

CARLOS EDUARDO DE MELO

**Influência dos polimorfismos no promotor do
gene da interleucina-10 na resposta a antivirais
em pacientes com hepatite C crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

**SÃO PAULO
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Apesar do mar por suas ondas brilhantes,
Fazer arrepiar de medo quem frequente,
O homem não obstante confia na madeira,
Que de espessura não tem quatro ou cinco dedos,
De que é feito o navio que o leva,
Não percebendo que vive de tal modo,
Que tem a morte a quatro dedos dele.
Louco, portanto, pode muito bem ser reputado aquele
Que vai ao mar sem em Deus confiar,
Pois só Deus é que pode salvar-lhe a vida.

Aos meus pais Jorge A. Melo e Iolanda Paulina pelo incondicional apoio e incentivo durante todos esses anos e por me permitirem ter a oportunidade de estudar e realizar meus sonhos.

A minha querida avó Lazara Jerônimo (em memória) pelo seu exemplo de vida.

Agradecimentos

Agradeço ao do Prof. Dr. Antonio Alci Barone, meu orientador nesse trabalho, pelos ensinamentos e paciência ao longo do meu período de mestrado e por ter me permitido crescer profissionalmente.

Agradeço a Dra Norma de Paula Cavalheiro pela sua amizade, dedicação, conselhos e “broncas” durante o período de estamos trabalhando juntos.

Agradeço aos professores Dra Rosário Hirata e Mario Hirata da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP por ajudarem a descobrir os mistérios da Biologia Molecular.

Agradeço aos meus amigos do LIM-47 da FMUSP: Dra Fátima M Tengan, Dr Evaldo A Araújo, Dr Roberto M Carrasco, Dra Ana Teresa R. Viso, Ana Carolina de Oliveira Santos, Danielli B. Fragoso, Suzana R Morimitsu, Antonia Magali Dias, Talita Sartori, José M Biazon e Clélia Venezian.

Agradeço a colaboração dos médicos, enfermeiras e dos funcionários do ambulatório de Hepatites Virais do HC-FMUSP.

Agradeço a todos os meus amigos da “diretoria” do Laboratório de Biologia Molecular aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em especial a: Adriana Natsue Ozaki, Alice

Cristina Rodrigues Bety Chen, Daniela Knoll, Fabiana Cristina Pereira dos Santos, Hamilton M. Hinuy, Luis A. Salazar, Mustafá H. Issa, Selma A Cavalli pelos felizes momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente me ajudaram aos longo do período de realização desse trabalho: Patrícia Basílio, a turma do M.E.C e do cursinho da Poli (Edna, Eduardo e Moyses).

Agradeço a Deus por tudo que realizei e conquistei nessa etapa da minha vida.

Esta dissertação está de acordo com:

Referências: adaptado de *Internacional Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de quadros e tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Hepatite C Crônica.....	1
1.2. O vírus da hepatite C.....	3
1.3. Genótipos virais do VHC.....	8
1.4. Testes laboratoriais para o VHC.....	9
1.5. Imunopatogênese	11
1.6. Tratamento.....	12
1.7. Fatores de resistência à terapia.....	14
1.8. Susceptibilidade genética e hepatite C.....	17
1.9. Interleucina 10.....	21
1.9.1. Proteína, estrutura gênica, receptor e expressão do gene da IL10.....	21
1.9.2. Função biológica da citocina IL10.....	24
1.9.3. Polimorfismos e níveis de expressão do gene da IL10.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Casuística.....	30
3.2. Aspectos éticos do estudo.....	31
3.3. Material biológico.....	31
3.4. Métodos.....	32
3.4.1. Determinação das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT).....	32
3.4.2. Detecção do vírus da hepatite C por PCR.....	32
3.4.3. Genotipagem do vírus da hepatite C por hibridização reversa (LIPA).....	33
3.4.4. Extração do DNA genômico.....	34
3.4.5. Análise dos polimorfismos -1082(G>A), -819(C>T) e -592(C>A) da região promotora do gene da IL10.....	35
3.4.6. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. Dados epidemiológicos, clínicos, bioquímicos e virológicos dos indivíduos.....	41
4.2. Estudo dos polimorfismos da região promotora da IL10.....	44
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. ANEXOS	
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	56
Anexo 2: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes não-respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo..	59
Anexo 3: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

