, Jéssica Albuquerque Silva, Nadja Pinto Garcia, Marilú Victória Barbieri, Flamir Silva Victória, Eduardo Antônio Donadi, Mauricio Morishi Ogusku, Aya Sadahiro, Andréa Monteiro Tarragô, Adriana Malheiro.

**Supervision:** Andréa Monteiro Tarragô.

**Writing – original draft:** Diana Mota Toro, Allyson Guimarães Costa, Andréa Monteiro Tarragô, Adriana Malheiro.



**Writing – review & editing:** Rajendranath Ramasawmy, Marilú Victória Barbieri, Eduardo Antônio Donadi.

## References

1. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis. Div Viral Hepat Natl Cent HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, TB Prev [Internet]. 2015 [cited 2017 Nov 10];Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/>>. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255016/1/9789241565455-eng.pdf?ua=1>
2. WHO. World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection. Updated version. April 2016a. Glob Hepat Program Dep HIV/AIDS. 2016;(Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615_eng.pdf?ua=1)>):11.
3. Tsukada S, Westwick JK, Ikejima K, Sato N, Rippe RA. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2005; 280(11):10055–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647278> <https://doi.org/10.1074/jbc.M409381200> PMID: 15647278
4. Fibbi G, Pucci M, D'Alessio S, Grappone C, Pellegrini G, Salzano R, et al. Transforming growth factor beta-1 stimulates invasivity of hepatic stellate cells by engagement of the cell-associated fibrinolytic system. *Growth Factors*. 2001; 19(2):87–100. <https://doi.org/10.3109/08977190109001078> PMID: 11769974
5. Wells RG, Kruglov E, Dranoff JA. Autocrine release of TGF- $\beta$  by portal fibroblasts regulates cell growth. *FEBS Lett*. 2004; 559(1–3):107–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(04\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(04)00037-7) PMID: 14960316
6. Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-Kudła B. Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* [Internet]. 2013; 64(5):384–96. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L370383136%5Cnhttp://dx.doi.org/10.5603/EP.2013.0022> PMID: 24186596
7. Iwaisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris T, Park T, et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014; 111(32):E3297–305. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1400062111> PMID: 25074909
8. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013; 3(4):1473–92. <https://doi.org/10.1002/cphy.c120035> PMID: 24265236
9. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2013; 58(4):1461–73. <https://doi.org/10.1002/hep.26429> PMID: 23553591
10. Tian Z, Shen X, Feng H, Gao B. IL-1 $\beta$  Attenuates IFN- $\alpha$  $\beta$ -Induced Antiviral Activity and STAT1 Activation in the Liver: Involvement of Proteasome-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2000; 165(7):3959–3965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3959> PMID: 11034404
11. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I Interferon Inhibits Interleukin-1 Production and Inflammasome Activation. *Immunity*. 2011; 34(2):213–23. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.006> PMID: 21349431
12. Mirza S, Siddiqui AR, Hamid S, Umar M, Bashir S. Extent of liver inflammation in predicting response to interferon  $\alpha$  & Ribavirin in chronic hepatitis C patients: a cohort study. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12(1):71.
13. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* [Internet]. 2013; 39(6):1003–18. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.010> PMID: 24332029
14. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* [Internet]. 2014; 157(5):1013–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007> PMID: 24855941
15. Bauernfeind F, Horvath G, Stutz A, Alnemri E, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* [Internet]. 2009; 183(2):787–91. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901363> PMID: 19570822
16. Franchi L, Eigenbrod T, Nunez G. Cutting Edge: TNF- Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol* [Internet]. 2009; 183(2):792–6. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0900173> PMID: 19542372
17. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LA., Opitz B, Van Der Meer JH., et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and

- macrophages. *Blood*. 2009; 113(10):2324–35. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-146720> PMID: 19104081
18. Gurung P, Subbarao Malireddi R, Anand PK, Demon D, Vande Walle L, Liu Z, et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. *J Biol Chem*. 2012; 287(41):34474–83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401406> PMID: 22898816
  19. Tsutsui H, Imamura M, Fujimoto J, Nakanishi K. The TLR4/TRIF-mediated activation of NLRP3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice. *Gastroenterol Res Pract*. 2010;11. <https://doi.org/10.1155/2010/641865> PMID: 20634907
  20. Ito S, Hara Y, Kubota T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/ar4483> PMID: 24517500
  21. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* [Internet]. 2016; 13(2):148–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26549800> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4786634> <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.95> PMID: 26549800
  22. Eklund D, Welin A, Andersson H, Verma D, Söderkvist P, Stendahl O, et al. Human gene variants linked to enhanced NLRP3 activity limit intramacrophage growth of mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*. 2014; 209(5):749–53. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit572> PMID: 24158955
  23. Razmara M, Srinivasula SM, Wang L, Poyet JL, Geddes BJ, Distefano PS, et al. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. *J Biol Chem*. 2002; 277(16):13952–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107811200> PMID: 11821383
  24. Health BM of. *Protocolo Clínico e Diretrizes terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções*. Cadernos do Ministério da Saúde. 2018.
  25. Tarragô AM, da Silva Neto PV, Ramasawmy R, Pereira GL, Toro DM, de Amorim Xabregas L, et al. Combination of genetic polymorphisms in TLR influence cytokine profile in HCV patients treated with DAAs in the State of Amazonas. *Cytokine*. 2020; 130:155052. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155052> PMID: 32179425
  26. Burdette D, Haskett A, Presser L, McRae S, Iqbal J, Waris G. Hepatitis C virus activates interleukin-1B via caspase-1-inflammasome complex. *J Gen Virol*. 2012; 93(2):235–46.
  27. Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N, et al. IL-1 $\beta$  Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLoS Pathog*. 2013; 9(4):1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003330> PMID: 23633957
  28. Chen W, Xu Y, Li H, Tao W, Xiang Y, Huang B, et al. HCV genomic RNA activates the NLRP3 inflammasome in human myeloid cells. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084953> PMID: 24400125
  29. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5(3):2015–29. <https://doi.org/10.1038/nri1573> PMID: 15738952
  30. Estfanous SZ, Ali SA, Seif SM, Soror SHA, Abdelaziz DH. Inflammasome Genes' Polymorphisms in Egyptian Chronic Hepatitis C Patients: Influence on Vulnerability to Infection and Response to Treatment. *Mediators Inflamm*. 2019; <https://doi.org/10.1155/2019/3273645> PMID: 30728751
  31. Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, Tangkijvanich P, Poovorawan Y. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006; 12(5):776–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4066131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i5.776> PMID: 16521194
  32. Qiu B, Jiang W, Olyae M, Shimura K, Miyakawa A, Hu H, et al. Advances in the genome-wide association study of chronic hepatitis B susceptibility in Asian population. *European Journal of Medical Research*. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40001-017-0288-3> PMID: 29282121
  33. Amirpour-Rostami S, Arababadi MK. IL-18 and IL-1 $\beta$  Gene Polymorphisms: The Plausible Risk Factors for Chronic Hepatitis B. *Viral Immunol*. 2019; 32(5). <https://doi.org/10.1089/vim.2018.0155> PMID: 31084469
  34. Lapinski T. The levels of IL-1beta, IL-4 and IL-6 in the serum and the liver tissue of chronic HCV-infected patients. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2001; 49:311–6. PMID: 11726034
  35. Chattergoon MA, Levine JS, Latanich R, Osburn WO, Thomas DL, Cox AL. High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2011; 204:1730–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir642> PMID: 21984735