ABREVIATURAS E SIGLAS

2'5'OAS.....	proteína 2'5'-oligoadenilato sintetase
3'NCR.....	região 3' não-codificadora do genoma do VHC
5'NCR.....	região 5' não-codificadora do genoma do VHC
ALT.....	alanina aminotransferase
APC.....	célula apresentadora de antígenos
ARF.....	<i>alternative reading frame</i> ou fase alternativa de leitura
AST.....	aspartato aminotransferase
bDNA.....	<i>branched</i> DNA
DNA.....	ácido desoxirribonucléico
E1/E2.....	glicoproteínas do envelope do VHC
EBV.....	vírus de Epstein-Barr
eIF-2.....	fator de iniciação de transdução viral 2
ELISA.....	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GGT.....	gama glutamil transpeptidase
HCC.....	carcinoma hepatocelular
IFN.....	interferon
IFNAR.....	receptor de interferon alfa
IL.....	interleucina
IRES.....	sítio interno de entrada ribossomal
ISDR.....	região determinante de sensibilidade ao interferon
ISGF3.....	<i>IFN-stimulated gene factor 3</i>
ISRE.....	<i>IFN stimulated regulatory element</i>
Jak.....	Janus tirosina quinase
LD.....	<i>linkage disequilibrium</i> ou desequilíbrio de ligação
LIPA	<i>Line Probe Assay</i>
LPS.....	lipo poli sacarídeo
mRNA.....	ácido ribonucléico mensageiro
Mx.....	proteína Mx
NK.....	<i>natural killer cell</i>
ORF.....	<i>open reading frame</i> ou fase aberta de leitura
PCR.....	reação em cadeia pela polimerase
PegI.....	interferon peguilado
PKR.....	proteína quinase ativada por RNA
RIBA.....	ensaio de immunoblot recombinante
RNA.....	ácido ribonucléico
SNP.....	<i>single nucleotide polymorphism</i> ou polimorfismo de nucleotídeo único
STAT.....	Signal Transducers and Activators of Transcription protein
TGF-β1.....	fator beta 1 transformador do crescimento
TMA.....	amplificação mediada por transcrição
TNF-α.....	fator de necrose tumoral alfa
Tyk.....	tirosina quinase
U.....	nucleotídeo uracila
VHC.....	vírus da Hepatite C
WHO.....	Organização Mundial de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência mundial estimada da infecção pelo VHC.....	2
Figura 2	Organização genômica do VHC.....	4
Figura 3	Estrutura tridimensional da IL10 e do IL10R.....	21
Figura 4	Representação esquemática da estrutura do gene da IL10.....	22
Figura 5	Vias celulares ativadas pela IL10.....	24
Figura 6	Representação esquemática da técnica de ARMS-PCR utilizada para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10.....	34
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de amplificação do polimorfismo -1082(G>A) da região promotora do gene da IL10.....	38

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Valores de referência utilizados para ALT, AST e GGT.....	30
Quadro 2	Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10.....	35
Quadro 3	Padrão dos tamanhos dos produtos de PCR utilizados para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10.....	37
Quadro 4	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	43
Tabela 1	Características epidemiológicas, clínicas e virológicas dos indivíduos participantes do estudo classificados por sexo.....	40
Tabela 2	Características epidemiológicas, clínicas e virológicas dos indivíduos participantes do estudo classificados por resposta à terapia antiviral...	41
Tabela 3	Características das enzimas hepáticas dos indivíduos participantes do estudo.....	42
Tabela 4	Freqüências de genótipos e alelos dos polimorfismos da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como não respondedores (NR) e respondedores (SR) à terapia antiviral.....	43
Tabela 5	Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos.....	44
Tabela 6	Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como não respondedores à terapia.....	45
Tabela 7	Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como respondedores à terapia.....	46
Tabela 8	Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como não respondedores (NR) e respondedores (SR) à terapia antiviral.....	47

RESUMO

Melo CE. *Influência dos polimorfismos no promotor do gene da Interleucina 10 na resposta a antivirais em pacientes com hepatite C crônica* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 77p.

Na infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC), a persistência do vírus e a resposta à terapia antiviral tem sido associada com a produção de níveis inadequados de diversas citocinas na resposta imunológica e inflamatória. A interleucina 10 (IL10) é uma potente citocina antiinflamatória e parece ter um papel importante na resposta do hospedeiro ao VHC. A produção de IL10 varia de acordo com a composição genética no *locus* da IL10. Vários sítios polimórficos foram descritos na região promotora do gene da IL10 e um polimorfismo de nucleotídeo único na posição -1082, relativa ao sítio de início de transcrição, é associado com expressão diferencial de IL10. A presença do alelo G nesta região esta associada à alta produção desta citocina. Neste estudo, nós avaliamos a frequência dos polimorfismos -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) da região promotora do gene da IL10 e sua associação com o desfecho à terapia antiviral na infecção crônica pelo VHC. O DNA genômico de 54 pacientes classificados como respondedores e 54 não respondedores à terapia combinada de interferon (convencional ou peguilado) e ribavirina foi genotipado para esses polimorfismos por PCR utilizando iniciadores alelo-específicos, seguidos de eletroforese em gel de agarose a 3%. As distribuições observadas para o polimorfismo -1082 foram: AA 43,3%, GA 40,7% e GG 13,0% entre os pacientes não respondedores; e AA 31,5%, GA 46,3% e GG 22,2% entre os respondedores. Para o polimorfismo -592, as distribuições observadas foram: CC 50,0%, CA 38,7% e AA 11,0% entre os não respondedores a terapia; e CC 42,6%, CA 53,7% e AA 3,7% para os pacientes respondedores. O alelo A do polimorfismo -1082 foi identificado mais frequentemente entre os pacientes não respondedores do que nos respondedores ($P=0,0352$). Estes resultados sugerem que a presença deste alelo, que afeta a produção da citocina, possa estar associado a uma desfavorável resposta à terapia antiviral na infecção pelo VHC.

Descritores: 1. Hepatite C crônica/imunologia 2. Interleucina-10 3. Polimorfismo genético 4. Antivirais/uso terapêutico 5. Reação em cadeia da polimerase

SUMMARY

Melo CE. *Influence of Interleukin 10 gene promoter polymorphisms on the antiviral response of patients with chronic hepatitis C* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2007. 77p.