36. Vecchiet J, Falasca K, Cacciatore P, Zingariello P, Dalessandro M. Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Clin Lab Sci*. 2005; 35:415–422. PMID: [16254258](#)
37. Kamada AJ, Pontillo A, Guimarães RL, Loureiro P, Crovella S, Brandão LAC. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T-lymphotropic virus 1 infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(7). PMID: [25411003](#)
38. Pontillo A, Brandão LA, Guimarães RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 54(3):236–40. <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181dd17d4> PMID: [20502346](#)
39. Borelli V, Moura RR, Trevisan E, Crovella S. NLRP1 and NLRP3 polymorphisms in mesothelioma patients and asbestos exposed individuals a population-based autopsy study from North East Italy. *Infect Agent Cancer*. 2015; 10(26). <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0022-0> PMID: [26236392](#)
40. Mian SA, Kulasekararaj AG, Kizilers A, McGraw KL, Kordasti S, Menzel S, et al. NLRP3 Inflammasome Polymorphisms Are Enriched in Myelodysplastic Syndrome Patients with Autoimmune Disorders. *Blood*. 2015; 126(23):1659.
41. Zhou D, Wang X, Chen T, Wen W, Liu Y, Wu Y, et al. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the Chinese Han population. *Biomed Res Int*. 2016; <https://doi.org/10.1155/2016/3185397> PMID: [27110561](#)
42. Shaw PJ, McDermott MF, Kanneganti TD. Inflammasomes and autoimmunity. *Trends Mol Med*. 2011; 17(2). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.11.001> PMID: [21163704](#)
43. Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol [Internet]*. 2009; 124(4):779–785.e6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.044> PMID: [19767079](#)
44. Heim MH, Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J Hepatol*. 2014; <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.06.035> PMID: [25443342](#)
45. Amir M, Czaja MJ. Inflammasome-mediated inflammation and fibrosis: It is more than just the IL-1 $\beta$ . *Hepatology*. 2018; 67(2):479–481. <https://doi.org/10.1002/hep.29491> PMID: [28862748](#)
46. De Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, Da Costa AG, Pimentel JPD, Pires EF, 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 Microbe-host interactions and microbial pathogenicity. *BMC Microbiol*. 2016; 16(3).

**EQUIPE DO PROJETO**

	<b>Integrantes (Ordem alfabética)</b>	<b>Categoria</b>	<b>Instituição</b>	<b>Formação</b>	<b>Função no projeto</b>
01	Adriana Malheiro Alle Marie	Pesquisadora, PhD	UFAM/ HEMOAM	Bióloga	Orientadora
02	Aya Sadahiro	Pesquisadora, PhD	UFAM	Farmacêutica- Bioquímica	Coorientadora
03	Allyson Guimarães da Costa	PhD	UFAM/ HEMOAM	Enfermeiro	Colaborador
04	Andréa Monteiro Tarragô	Doutoranda	UFAM/ HEMOAM	Farmacêutica- Bioquímica	Captação de pacientes e doadores de sangue e análises dos dados
05	Diana Mota Toro	Mestranda	UFAM	Biomédica	Desenvolver o projeto
06	Flamir da Silva Victória	Pesquisador, P hD	FMT-HVD	Médico Gastroenterologi sta	Captação de pacientes
07	Grenda Leite Pereira	Mestranda	UFAM	Biomédica	Captação de pacientes e doadores de sangue
08	Marilú Barbieri Victória	Pesquisadora, PhD	FMT-HVD	Médica Infectologista	Captação de pacientes
09	Mauricio Morishi Ogusku	Pesquisador, PhD	UFAM/ INPA	Farmacêutico- Bioquímico	Genotipagem
10	Nadja Pinto Garcia	Pesquisadora, PhD	HEMOAM	Farmacêutica- Bioquímica	Colaboradora
11	Pedro Vieira da Silva Neto	Mestrando	UFAM	Biomédico	Dosagem de citocinas.
12	Priscila de Sousa Sarmiento	Mestranda	UFAM	Biomédica	Captação de pacientes e doadores de sangue

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAKEEM, M.; SHOUKRY, N. Protective immunity against hepatitis C: Many shades of gray. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 274, 2014.

ADINOLFI, E. et al. The P2X7 receptor: a main player in inflammation. **Biochemical Pharmacology**, 2017.

AFZAL, M. S. et al. Analysis of interleukin-10 gene polymorphisms and hepatitis C susceptibility in Pakistan. **Journal of Infection in Developing Countries**, 2011.

AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Pnas**, v. 96, n. 22, p. 12766–12771, 1999.

AGOSTINI, L. et al. NALP3 forms an IL-1 $\beta$ -processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 319–325, 2004.

ANDRÉ, P. et al. Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. **Journal of viral hepatitis**, v. 76, n. 16, p. 6919–6928, 2002.

APPEL, N. et al. Essential role of domain III of nonstructural protein 5A for hepatitis C virus infectious particle assembly. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 3, 2008.

ARAÚJO, A. R. 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, p. 638–640, 2011.

ARNAUD, N. et al. Hepatitis C virus reveals a novel early control in acute immune response. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 10, p. 1–17, 2011.

ARSHAD, M. I.; PIQUET-PELLORCE, C.; SAMSON, M. IL-33 and HMGB1 alarmins: Sensors of cellular death and their involvement in liver pathology. **Liver International**, v. 32, n. 8, p. 1200–1210, 2012.

ARTHUR, M. Fibrogenesis II. Metalloproteases and their Inhibitors in liver fibrosis. **Am J Physiol, Gastrointes Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G245–G249, 2000.

BACHMANN, M.; PFEILSCHIFTER, J.; MÜHL, H. A prominent role of interleukin-18 in acetaminophen-induced liver injury advocates its blockage for therapy of hepatic necroinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 161, p. 1–7, 2018.

BANKWITZ, D. et al. Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 11, p. 5751–5763, 2010.

BARTENSCHLAGER, R. et al. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. **Cell Press**, v. 19, n. 2, p. 95–103, 2011.

BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN, V.; PENIN, F. The molecular and structural basis of

advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 7, p. 482–496, 2013.

BARTOSCH, B. et al. An interplay between hypervariable region 1 of the hepatitis C virus E2 glycoprotein, the scavenger receptor BI, and high-density lipoprotein promotes both enhancement of Infection and Protection against Neutralizing Antibodies. **Journal of virology**, v. 79, n. 13, p. 8217–8229, 2005.

BATALLER, R.; BRENNER, D. Liver fibrosis. **The journal of clinical investigation**, v. 115, n. 2, p. 209–218, 2005.

BATALLER, R.; NORTH, K. E.; BRENNER, D. A. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: A critical appraisal. **Hepatology**, v. 37, n. 3, p. 493–503, 2003.

BAUERNEFEIND, F. et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 787–791, 2009.

BELDI, G. et al. The role of purinergic signaling in the liver and in transplantation: effects of extracellular nucleotides on hepatic graft vascular injury, rejection and metabolism. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 2588–603, 2008.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. **Pathways of Antigen Processing**. [s.l: s.n.]. v. 31

BOLTJES, A. et al. **The role of Kupffer cells in hepatitis B and hepatitis C virus infections** **Journal of Hepatology**, 2014.

BOUCHIER-HAYES, L. et al. CARDINAL, a Novel Caspase Recruitment Domain Protein, Is an Inhibitor of Multiple NF-κB Activation Pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 47, p. 44069–44077, 2001.

BOULANT, S. et al. Structural determinants that target the hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 31, p. 22236–47, 2006.

BOWEN, D. G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 946–952, 2005.

BRADSHAW, D.; MATTHEWS, G.; DANTA, M. Sexually transmitted hepatitis C infection: The new epidemic in MSM? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 1, p. 66–72, 2013.

BRASIL, M. DA S. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. Brasília - DF: [s.n.].

BRASIL, M. DA S. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância e Saúde. [s.l: s.n.].

BRAZZOLI, M. et al. CD81 Is a Central Regulator of Cellular Events Required for Hepatitis C Virus Infection of Human Hepatocytes. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8316–8329, 2008.

BRUBAKER, S. W. et al. Innate Immune Pattern Recognition: A Cell Biological Perspective. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 257–290, 2015.

BÜRCKSTÜMMER, T. et al. An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. **Nature Immunology**, v. 10, n. 3, p. 266–272, 2009.

BURDETTE, D. et al. Hepatitis C virus activates interleukin-1B via caspase-1-inflammasome complex. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 2, p. 235–246, 2012.

CALATTINI, S. et al. Functional and biochemical characterization of hepatitis C virus (HCV) particles produced in a humanized liver mouse model. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 38, p. 23173–23187, 2015.

CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 41–49, 2005.

CANBAY, A. et al. Kupffer Cell Engulfment of Apoptotic Bodies Stimulates Death Ligand and Cytokine Expression. **Hepatology**, v. 38, n. 5, p. 1188–1198, 2003.

CAO, X. et al. MDA5 plays a critical role in interferon response during hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 62, n. 4, p. 771–778, 2015.

CARAMBIA, A. et al. TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 3, p. 594–599, 2014.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis. **Division of Viral Hepatitis and National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention**, p. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hepatitis/hcv/>>, 2015.

CHAN, J. K. et al. **Alarmins: Awaiting a clinical response** **Journal of Clinical Investigation**, 2012.

CHANG, S.; DOLGANIUC, A.; SZABO, G. Toll-like receptors 1 and 6 are involved in TLR2-mediated macrophage activation by hepatitis C virus core and NS3 proteins. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 3, p. 479–487, 2007.

CHEN, H. et al. Differential Activation of NLRP3, AIM2, and IFI16 Inflammasomes in Humans with Acute and Chronic Hepatitis B. **Viral Immunology**, 2018.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J. HCV Genome and Life Cycle. In: **Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology**. UK: Norfolk; In: Tan SL, editor. [s.l.: s.n.]. p. 5–47.

CHOO, Q. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359–362, 1989.

CUI, Q.; FU, S.; LI, Z. Hepatocyte growth factor inhibits TGF- $\beta$ 1-induced myofibroblast differentiation in tendon fibroblasts: Role of AMPK signaling pathway. **Journal of Physiological Sciences**, v. 63, n. 3, p. 163–170, 2013.

DE IUDICIBUS, S. et al. Genetic Predictors of Glucocorticoid Response in Pediatric Patients With Inflammatory Bowel Diseases. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 1, p.

e1–e7, 2011.

DE TORRE-MINGUELA, C.; DEL CASTILLO, P. M.; PELEGRÍN, P. The NLRP3 and pyrin inflammasomes: Implications in the pathophysiology of autoinflammatory diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JAN, 2017.

DI VIRGILIO, F. et al. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. **Immunity**, v. 47, n. 1, p. 15–31, 2017.

DING, J. et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 111–116, 2016.

DING, Q.; SCHAEWEN, M.; PLOSS, A. The impact of hepatitis C virus entry on viral tropism. **Cell Host Microbe**, v. 16, n. 5, p. 562–568, 2014.

DODGE, J. L.; TERRAULT, N. A. Sexual transmission of hepatitis C: A rare event among heterosexual couples. **J Coagul Disord**, v. 4, n. 1, p. 38–39, 2014.

DOSTERT, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. **Science**, v. 320, n. 5876, p. 674–677, 2008.

DOUAM, F.; LAVILLETTE, D.; COSSET, F.-L. The Mechanism of HCV Entry into Host Cells. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 129, p. 63–107, 2015.

EASL, E. A. FOR THE S. OF THE L. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2016. **Journal of Hepatology**, v. 66, n. 1, p. 153–194, 2017.

EL-HAGE, N.; LUO, G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 10, p. 2761–2769, 2003.

EL-SERAG, H. **Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma** *Gastroenterology*, 2012.

ELLIOTT, J. M. et al. Crystal structure of procaspase-1 zymogen domain reveals insight into inflammatory caspase autoactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 10, p. 6546–6553, 2009.

ENGLEZOU, P. C. et al. P2X7R activation drives distinct IL-1 responses in dendritic cells compared to macrophages. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 293–304, 2015.

EVAVOLD, C. L. et al. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. **Immunity**, v. 48, n. 1, p. 35–44, 2018.

FAUSTHER, M.; GONZALES, E.; DRANOFF, J. A. Role of purinergic P2X receptors in the control of liver homeostasis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling**, v. 1, n. 3, p. 341–348, 2012.

FELDMEYER, L. et al. The Inflammasome Mediates UVB-Induced Activation and Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Keratinocytes. **Current Biology**, v. 17, n. 13, p. 1140–1145, 2007.

FELICES, M. et al. Functional NK Cell Repertoires Are Maintained through IL-2R and Fas

Ligand. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 8, p. 3889–3897, 2014.

FIBBI, G. et al. Transforming growth factor beta-1 stimulates invasivity of hepatic stellate cells by engagement of the cell-associated fibrinolytic system. **Growth Factors**, v. 19, n. 2, p. 87–100, 2001.

FLOREANI, A. Hepatitis C and pregnancy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 40, p. 6714–6720, 2013.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 4, p. 330–336, 2003.

FOY, E. et al. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 8, p. 2986–2991, 2005.

FRANCHI, L. et al. Cytosolic Double-Stranded RNA Activates the NLRP3 Inflammasome via MAVS-Induced Membrane Permeabilization and K<sup>+</sup> Efflux. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 8, p. 4214–4222, 2014.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; NUNEZ, G. Cutting Edge: TNF- Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 792–796, 2009.

FU, S. et al. TGF- $\beta$  induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. **American Journal of Transplantation**, v. 4, n. 10, p. 1614–1627, 2004.

GARLANDA, C.; DINARELLO, C. A.; MANTOVANI, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 2013.

GASTAMINZA, P.; KAPADIA, S. B.; CHISARI, F. V. Differential Biophysical Properties of Infectious Intracellular and Secreted Hepatitis C Virus Particles. **Journal of Virology**, v. 80, n. 22, p. 11074–11081, 2006.