In HCV infections, the persistence of the virus and the response to antiviral therapy has been shown to be associated with the production of inappropriate cytokine levels in inflammatory and immune response. Interleukin-10 (IL10) is a potent anti-inflammatory cytokine and possibly has important role in the host outcome to HCV. IL-10 production varies according to the genetic composition of the IL-10 locus. Several polymorphic sites within the promoter region of the IL-10 gene have been described and a single nucleotide polymorphism at position -1082 (G/A) relative to the transcription start site is associated with differential IL-10 expression. The presence of G allele in this region was involved with high production of the anti-inflammatory cytokine IL-10. In this study, we have evaluated the frequency of the polymorphisms -1082 (G>A), -819 (C>T) and -592 (C>A) of the IL-10 gene promoter and their association with the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C infection. Genomic DNA from 54 patients classified as responders and 54 nonresponders to a combination of interferon alpha (conventional and peginterferon) and ribavirin was evaluated by molecular typing by polymerase chain reaction (PCR) with allele-specific primers, followed by electrophoresis on agarose gels (3%). The distribution of the genotypes AA, GA and GG for the polymorphism -1082 in the studied individuals was for nonresponders 46,3%, 40,7% and 13,0%, respectively, and among the responders was 31,5%, 46,3% and 22,2%, respectively. The distribution of the genotypes CC, CA and AA for the polymorphism -592 in the studied individuals was for nonresponders 50,0%, 38,7% and 11,1%, respectively, and among the responders was 42,6%, 53,7% and 3,7%, respectively. The interleukin-10 -1082 A allele was identified more frequently in patients nonresponders than in responders ($P=0.0352$). These results suggest that presence of the interleukin-10 -1082 A allele, which appears to affect the cytokine production, may be associated with a unfavorable outcome of HCV infection.

Descriptors: 1. Chronic hepatitis C/immunology 2. Interleukin-10 3. Polymorphism genetic 4. Antiviral agents/therapeutic use 5. Polymerase chain reaction

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hepatite C Crônica

A hepatite C é uma infecção com curso variável que pode evoluir para hepatite crônica, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. O vírus da hepatite C (VHC) é o seu agente etiológico.

Desde a sua descoberta em 1989, o VHC tem sido considerado como a maior causa de doença crônica do fígado no mundo (*Shepard et al., 2005*). A infecção crônica pelo VHC afeta mais de 170 milhões de pessoas pelo mundo e sua prevalência global é estimada de 1% a 2% (*Memon e Memon, 2002; Pawlotsky, 2006; Pybus et al., 2001; Shepard et al., 2005*). A hepatite C é responsável por cerca de 10.000 mortes por ano nos Estados Unidos (*Pybus et al., 2001*).

Regiões de alta prevalência (1,6% a 3,5%) têm sido descritas no Japão, Indonésia, algumas áreas da Rússia, Oriente Médio e Brasil, regiões de altíssima prevalência são relatadas em algumas regiões de Camarões (6,4%), Egito (14%) e cidade do Cairo (26%) (*Shepard et al., 2005*). (Figura 1)

No Brasil, dados do Ministério da Saúde e da Organização Mundial de Saúde (WHO) apontam a infecção de 2% dos brasileiros ou aproximadamente 3 milhões de pessoas (*Memon e Memon, 2002*). Um estudo populacional na cidade de São Paulo mostrou prevalência de 1,42%

de anti-VHC positivo, variando com a faixa etária (*Focaccia et al., 1998; Strauss et al., 2001*).

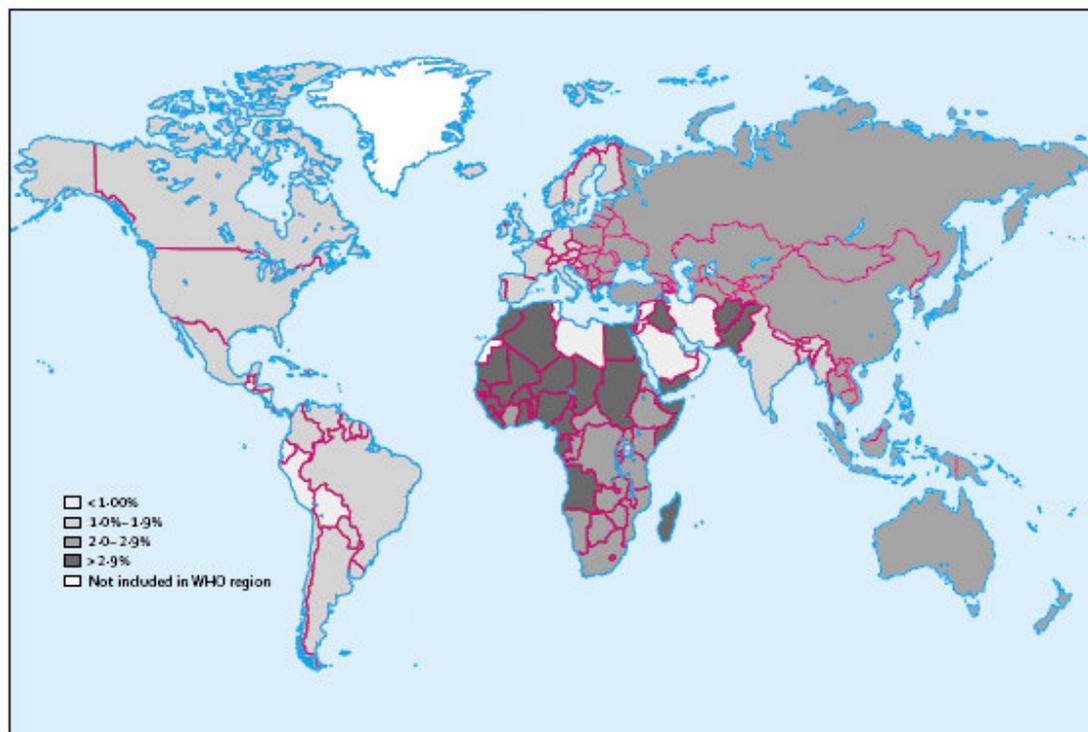


Figura 1. Prevalência mundial estimada da infecção pelo VHC (Adaptado de *Shepard et al., 2005*).