GATTONI, A. et al. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (1 of 2 parts). **Clin Ter**, v. 157, n. 4, p. 377–386, 2006.

GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399–401, 2009.

GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. **Seminars in Liver Disease**, v. 21, n. 3, p. 311–335, 2001.

GERMI, R. et al. Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. **Journal of Medical Virology**, v. 68, n. 2, p. 206–215, 2002.

GICQUEL, T. et al. IL-1 $\beta$  production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. **FASEB J**, v. 29, n. 10, p. 4162–4173, 2015.

GORDILLO, M.; EVANS, T.; GOUON-EVANS, V. Orchestrating liver development.

**Development**, v. 142, n. 12, p. 2094–2108, 2015.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1, p. S45–S57, 2014.

GRASSI, G. et al. Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 1953–1965, 2016.

GUMUCIO, D. L. et al. Fire and ICE: The role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 20, n. 4 SUPPL. 26, 2002.

GUO, Z. et al. DCs pulsed with novel HLA-A2-restricted CTL epitopes against hepatitis C virus induced a broadly reactive anti-HCV-specific T lymphocyte response. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

GURUNG, P. et al. Toll or interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF)-mediated caspase-11 protease production integrates toll-like receptor 4 (TLR4) protein- and Nlrp3 inflammasome-mediated host defense against enteropathogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34474–34483, 2012.

HAJARIZADEH, B.; GREBELY, J.; DORE, G. J. Epidemiology and natural history of HCV infection. **Nature Publishing Group**, v. 10, n. 9, p. 553–562, 2013.

HE, W. T. et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 $\beta$  secretion. **Cell Research**, v. 25, n. 12, p. 1285–1298, 2015.

HE, Y.; HARA, H.; NÚÑEZ, G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 12, p. 1012–1021, 2016.

HELLE, F.; DUVERLIE, G.; DUBUISSON, J. The hepatitis C virus glycan shield and evasion of the humoral immune response. **Viruses**, v. 3, n. 10, p. 1909–1932, 2011.

HERTER, J.; ZARBOCK, A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 9, p. 4451–4457, 2013.

HEYMANN, F.; TACKE, F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 2, p. 88–110, 2016.

HIRANKARN, N. et al. Interleukin-1beta gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection. **World journal of gastroenterology**, v. 12, n. 5, p. 776–9, 2006.

HOFFMAN, B.; LIU, Q. Hepatitis C viral protein translation: Mechanisms and implications in developing antivirals. **Liver International**, v. 31, n. 10, p. 1449–1467, 2011.

HOFFMAN, H. M. et al. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nature Genet**, v. 29, n. 3, p. 301–305, 2001.

HORNER, S. M.; GALE, M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 879–888, 2013.



HORNUNG, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 847–856, 2008.

ICHINOHE, T.; PANG, I. K.; IWASAKI, A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 404–410, 2010.

ICTV. **ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Master Species List (MSL)**. Acesso: January, 2017, 2016.

ITO, S.; HARA, Y.; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. **Arthritis Research and Therapy**, v. 16, n. 1, p. 1–11, 2014.

IWAISAKO, K. et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 32, p. E3297–E3305, 2014.

JENKO, B. et al. NLRP3 and CARD8 polymorphisms influence higher disease activity in rheumatoid arthritis. **Journal of Medical Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 319–323, 2016.

JEULIN, H. et al. Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 5, p. 654–64, 2013.

JIANG, S. et al. Potentiation of hepatic stellate cell activation by extracellular ATP is dependent on P2X7R-mediated NLRP3 inflammasome activation. **Pharmacological Research**, v. 117, p. 82–93, 2017.

JO, E.-K. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular & molecular immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–59, 2016.

JU, C.; TACKE, F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: From pathogenesis to novel therapeutic strategies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 3, p. 316–327, 2016.

JULIANA, C. et al. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36617–36622, 2012.

KAGAN, J. C.; MAGUPALLI, V. G.; WU, H. SMOCs: Supramolecular organizing centres that control innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 12, p. 821–826, 2014.

KAJDANIUK, D. et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) in physiology and pathology. **Endokrynologia Polska**, v. 64, n. 5, p. 384–396, 2013.

KAMBAYASHI, T.; LAUFER, T. M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: Can anything replace a dendritic cell? **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 719–730, 2014.

KANTO, T.; HAYASHI, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Internal medicine (Tokyo, Japan)**, v. 45, n. 4, p. 183–191, 2006.

KARAM, P. et al. Dynamics of hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase

NS5B in complex with RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 20, p. 14399–14411, 2014.

KAWAI, T. et al. Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. **Nature Immunology**, v. 5, n. 10, p. 1061–1068, 2004.

KAYAGAKI, N. et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 117–121, 2011.

KAYAGAKI, N. et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. **Nature**, v. 526, n. 7575, p. 666–671, 2015.

KERUR, N. et al. IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. **Cell Host and Microbe**, v. 9, n. 5, p. 363–375, 2011.

KESAVARDHANA, S.; KANNEGANTI, T. D. Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction. **International Immunology**, v. 29, n. 5, p. 201–210, 2017.

KIM, S.; KIM, S. Y. Signaling of high mobility group box 1 (HMGB1) through toll-like receptor 4 in macrophages requires CD14. **Molecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1, 2013.

KOVACS, S. B.; MIAO, E. A. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 9, p. 673–684, 2017.

KREKULOVA, L.; REHAK, V.; RILEY, L. Structure and functions of hepatitis C virus proteins: 15 years after. **Folia Microbiol**, v. 51, n. 6, p. 665–680, 2006.

KRETZER, I. F. et al. Hepatitis C worldwide and in Brazil: Silent epidemic - Data on disease including incidence, transmission, prevention, and treatment. **The ScientificWorld Journal**, v. 2014, n. 827849, p. 10, 2014.

KURTS, C.; ROBINSON, B.; KNOLLE, P. Cross-priming in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 403–414, 2010.

LABBÉ, K.; SALEH, M. Cell death in the host response to infection. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 9, p. 1339–1349, 2008.

LAMBOTIN, M. et al. A look behind closed doors: Interaction of persistent viruses with dendritic cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 350–360, 2010.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**, v. 157, n. 5, p. 1013–1022, 2014.

LAMKANFI, M.; MALIREDDI, R. K. S.; KANNEGANTI, T. D. Fungal zymosan and mannan activate the Cryopyrin inflammasome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20574–20581, 2009.

LARRUBIA, J. et al. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 13, p. 3418–3430, 2014.

- LAU, H. K. et al. Association between interleukin-18 polymorphisms and hepatocellular carcinoma occurrence and clinical progression. **International Journal of Medical Sciences**, v. 13, n. 7, p. 556–561, 2016.
- LEE, B. H. et al. Activation of P2X(7) receptor by ATP plays an important role in regulating inflammatory responses during acute viral infection. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35812, 2012.
- LEE, S. H.; MIYAGI, T.; BIRON, C. A. Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 6, p. 252–259, 2007.
- LEMBERG, M. K.; MARTOGLIO, B. Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. **Molecular Cell**, v. 10, n. 4, p. 735–744, 2002.
- LEMOINNE, S. et al. Origins and functions of liver myofibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 7, p. 948–954, 2013.
- LI, K. et al. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus-infected hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis C virus double-stranded RNA intermediates. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 666–675, 2012.
- LIEPINSH, E. et al. The death-domain fold of the ASC PYRIN domain, presenting a basis for PYRIN/PYRIN recognition. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, n. 5, p. 1155–1163, 2003.
- LIN, X. Y.; CHOI, M. S. K.; PORTER, A. G. Expression analysis of the human caspase-1 subfamily reveals specific regulation of the CASP5 gene by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 39920–39926, 2000.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 10, p. 688–700, 2013.
- LIU, X. et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 153–158, 2016.
- LO, C. et al. The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters. **Journal of Virology**, v. 89, n. 15, p. 7506–7520, 2015.
- LÓPEZ-NAVARRETE, G. et al. Th2-associated alternative Kupffer Cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. **International Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 9, p. 1273–1286, 2011.
- LU, A. et al. Unified polymerization mechanism for the assembly of ASC-dependent inflammasomes. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1193–1206, 2014.
- LUEDDE, T.; SCHWABE, R. F. NF- $\kappa$ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 108–118, 2011.
- LUPSOR, M. et al. Non-Invasive Evaluation of Liver Steatosis , Fibrosis and Cirrhosis in Hepatitis C Virus Infected Patients Using Unidimensional Transient Elastography (Fibroscan®). **Liver Biopsy - Indications, Procedures, Results**, p. 300, 2012.

- MACHIDA, K. et al. Hepatitis C Virus Induces Toll-Like Receptor 4 Expression, Leading to Enhanced Production of Beta Interferon and Interleukin-6. **Journal of viral hepatitis**, v. 80, n. 2, p. 866, 2006.
- MAGITTA, N. et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. **Genes and Immunity**, v. 10, n. 2, p. 120–124, 2009.
- MAGRI, M. C. et al. Prevalence of hepatitis C virus in Brazil's inmate population: A systematic review. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, p. 1–10, 2015.
- MAN, S. M.; KANNEGANTI, T. D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 1, p. 7–21, 2016.
- MANCINI, R.; BENEDETTI, A.; JEZEQUEL, A. M. An interleukin-1 receptor antagonist decreases fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rat liver. **Virchows Archiv**, v. 424, n. 1, p. 25–31, 1994.
- MANNS, M. P. et al. Hepatitis C virus infection. **Nature Reviews**, v. 3, n. 17006, p. 1–19, 2017.
- MANTHIRAM, K. et al. The monogenic autoinflammatory diseases define new pathways in human innate immunity and inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 832–842, 2017.
- MAO, L. et al. Loss-of-Function CARD8 Mutation Causes NLRP3 Inflammasome Activation and Crohn's Disease. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 82, 2018.
- MARIATHASAN, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 228–232, 2006.
- MARTINON, F. et al. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. **Nature**, v. 440, n. 7081, p. 237–241, 2006.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.
- MCGARVEY, M.; HOUGHTON, M. Structure and molecular virology. In: Thomas H, Lemon S, Zuckerman A, editors. **Viral Hepatitis 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing**, v. 3, p. 381–406, 2005.
- MCGOVERN, D. P. B. et al. TUCAN (CARD8) Genetic Variants and Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 131, n. 4, p. 1190–1196, 2006.
- MCLAUHLAN, J. et al. Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets. **The EMBO journal**, v. 21, n. 15, p. 3980–8, 2002.
- MEDERACKE, I. et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. **Nature Communications**, v. 4, 2013.
- MESSINA, J. P. et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes.

**Hepatology**, v. 61, n. 1, p. 77–87, 2015.

METZ, P. et al. Interferon-stimulated genes and their role in controlling hepatitis C virus. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 1331–1341, 2013.

MINCIS, M. Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento. São Paulo. **Casa Leitura Médica**, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, B. **Boletim epidemiológico. Hepatites Virais. Secretaria de Vigilância e Saúde. Ministério da Saúde**. Brasília - DF: [s.n.].

MIYANARI, Y. et al. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 9, p. 1089–1097, 2007.

MORADPOUR, D.; PENIN, F.; RICE, C. M. Replication of hepatitis C virus. **Nature Microbiology**, v. 5, n. June, p. 453–463, 2007.

MOREIRA, S. T. et al. Influence of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms on the degree of liver damage in patients with chronic hepatitis C. **Meta Gene**, v. 9, p. 90–96, 2016.

MORIKAWA, H. Real-Time Tissue Elastography and Transient Elastography for Evaluation of Hepatic Fibrosis. **Journal of Gastroenterology**, v. 46, n. 3, p. 350–358, 2011.

MUÑOZ-PLANILLO, R. et al. K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. **Immunity**, v. 38, n. 6, p. 1142–1153, 2013.

MURPHY, D. G. et al. Hepatitis C virus genotype 7, a new genotype originating from Central Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 967–972, 2015.

NEGASH, A. A. et al. IL-1 $\beta$  Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2013.

NETEA, M. G. et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. **Blood**, v. 113, n. 10, p. 2324–2335, 2009.

NIELSEN, S. U. et al. Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 10, p. 2507–2517, 2008.

NISHITSUJI, H. et al. Hepatitis C virus infection induces inflammatory cytokines and chemokines mediated by the cross talk between hepatocytes and stellate cells. **Journal of virology**, v. 87, n. 14, p. 8169–78, 2013.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiological reviews**, v. 82, n. 4, p. 1013–1067, 2002.

O'KEEFFE, M.; MOK, W. H.; RADFORD, K. J. Human dendritic cell subsets and function in health and disease. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, n. 22, p. 4309–25, 2015.

- OKAMOTO, K. et al. Intramembrane Proteolysis and Endoplasmic Reticulum Retention of Hepatitis C Virus Core Protein. **Society**, v. 78, n. 12, p. 6370–6380, 2004.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Purinergic signalling during sterile liver injury. **Liver International**, v. 33, n. 3, p. 353–361, 2013.
- OLIVEIRA, L. C. DE et al. Frequency of single nucleotide polymorphisms of some immune response genes in a population sample from São Paulo, Brazil. **Einstein (São Paulo)**, v. 9, n. 3, p. 359–366, 2011.
- PALOMO, J. et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 25–37, 2015.
- PARAMEL, G.; SIRSJÖ, A.; FRANSEN, K. Role of genetic alterations in the NLRP3 and CARD8 genes in health and disease. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- PATHAN, N. et al. TUCAN, an Antiapoptotic Caspase-associated Recruitment Domain Family Protein Overexpressed in Cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 34, p. 32220–32229, 2001.
- PEREIRA, L. M. M. B. et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 60, 2013.
- PÉTRILLI, V. et al. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 9, p. 1583–1589, 2007.
- PINTO, F. et al. Prevalence of hepatitis B and C markers in a population of an urban university in Rio de Janeiro, Brazil: a cross-sectional study. **Ann Hepatol**, v. 14, n. 6, p. 815–25, 2015.
- PLACE, D. E.; KANNEGANTI, T. D. Recent advances in inflammasome biology. **Current Opinion in Immunology**, v. 50, p. 32–38, 2018.
- PONTILLO, A. et al. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 54, n. 3, p. 236–240, 2010.
- PONTILLO, A. et al. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 3, p. 539–544, 2011.
- PONTILLO, A. et al. Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 45, n. 4, p. 271–278, 2012.
- POWELL, E. E. et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 828–833, 2000.
- PRADERE, J. P. et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1461–1473, 2013.