Vários estudos têm identificado que as principais vias de transmissão do VHC são: (a) parenteral: transfusão de sangue e derivados, agulhas contaminadas e de materiais odontológicos não descartáveis, materiais cortantes, seringas, hemodiálise; (b) sexual: vírus presente em sêmen, saliva, secreção vaginal; e (c) materno-fetal: durante o nascimento o bebê pode ser contaminado por mãe recém infectada ou portadora crônica (*Cavalheiro, 2004; Strauss et al., 2001; Rosen e Gretch, 1999; Wong e Lee, 2006; Duscheiko, 2007*).

A hepatite C crônica caracteriza-se por ser uma doença inflamatória do fígado, usualmente assintomática, apresentando incubação de 50 a 71

dias. A mortalidade na fase aguda é baixa e a doença se cronifica em até 85% dos indivíduos (*Strauss et al., 2001; Taylor et al., 2000; Wong e Lee, 2006; Duscheiko, 2007*). Pelo menos 20% dos indivíduos desenvolvem cirrose e/ou hepatocarcinoma (HCC) (*Rosen e Gretch, 1999*). Quando sintomática, os doentes ficam icterícos e colúricos (urina escura com elevação de urobilinogênio). Outros sintomas como fraqueza, adinamia, anorexia, náuseas, vômitos e dores também podem ser observados (*Wong e Lee, 2006; Duscheiko, 2007*).

1.2. O vírus da hepatite C

O VHC é um vírus classificado dentro do gênero *Hepacivirus*, sendo membro da família *Flaviviridae*. É um vírus envelopado com um diâmetro variando de 55 a 65 nm (*Pawlotsky, 2004*).

O genoma viral é constituído por uma fita simples e de sentido positivo de RNA com aproximadamente 9,6 kilobases, organizado em uma região 5' não-codificadora (5'NCR); uma região que possui uma única fase aberta de leitura (ORF) que codifica uma grande poliproteína; e uma região 3' não-codificadora (3'NCR) (*Tan e Katze, 2001; Taylor et al., 2000*). (Figura 2)

A região 5'NCR é altamente conservada entre diferentes isolados de VHC e contém um sítio interno para entrada ribossomal (IRES) essencial para a tradução *cap*-independente do RNA viral. Por causa da grande variedade de mRNAs celulares que são transcritos por um mecanismo *cap*-dependente, o IRES do VHC representa um alvo interessante para o

INTRODUÇÃO

desenvolvimento de novos antivirais. Em virtude do alto grau de conservação entre os diferentes isolados distribuídos ao longo do mundo, esta é a região de escolha para o diagnóstico do VHC por técnicas de biologia molecular (Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006).

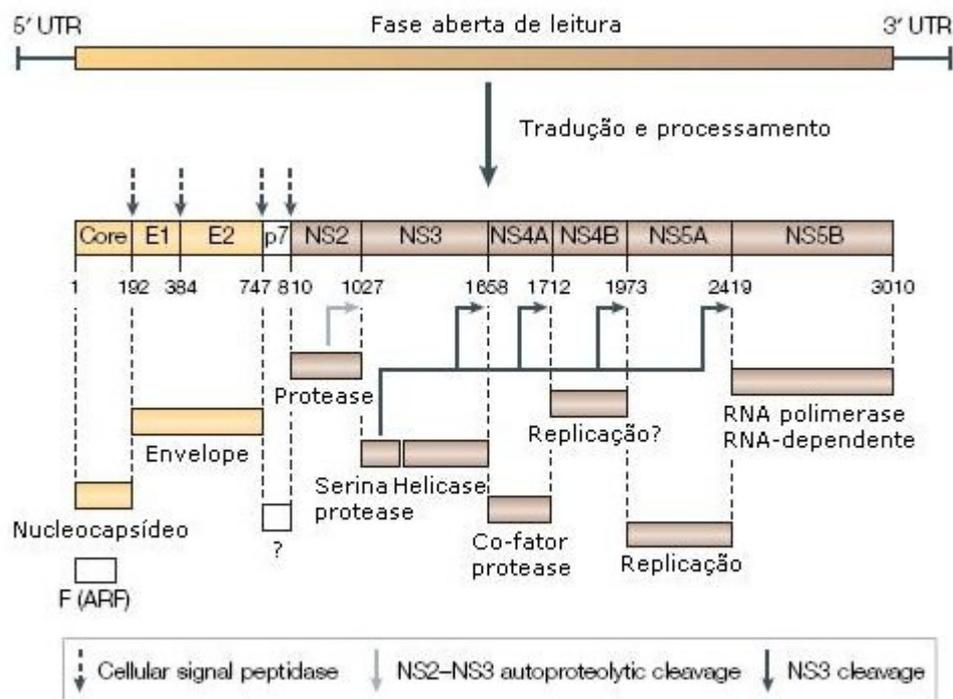


Figura 2. Organização genômica do VHC

A região 3'NCR consiste de uma pequena região variável de 40 nucleotídeos, uma seqüência poli(U)/polipirimidinas, seguido por uma seqüência de 98 nucleotídeos que também é altamente conservada entre diferentes genótipos do VHC. Acredita-se que a 3'NCR tenha um papel importante na iniciação da replicação do genoma viral (Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006).

A ORF do genoma do VHC codifica uma poliproteína com

aproximadamente 3000 aminoácidos, que é processada por proteases celulares e virais nas proteínas estruturais e não estruturais maduras. As proteínas estruturais do VHC compreendem o *core* e as glicoproteínas E1 e E2, além das proteínas F e p7. As proteínas NS2, NS3, NS4 e NS5 representam as não estruturais (*Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006*).

O *core* é uma proteína ligante de RNA com propriedades químicas básicas que presumidamente forma o nucleocapsídeo viral. Inúmeros trabalhos relatam que esta proteína interage com várias proteínas celulares e afeta algumas funções das células do hospedeiro como a transcrição gênica, o metabolismo de lipídios, o processo de apoptose e também várias vias de sinalização celular. Tem sido associada também com a indução de esteatose e com o HCC (*Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006*).

As glicoproteínas do envelope E1 e E2 são proteínas transmembranas com regiões C-terminal hidrofóbicas. E1 e E2 formam heterodímeros ligados não covalentemente que se acredita representarem os blocos construtores do envelope viral (*Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006*).

A síntese de uma proteína codificada por uma fase de leitura alternativa dentro da região do *core* foi descrita por vários pesquisadores (*Branch et al., 2005*). Ela foi denominada como proteína F ou ARF (*alternative reading frame*) e possui 160 resíduos de aminoácidos. A proteína F ainda não possui sua função ou o seu possível papel na replicação viral

conhecidos, não se sabe também se é expressa ou não durante o curso da infecção (*Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006*).

A proteína p7 é um polipeptídeo de 63 aminoácidos localizado na junção entre as regiões estruturais e não estruturais. Essa proteína é formada por dois domínios transmembranas e recentemente foi descrito que formam hexâmeros com atividade de canais iônicos, porém sua função durante a replicação do VHC ainda não foi esclarecida (*Moradpour e Blum, 2004; Brass et al., 2006*).

A proteína não estrutural NS2 do VHC apresenta atividade de protease zinco (Zn) dependente. A clivagem da junção NS2/3 é realizada pela atividade autoproteásica da NS2 e do terceiro N-terminal da NS3. Embora a atividade de protease da NS2-3 seja essencial para a replicação *in vivo*, é ainda não está claro se a proteína NS2 possui alguma atividade após a separação da NS3 (*Brass et al., 2006; Pawlotsky, 2004*).

A NS3 é uma proteína multifuncional possuindo atividades de serino protease, helicase e NTPase, desempenhando um papel crucial durante a replicação viral. A NS3 quando complexada com a NS4A é responsável pela clivagem das outras proteínas não estruturais do vírus (*Pawlotsky, 2004*). A atividade enzimática de NTPase/helicase da NS3 parece ser indispensável para a replicação do RNA viral, sugerindo que ela atue desenrolando RNAs intermediários dupla fita replicativos, eliminando estruturas secundárias no RNA ou separando o genoma das proteínas ligantes de ácidos nucleicos (*Brass et al., 2006*).

A NS4B é uma proteína integral de membrana e tem um papel

essencial na formação do complexo de replicação viral, atuando como estrutura de fixação na membrana do retículo endoplasmático (*Brass et al., 2006; Pawlotsky, 2004*).

A NS5A é uma zinco-metaloproteína fosforilada de funções desconhecidas (*Moradpour e Blum, 2004; Brass et al., 2006*). Estudos recentes têm demonstrado que a NS5A tem um importante papel na regulação das NS5B através de um mecanismo ainda desconhecido (*Pawlotsky, 2004*). Entretanto, a NS5A parece ter outras propriedades adicionais, como a inibição da atividade antiviral do interferon, ativação transcricional e envolvimento na regulação do crescimento e das vias de sinalização celulares (*Pawlotsky, 2004*).

A enzima chave de replicação que promove a síntese de novos genomas de RNA é a NS5B RNA-dependente RNA polimerase (*Pawlotsky, 2004*). A organização estrutural dessa polimerase é semelhante a uma forma de “mão direita”, onde os subdomínios da enzima estão organizados ao redor do sítio ativo (*Brass et al., 2006*). A replicação ocorre via síntese de uma fita de RNA complementar de polaridade negativa usando o genoma viral como molde, seguido da subsequente síntese da fita positiva de RNA genômica a partir desta fita negativa intermediária (*Moradpour e Blum, 2004; Penin et al., 2004, Brass et al., 2006*).

As proteínas do VHC podem estar diretamente implicadas na resistência a terapia com antivirais (*Tan e Katze, 2001; Taylor et al., 2000*).

1.3. Genótipos Virais do VHC

Análises filogenéticas de seqüências completas ou parciais de cepas isoladas do VHC de várias regiões do mundo levaram a identificação de diferentes genótipos desse vírus (*Pawlotsky, 2004*).