PRECIADO, M. V. et al. Hepatitis C virus molecular evolution: Transmission, disease progression and antiviral therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 43, p. 15992–16013, 2014.

PROELL, M. et al. The CARD plays a critical role in ASC foci formation and inflammasome signalling. **Biochemical Journal**, v. 449, n. 3, p. 613–621, 2013.

PUCHE, J. E.; SAIMAN, Y.; FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. **Comprehensive Physiology**, v. 3, n. 4, p. 1473–1492, 2013.

PY, B. F. et al. Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 Critically Regulates Inflammasome Activity. **Molecular Cell**, v. 49, n. 2, p. 331–338, 2013.

REHERMANN, B. Natural Killer Cells in Viral Hepatitis. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 1, n. 6, p. 578–588, 2015.

RIBEIRO, P. S. et al. Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. **The American journal of gastroenterology**, v. 99, n. 9, p. 1708–17, 2004.

ROBERTS, T. L. et al. HIN-200 proteins regulate caspase activation in response to foreign cytoplasmic DNA. **Science**, v. 323, n. 5917, p. 1057–1060, 2009.

RÜHL, S.; BROZ, P. Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K<sup>+</sup> efflux. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 10, p. 2927–2936, 2015.

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, 2007.

SBORGI, L. et al. Structure and assembly of the mouse ASC inflammasome by combined NMR spectroscopy and cryo-electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 43, p. 13237–13242, 2015.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO journal**, v. 21, n. 19, p. 5017–25, 2002.

SCHNELL, G. et al. Uridine Composition of the Poly-U/UC Tract of HCV RNA Defines Non-Self Recognition by RIG-I. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, 2012.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 821–832, 2010.

SCHUPPAN, D. et al. Hepatitis C and liver fibrosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. S59–S67, 2003.

SÉNE, D. et al. Hepatitis C virus (HCV) evades NKG2D-dependent NK cell responses through NS5A-mediated imbalance of inflammatory cytokines. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, 2010.

SERTI, E. et al. Monocytes Activate Natural Killer Cells via Inflammasome- induced Interleukin 18 in Response to Hepatitis C Virus Replication. **Gastroenterology**, v. 147, n. 1, p. 1173-209–220, 2014.

- SHAKER, O.; SADIK, N. Polymorphisms in interleukin-10 and interleukin-28B genes in Egyptian patients with chronic hepatitis C virus genotype 4 and their effect on the response to pegylated interferon/ribavirin-therapy. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 27, n. 12, p. 1842–9, 2012.
- SHARMA, S. A.; JORDAN, J. F. Acute Hepatitis C: Management in the Rapidly Evolving World of HCV. **Current Gastroenterology Reports**, v. 16, n. 2, p. 37, 2014.
- SHEN, W. et al. Genotyping and quantification techniques for single-nucleotide polymorphisms. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 1–13, 2015.
- SHI, J. et al. Current progress in host innate and adaptive immunity against hepatitis C virus infection. **Hepatology International**, v. 11, n. 4, p. 374–383, 2017.
- SIMMONDS, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 years on. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 11, p. 3173–3188, 2004.
- SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: Regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89–102, 2010.
- SMITH, D. B. et al. Expanded Classification of Hepatitis C Virus Into 7 Genotypes and 67 Subtypes: Updated Criteria and Genotype Assignment Web Resource. **Hepatology**, v. 59, n. 1, p. 318–327, 2014.
- SOUZA DE LIMA, D. et al. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 240–244, 2016.
- SRINIVASULA, S. M. et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21119–21122, 2002.
- STANAWAY, J. D. et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 388, n. 10049, p. 1081–1088, 2016.
- STEINMAN, R. M. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. SUPPL. 1, 2007.
- STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 180–192, 2009.
- STROWIG, T. et al. **Inflammasomes in health and disease** *Nature*, 2012.
- SU, A. I. et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15669–74, 2002.
- SZABO, G.; CSAK, T. Inflammasomes in liver diseases. **Journal of Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 642–654, 2012.
- TACKE, F.; ZIMMERMANN, H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. **Journal of Hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1090–1096, 2014.



TAKAHASHI, K. et al. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 16, p. 7431–7436, 2010.

TANAKA, M.; MIYAJIMA, A. Liver regeneration and fibrosis after inflammation. **Inflammation and Regeneration**, v. 36, n. 1, p. 19, 2016.

TARRAGÔ, A. M. et al. Sofosbuvir and daclatasvir combination therapy for current hepatitis C virus genotype 4 achieves SVR: a case report of HCV genotype 4 from the Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 861–863, 2017.

TENGAN, F. M. et al. Sexual transmission of hepatitis C virus (Brazil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 43, n. 3, p. 133–137, 2001.

TERRAULT, N. A. et al. Sexual transmission of hepatitis C virus among monogamous heterosexual couples: The HCV partners study. **Hepatology**, v. 57, n. 3, p. 881–889, 2013.

THE POLARIS OBSERVATORY HCV COLLABORATORS. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, v. 2, p. 161–176, 2017.

THIMME, R. et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15661–15668, 2002.

THOMAS, E. et al. HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons. **Gastroenterology**, v. 142, n. 4, p. 978–988, 2012.

TOHME, R. A.; HOLMBERG, S. D. Is sexual contact a major mode of hepatitis C virus transmission? **Hepatology**, v. 52, n. 4, p. 1497–1505, 2010.

TORRES, K. et al. Hepatitis C Virus in Blood Donors, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 676–8, 2009.

TOVO, P.-A. et al. Vertically acquired hepatitis C virus infection: Correlates of transmission and disease progression. **World J Gastroenterol**, v. 22, n. 224, p. 1382–1392, 2016.

TRAMBAS, C. M.; GRIFFITHS, G. M. **Delivering the kiss of death** *Nature Immunology*, 2003.

TSUKADA, S. et al. SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 11, p. 10055–64, 2005.

TSUTSUI, H. et al. IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 157, n. 9, p. 3967–3973, 1996.

TSUTSUI, H. et al. The TLR4/TRIF-mediated activation of NLRP3 inflammasome underlies endotoxin-induced liver injury in mice. **Gastroenterology Research and Practice**, p. 11,

2010.

VAN DE LAAR, T. et al. Acute hepatitis C in HIV-infected men who have sex with men: an emerging sexually transmitted infection. **AIDS**, v. 24, n. 12, p. 1799–812, 2010.

VAROL, C.; MILDNER, A.; JUNG, S. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, v. 33, n. 1, p. 643–675, 2015.

VERMA, D. et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 $\beta$  and IL-18 production. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.

WANG, Y. et al. Interleukin-1 $\beta$  gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus infection. **Hepatology**, v. 37, n. 1, p. 65–71, 2003.

WEHR, A. et al. Chemokine Receptor CXCR6-Dependent Hepatic NK T Cell Accumulation Promotes Inflammation and Liver Fibrosis. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 10, p. 5226–5236, 2013.

WEISKIRCHEN, R.; TACKE, F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 3, n. 6, p. 344–63, 2014.

WELLS, R. G.; KRUGLOV, E.; DRANOFF, J. A. Autocrine release of TGF- $\beta$  by portal fibroblasts regulates cell growth. **FEBS Letters**, v. 559, n. 1–3, p. 107–110, 2004.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection. **Global Hepatitis Programme. Department of HIV/AIDS**, n. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-c-guidelines/en/>>, p. 56–62, 2014.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection. Updated version. April 2016a. **Global Hepatitis Programme. Department of HIV/AIDS**, n. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615_eng.pdf?ua=1)>, p. 11, 2016a.

WHO. World Health Organization. Guidelines for the Screening, Care and Treatment of Persons with Hepatitis C Infection. Updated version. April 2016b. **Global Hepatitis Programme. Department of HIV/AIDS**, n. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/205035/1/9789241549615_eng.pdf?ua=1)>, p. 20, 2016b.

WHO. World Health Organization. Global Hepatitis Report. 2017a. **Global Hepatitis Programme. Department of HIV/AIDS**, v. Disponível, p. 14, 2017.

WIELAND, S. et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus and interferon stimulated gene expression in infected human liver. **Hepatology**, v. 59, n. 6, p. 2121–2130, 2014.

WONG, M.-T.; CHEN, S. S.-L. Emerging roles of interferon-stimulated genes in the innate immune response to hepatitis C virus infection. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 1, p. 11–35, 2016.

WREE, A. et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation and fibrosis. **Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 898–910, 2014.

WU, C. et al. IFN- $\gamma$  Primes Macrophage Activation by Increasing Phosphatase and Tensin Homolog via Downregulation of miR-3473b. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 6, p. 3036–3044, 2014.

YANG, Y.; LIU, H. Association between interleukin-18 gene promoter (-607C/A and -137G/C) polymorphisms and chronic hepatitis C virus infections: A meta-analysis. **Meta Gene**, v. 5, n. 37, p. 21–31, 2015.

YIN, Z. et al. Type III IFNs Are Produced by and Stimulate Human Plasmacytoid Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 2735–2745, 2012.

YOGARAJAH, T. et al. AIM2 Inflammasome-Mediated Pyroptosis in Enterovirus A71-Infected Neuronal Cells Restricts Viral Replication. **Scientific Reports**, v. 7, n. 5845, p. 1–16, 2017.

YU, C. et al. Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 2, p. 142–152, 2018.

YUAN, H. et al. A Single Nucleotide Polymorphism in IL28B affects viral evolution of hepatitis C quasispecies after pegylated interferon and ribavirin therapy. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 12, p. 1913–1919, 2012.

ZHANG, H. et al. IL-18 mediates proapoptotic signaling in renal tubular cells through a Fas ligand-dependent mechanism. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 301, n. 1, p. F171-8, 2011.

ZHANG, H. et al. AIM2 Inflammasome Is Critical for Influenza-Induced Lung Injury and Mortality. 2017.

ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8+T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 161–168, 2011.

ZHANG, Q. et al. NLRP3 rs35829419 polymorphism is associated with increased susceptibility to multiple diseases in humans. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 13968–13980, 2015.

ZHANG, S. et al. IFN- $\gamma$  production by human natural killer cells in response to HCV-infected hepatoma cells is dependent on accessory cells. **Journal of Hepatology**, v. 59, n. 3, p. 442–449, 2013.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, n. 1, p. 445–489, 2010.

## ANEXOS

**Anexo 01:** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM (CAAE:49652815.8.0000.0009).



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

**Pesquisador:** ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 49652815.8.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.406.965

**Apresentação do Projeto:**

Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPITÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde

intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos

grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da

Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda teremos apoio das Universidade da

Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012,

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

• Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq  
 Bairro: Chapeda CEP: 69.050-002  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemocem.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

perfil de citocinas envolvidas no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células

Objetivo Secundário:

- Selecionar e identificar peptídeos miméticos reativos a soros de pacientes HCV+ com fibrose hepática;
- Sequenciar os clones isolados e realizar análises de bioinformática;
- Descrever o perfil de citocinas envolvidos no desenvolvimento da fibrose em cultura de células mesenquimais e hepatócitos;
- Pré-validar os clones selecionados através de ensaios de Phage-ELISA utilizando proteínas totais de pacientes com fibrose hepática;

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C

Benefícios: Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de

pacientes que possam prever e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa Relevante que busca detectar marcadores que auxiliem na detecção de peptídeos miméticos ao vírus da hepatite C capazes de prever fibrose utilizando tecnologias combinadas em engenharia genética, como Phage Display com o intuito de gerar estratégias direcionadas para a investigação do processo do desenvolvimento da fibrose.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram apresentados

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	09/09/2015		Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 BLD Dir Ens Pesq  
 Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.408.965

Básicas do Projeto	ETO_579290.pdf	15:35:04		Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	09/09/2015 15:26:05	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Elisa Brosina de Leon**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq  
Bairro: Chapada CEP: 69.050-002  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)3655-0114 Fax: (92)3655-0112 E-mail: cep@hemoam.am.gov.br

Anexo 02: TCLE (CAAE:49652815.8.0000.0009)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
**Conforme Resolução N° 196/1996 do CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE**

**TÍTULO DO ESTUDO:** Identificação e seleção de pepitídeos miméticos reativos aos soros de pacientes HCV<sup>+</sup> e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática *In Vitro*

**JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS:** Este estudo irá contribuir com informações para o desenvolvimento de marcadores que sejam capazes de detectar peptídeos relacionados a fibrose e prever cronificação da doença, com percentuais aceitáveis de sensibilidade e especificidade.

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

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

**BENEFÍCIOS:** A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor (a), mas ajudará no diagnóstico do vírus da Hepatite C.

**ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL:** O senhor (a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito ao HCV, podendo entrar em contato com a doutora Adriana Malheiro (HEMOAM: Tel: 92-655-0100). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

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

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

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

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

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

( ) Não

### **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

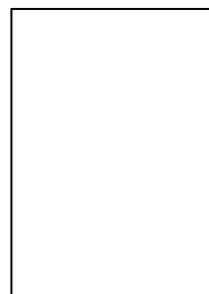
Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

---

(Assinatura do participante)

---

(Assinatura do pesquisador)



Manaus, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

(Impressão dactiloscópica)



**Anexo 03: Questionário e Ficha de Cadastro Individual**

<b>PACIENTE</b>			
<b>REGISTRO</b>	<b>SEXO</b>	<b>IDADE</b>	<b>FONE</b>
NATURAL (cidade, estado)	PROCEDENCIA (Cidade, estado)		
<b>PESO</b>	<b>ALTURA</b>		
<b>HDA (MOTIVO DO ENCAMINHAMENTO OU DA PROCURA AO AMBULATÓRIO:</b>			
<input type="checkbox"/> USG COM ESTEATOSE <input type="checkbox"/> HCV POS <input type="checkbox"/> CONSTIPAÇÃO <input type="checkbox"/> DIARREIA <input type="checkbox"/> ICTERICIA <input type="checkbox"/> DOR ABDOM <input type="checkbox"/> HIST FAMILIAR HEPATOPATIA <input type="checkbox"/> ALT DOS EXAMES <input type="checkbox"/> OUTROS: _____			