Seis principais grupos ou tipos virais foram identificados e numerados de 1 a 6. Para ser classificado dentro de um genótipo, os diversos isolados do VHC necessitam apresentar heterogeneidade genética entre 65,7 a 68,9% de similaridade na seqüência de nucleotídeos. Os subtipos são identificados por letras e são isolados intimamente relacionados dentro dos principais genótipos. Subtipos apresentam similaridade na seqüência de nucleotídeos entre 76,9 a 80,1%. Quasispécies são isolados individuais consistem de uma complexa população intimamente relacionada de genomas virais, e apresentam similaridade de 90,8 a 99% na seqüência de nucleotídeos (*Zein, 2000*).

Provavelmente, como uma conseqüência dessa diversidade genética, o VHC tem a habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro, levando a altas taxas de infecção crônica. A extensa heterogeneidade genética do VHC tem importantes implicações diagnósticas e clínicas, talvez explicando as variações clínicas observadas, as dificuldades no desenvolvimento de vacinas e a deficiência na resposta a terapia (*NIH, 2002*).

Embora os genótipos 1, 2 e 3 sejam os que apresentam maior distribuição mundial, os diferentes genótipos possuem importantes

diferenças de distribuição regional (*Sy e Jamal, 2006; Zein, 2000*).

No Brasil estimam-se as seguintes prevalências: 64,9% para o genótipo 1, 4,6% para o genótipo 2, 30,2% para o genótipo 3, 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5 (*Campio et al., 2005*).

1.4. Testes laboratoriais para o VHC

O diagnóstico da hepatite C, rotineiramente utilizado desde o início dos anos 90, é realizado pela pesquisa de anticorpos anti-VHC e consiste de teste imunoenzimático (ELISA) que emprega antígenos recombinantes do VHC (*Strauss et al., 2001*). Atualmente, este teste se encontra na terceira geração, utiliza proteínas recombinantes derivadas do *core*, NS3, NS4 e NS5 do VHC e apresenta alta sensibilidade e especificidade (*Ferreira-Gonzalez e Shiffman, 2004; Strauss et al., 2001*).

Outro teste sorológico utilizado no diagnóstico da infecção pelo VHC, é o ensaio de immunoblot recombinante (RIBA), que foi desenvolvido como um teste para confirmar a infecção pelo vírus em pessoas já com teste para anti-VHC. Neste teste, temos as mesmas frações antigênicas encontradas nos testes ELISA de terceira geração, entretanto, as proteínas se encontram isoladas, evitando reações cruzadas não específicas entre os anticorpos. O uso deste teste está sendo descontinuado, sendo utilizado atualmente como teste confirmatório a pesquisa direta do RNA viral por métodos moleculares (*Asselah et al., 2007; Pawlotsky, 2002b; Strader et al., 2004; Scott e Gretch, 2007*).

Técnicas para identificação do genótipo viral baseadas em anticorpos específicos para cada tipo viral (sorotipagem) também estão disponíveis comercialmente (*Cavalheiro et al., 2002*).

O diagnóstico é confirmado pela detecção direta do RNA viral no sangue periférico por métodos moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR), amplificação mediada por transcrição (TMA), hibridização com amplificação de sinal (branched DNA) e Real Time PCR (*Asselah et al., 2007; Pawlotsky, 2002b; Strader et al., 2004; Scott e Gretch, 2007; Strauss et al., 2001*).

Durante o curso da terapia antiviral são testes laboratoriais indispensáveis: a determinação da carga viral por PCR ou bDNA e a identificação do genótipo viral por hibridização reversa (LIPA) ou por técnicas de seqüenciamento direto dos nucleotídeos que compõem o RNA viral (*Asselah et al., 2007; Pawlotsky, 2002b; Strader et al., 2004; Scott e Gretch, 2007*).

A biópsia hepática é considerada o método padrão na avaliação de pacientes com hepatite crônica, apesar do alto custo e ser um método invasivo. Quando combinada com determinações seriadas da atividade da alanina aminotransferase (ALT) no soro, a biópsia é útil na avaliação da gravidade ou atividade inflamatória do fígado e do estágio ou grau de fibrose (*Strauss et al., 2001; Scott e Gretch, 2007*).

1.5. Imunopatogênese

Infecções virais agudas rapidamente disparam a resposta imune não específica, principalmente envolvendo a secreção de interferon tipo I (IFN) e ativação de células *natural killers* (NK). Estudos recentes têm sugerido que a secreção endógena de IFN tipo I, embora induzida pela replicação do VHC, não consegue de forma eficiente inibi-la. Esses estudos demonstram que os genes induzidos por IFN- α são amplamente expressos durante o curso da infecção aguda, mas esta resposta falha no controle da replicação viral (*Pawlotsky, 2004; Poynard et al., 2003*).

Com relação às células NK, estudos em células dendríticas recuperadas de pacientes cronicamente infectados mostraram uma deficiente capacidade de ativar células NK na resposta à estimulação por IFN- α , e sugerem que esta deficiência pode afetar a responsividade ao IFN- α na fase aguda da infecção (*Pawlotsky, 2004; Poynard et al., 2003*).

A resposta celular T CD4 e CD8 específica na hepatite C se mostra fraca e ineficiente, e as células T CD8 parecem possuir suas funções efetoras deficientes (tanto na secreção de citocinas antivirais quanto na sua atividade lítica) (*Poynard et al., 2003*).