<b>CARGA VIRAL (Log):</b>			<b>GENÓTIPO:</b>		
<b>NAÍVE</b>	<b>EXPOSTO</b>	<b>FIB-4</b>	<b>METAVIR (F1,F2,F3,F4)</b>	<b>CHILD:</b>	<b>Avaliação da Fibrose Hepática NI [NIHCED]</b>
<b>COMORBIDADES:</b>					<input type="checkbox"/> IDADE >60 (13) <input type="checkbox"/> RNI >1,1 (10) <input type="checkbox"/> PLAQUETAS < 100.000 <input type="checkbox"/> HLC (USG) > 4cm(6) <input type="checkbox"/> ALHD (USG) < 9cm (15) <input type="checkbox"/> EM >13cm (USG) (7) <b>Σ Pontos : &gt;22 ( )</b>
<input type="checkbox"/> DMII <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> TIREOIDE <input type="checkbox"/> IRC <input type="checkbox"/> TRANSPLANTADO <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> VHB <input type="checkbox"/> ALCOOL <input type="checkbox"/> SINDROME METABÓLICA <input type="checkbox"/> ASCITE <input type="checkbox"/> ENCEFALOPATIA <input type="checkbox"/> OUTROS _____					
<b>MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS DO HCV:</b>					
<input type="checkbox"/> SALIVAR <input type="checkbox"/> VASCULAR <input type="checkbox"/> RENAL <input type="checkbox"/> DERMATO <input type="checkbox"/> OCULAR <input type="checkbox"/> ENDÓCRINA <input type="checkbox"/> HEMATOLÓGICA <input type="checkbox"/> NEUROMUSCULAR <input type="checkbox"/> AUTOIMUNE    OUTRO _____					
<b>FATORES DE RISCO</b>					
<input type="checkbox"/> HEMOTRANSFUSÃO ANTES 1992 <input type="checkbox"/> HOMOSSEXUALIDADE <input type="checkbox"/> UDI <input type="checkbox"/> TATOO <input type="checkbox"/> PASSADO DE CIRURGIA _____					

**DATA DO INICIO DO TRATAMENTO:**

**EXAMES ANTES DO INICIO DO TRATAMENTO:**

HEMOGLOBINA	
LEUCÓCITOS	
PLAQUETAS	
RNI	
F. ALCALINA	
GGT	
AST	
ALT	
ALBUMINA	
BIL TOTAL	
GLICOSE	
COLESTEROL TOTAL	
TRIGLICERIDEOS	
TSH	
ACIDO URICO	
VITAMINA D	
ALFA FETOPROTEINA	
SODIO	
UREIA	
CREATININA	
FERRITINA	

ENDOSCOPIA: ( ) COM VARIZES ( ) SEM VARIZES

IMAGEM HEPÁTICA:

**REGIME DE TRATAMENTO**

**UTILIZADO**

( ) PR (IFN+RIBA)

( ) PR + TELAPREVIR

( ) PR + BOCEPREVIR

( ) OUTRO:

	SIM	NÃO
NAÏVE		
EXPOSTO		
NULL		
RECIDIVANTE		
DESCONTINUOU O TRATAMENTO		

TEMPO DE TRATAMENTO: SEMANAS:			DATA DO INICIO DO TRATAMENTO:		
	Hg	Leucócitos	Plaquetas	Glucose	LOG
S0					
S4 – RVR					
S8					
S12 – NULL/EVR					
S24 – PR					
S36					
S48					
S72 (RVS)					

EVENTO ADVERSO AO TRATAMENTO	SIM	NÃO
Fadiga		
Cefaléia		
Náuseas		
Anemia		
Dermatite/exantema		
Queda de cabelo		
Hemorroidas		
Icterícia		
Evento adverso sério		
Evento adverso grau 3 ou 4		
Tuberculose		

- **Evento adverso sério:** gastroenterite, colite, AVC, insuficiência renal aguda, hipocalemia, exacerbação da psoríase, descompensação hepática
- **Evento adverso grau 3 ou 4:** Níveis baixos de fósforo, níveis elevados de glicose

**Anexo 04:** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP-HEMOAM (CAAE 0024.112.000-10).

Anexo 05: TCLE (CAAE 0024.112.000-10)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

**Título do estudo: Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus.**

O objetivo do estudo é conhecer como o organismo vai se defender ao vírus da hepatite B e verificar que tipo de vírus está no organismo.

Neste estudo será coletada amostra de 20ml de sangue. Para serem feitos testes para verificar a presença do vírus e analisar as células que destroem os vírus. Todos os testes serão realizados no HEMOAM em Manaus. Não existem riscos associados à sua participação neste estudo. O único desconforto é a picada da agulha para a coleta de amostra de sangue. A sua participação neste estudo não implica em nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a). O estudo, contudo, proporcionará maiores esclarecimentos sobre a prevenção e infecção pelo vírus da hepatite B. Sendo o senhor(a) participante deste estudo terá, sempre que necessário, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial no que diz respeito à doença em estudo, podendo entrar em contato com Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro e Laura Maia (HEMOAM Tel: 3655-0111). Sempre que necessário será prestada orientação médica adequada ou encaminhamentos necessários, feitos pela equipe médica do HEMOAM. A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor(a) pode retirar sua participação a qualquer momento, o senhor(a) não terá qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da Instituição. Os dados referentes à sua participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade. O sangue coletado (20ml) será utilizado para o que se propõe neste estudo.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO: Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo. O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras para o estudo dos tipos de vírus? ( ) sim ou ( ) não.

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

\_\_\_\_\_

(Assinatura do participante)

\_\_\_\_\_

(Assinatura do pesquisador)

Manaus, \_\_\_\_/ \_\_\_\_/ \_\_\_\_.



(Impressão dactiloscópica)

**Anexo 06: Questionário e Ficha de Cadastro Individual**

Título do projeto: Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na Cidade de Manaus.

**PARTE I: ENTREVISTA COM O PACIENTE**

Dados pessoais/ demográficos:

Nº Ident.: \_\_\_\_\_ Nº Iden da Bolsa: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Sexo: F • M •

Estado civil: Casado • Solteiro • outros \_\_\_\_\_

Escolaridade: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ Fone: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ n. \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

Complemento: \_\_\_\_\_ Zona \_\_\_\_\_

Dados complementares do caso antes da doação de sangue:

Tem vacinação contra Hepatite B: Sim • Não •

Paciente tem história anterior: alcoolismo • icterícia •

O paciente foi submetido ou exposto a:

- transfusão de sangue/derivados. Quando: \_\_\_\_\_
- drogas injetáveis • transplante
- 3 ou mais parceiros sexuais • medicamentos injetáveis
- tratamento cirúrgico • parto normal
- acunputura • tatuagem
- piercing • tratamento dentário

Contato com paciente de Hepatite B ou C, ou com portador dos VHB ou VHC:

- sexual • domiciliar (não sexual) • ocupacional