A lesão hepatocelular desenvolvida na hepatite C se faz pelo reconhecimento imunológico da célula infectada e sua destruição. A dinâmica desse processo mostra-se extremamente variável, fazendo com que a reação necro-inflamatória do fígado tenha diferentes intensidades. O principal fator de progressão da doença é a fibrose hepática, admite-se que

o processo inflamatório contínuo e ineficiente, em termos de eliminação total do vírus, constitui o responsável pela fibrogênese (*Einav e Koziel, 2002; Kanto e Hayashi, 2006; Rosen, 2003*).

1.6. Tratamento

Atualmente, o tratamento da hepatite C crônica é feito pelo uso de IFN- α recombinante ou interferon peguilado (PEG-IFN) associado à ribavirina (*Strauss et al., 2001*).

Os estudos recentes, baseados em análises de cinética viral, recomendam a utilização de terapia individualizada conforme o genótipo viral predominante na infecção (*Pawlotsky, 2006*). Existem vários esquemas terapêuticos aceitos atualmente, sendo os mais amplamente utilizados os que definem o uso de interferon peguilado e ribavirina como terapia de primeira escolha para o genótipo 1 por um período que varia de 24 a 48 semanas, conforme o tipo de resposta virológica apresentada na semana 4 (se é respondedor rápido ou lento) e a resposta na semana 12 (se a carga viral reduziu ou negativou). Para os genótipos 2 e 3 a combinação de interferon convencional e ribavirina é utilizada como tratamento padrão por um período de 24 semanas (*Mihm et al., 2006; Schiff, 2006; Pawlotsky, 2006; Brown, 2007*). No Brasil, estas condutas terapêuticas seguem leis federais e normas estaduais (*São Paulo, Resolução SS n^o 39, 2006*).

O IFN- α é uma citocina com importante papel antiviral no sistema de defesa natural do hospedeiro. É através de ligação de alta afinidade ao seu

receptor, o IFNAR, que o IFN- α exerce sua ação (Pestka, 2000). Após a ligação ao seu receptor, o IFN- α estimula uma cascata intracelular de sinalização que inclui a ativação das tirosinas quinases Janus (JAK) 1 e Tyk2 associadas ao receptor, seguido da fosforilação de transdutores de sinal e ativadores de transcrição 1 e 2 (STAT1 e STAT2, respectivamente) (Pestka, 2000). As fosforiladas STAT1 e STAT2 ligam-se a proteína p48, formando o *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3), que se transloca para o núcleo e liga-se ao *IFN-stimulated regulatory element* (ISRE) nas seqüências promotoras de uma variedade de genes induzíveis pelo IFN- α incluindo proteínas antivirais como a 2'5'-oligoadenilato sintetase (2'5'OAS), a proteína quinase ativada por RNA (PKR) e a proteína Mx (Pestka, 2000).

Interferons-peguilados são produzidos pela ligação de uma molécula inerte de polietileno glicol ao IFN- α recombinante, reduzindo, dessa forma, o *clearance* renal, alterando o metabolismo e aumentando a meia-vida da molécula de interferon, mantendo, porém, todas as suas características imunoestimulatórias (Reddy et al., 2001; Strader et al., 2004).

A ribavirina é um nucleosídeo sintético que é estruturalmente similar a guanosina (Leyssen et al., 2000). A ribavirina entra rapidamente nas células eucarióticas, e depois de sofrer fosforilação intracelular exibe atividade virustática contra um largo espectro de vírus de DNA e RNA (Leyssen et al., 2000).

O IFN- α é o agente terapêutico mais amplamente usado nas hepatites virais, pois se difunde rapidamente por via sistêmica, protegendo os órgãos contra a disseminação do vírus (Pawlotsky, 2003; Pestka, 2000). Embora, a

associação de IFN- α e ribavirina apresenta boa eficácia terapêutica no tratamento da hepatite C crônica ainda apresenta vários problemas:

- necessita de longos períodos de tratamento (pelo menos 24 semanas para os genótipos 2 e 3; e 48 semanas para o genótipo 1);
- são variados e freqüentes os efeitos adversos descritos;
- é uma terapia de alto custo;
- tem-se observado que as taxas de resposta virológica sustentada não ultrapassam 54-63%, sendo freqüentes os pacientes que sofrem recorrência durante ou após o término do tratamento (*Hadziyannis et al., 2004; Hofmann et al., 2005; Manns et al., 2006; Mihm et al., 2006; Cavalletto et al., 2000; DiMarco et al., 2000; McHutchison et al., 1998; Baron e Dianzani, 1994; Niederau et al., 1996; Poynard et al., 1996; Shackel e McCaughan, 2007*).

A resistência ao tratamento com IFN- α tem sido atribuída a vários fatores virais e a fatores inerentes ao hospedeiro (*Almarri et al., 1998; Jacobson Brown e Neuman, 2001; Neuman et al., 2001; Pawlotsky, 2003; Tan e Katze, 2001; Taylor et al., 2000; Tsubota et al., 1994; Tsuda et al., 2004; Yoshioka et al., 1995*).

1.7. Fatores de resistência à terapia

Dentre os fatores virais, dois apresentam importância significativa na resposta terapêutica: o genótipo viral predominante na infecção e a presença de mutações específicas no genoma viral capazes de inibição direta de

proteínas da resposta antiviral do hospedeiro (*Zein, 2000; Tan e Katze, 2001; Taylor et al., 2000*).

O genótipo viral é um importante fator preditivo na resposta ao IFN- α . Em geral, os genótipos 1a e 1b do VHC (predominante na América do Sul e do Norte) exibem um alto nível de resistência à terapia com IFN- α , enquanto que os genótipos 2 e 3 são mais sensíveis (*Taylor et al., 2000*). As variações presentes nas quasispecies também exercem pressão na resposta imune (*Strauss, 2001*).

Outro fator viral importante na resposta terapêutica é o aparecimento de mutações em regiões específicas do genoma viral. Mutações nas regiões da proteína estrutural E2 e da proteína não-estrutural NS5A, sendo a NS5A também conhecida como região determinante de sensibilidade ao interferon (ISDR), são as mais estudadas e estão relacionadas à inibição específica de proteínas antivirais ativadas em resposta ao IFN- α . A proteína PKR é o principal alvo da inibição pelas proteínas virais E2 e NS5A. A E2 e NS5A bloqueiam a dimerização da PKR essencial para sua ativação e posterior fosforilação do fator de iniciação da transdução viral 2 (eIF-2), inibindo assim a síntese de proteínas virais. A E2 pode também inibir diretamente a PKR atuando como pseudosubstrato para a enzima (*Tan e Katze, 2001; Taylor et al., 2000*). A NS5A pode também bloquear a transdução do IFN- α , pelo bloqueio da ligação dos STATs à p48, por mecanismo pouco conhecido (*Tan e Katze, 2001; Heim et al., 1999*).

Com relação ao hospedeiro vários fatores também podem afetar a resposta terapêutica ao IFN- α . Podemos destacar a expressão e

funcionalidade dos IFNAR, alterações na expressão de moléculas de HLA, expressão de algumas citocinas e expressão de proteínas regulatórias de citocinas.

As citocinas produzidas no fígado são essenciais na defesa do hospedeiro contra a invasão pelo VHC, mas elas também estão implicadas na lesão hepatocelular observada na maioria dos pacientes cronicamente infectados pelo VHC. Durante o curso da infecção, alterações no equilíbrio das citocinas imunoestimulatórias e inibitórias pode prolongar a resposta inflamatória e levar a necrose, fibrose ou doença hepática crônica. As taxas de expressão de várias citocinas estão sendo associadas com o grau da lesão hepática e com a resposta terapêutica observada na terapia com IFN- α (Neuman et al., 2001; Powell et al., 2000).

A persistência do vírus e a resposta à terapia antiviral têm sido associadas com a produção inapropriada de concentrações plasmáticas de interleucina 10 (IL10), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator beta1 transformador de crescimento (TGF- β 1), entre outras importantes citocinas e quimiocinas (Edwards-Smith et al., 1999; Vidigal et al., 2002; Yee et al., 2001).

Diferenças individuais nos níveis de séricos de citocinas estão associadas principalmente a fatores genéticos, como mutações e polimorfismos em regiões regulatórias dos genes dessas citocinas (Clementi e Gianantonio, 2006; Hill, 2001).

1.8. Susceptibilidade genética e hepatite C

O desenvolvimento de uma doença infecciosa resulta de uma complexa interação entre o microorganismo, o hospedeiro e o ambiente. Muitos fatores estão envolvidos na determinação da gravidade da progressão individual da doença e na sua taxa de infecção em uma população. Existem muitas evidências de que fatores genéticos também estejam associados ao desenvolvimento de uma doença infecciosa (*Burgner et al., 2006; Clementi e Gianantonio, 2006; Hill, 2001*).

A susceptibilidade a doenças infecciosas não segue os padrões simples de herança mendeliana, e a resposta imune em humanos é um complexo sistema geneticamente controlado (*Burgner et al., 2006; Clementi e Gianantonio, 2006*).

Doenças infecciosas exercem grande pressão seletiva numa população, e em função disso, os genes envolvidos na resposta imunológica são numerosos e diversificados no genoma humano, indicando uma vantagem evolucionária de uma resposta imune variada a uma ampla gama de patógenos (*Burgner et al., 2006*).

A resposta imune a uma doença infecciosa pode ser definida como sendo poligênica (envolve mais de um gene) e multifatorial (dependendo da interação de mais de um gene e um ou vários fatores ambientais) (*Clementi e Gianantonio, 2006; Hill, 2001; Tuite e Gros, 2006*).

Os resultados de estudos de doenças autoimunes e infecciosas indicam que muito do componente genético é especificado pela

susceptibilidade de muitos genes com pouca influência na resposta imune quando analisados isoladamente, mas com efeitos somados quando analisados dentro da resposta imune total (*Hill, 2001*).

Descobertas recentes dentro dos complexos mecanismos de imunidade inata humana sugerem que a variabilidade genética nos genes que codificam esses mecanismos tem um papel importante nas diferenças de susceptibilidade, gravidade e resposta a terapia nas doenças infecciosas e autoimunes (*Lazarus et al., 2002*).

A explosão de dados genéticos gerados a partir da elucidação da seqüência genômica humana gerou importantes descobertas a respeito da organização estrutural e função dos genes envolvidos na resposta imunológica. Embora extremamente conservados entre várias espécies, os genes da resposta imune inata têm demonstrado substancial variabilidade interindividual principalmente na forma de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (*Hinds et al., 2006; Lazarus et al., 2002; Ouyang e Krontiris, 2006*). Outras alterações genéticas também encontradas nesses genes são deleções de seqüências e a presença de microsatélites (padrões repetidos de dois a quatro pares de bases) tanto em regiões regulatórias dos genes como em regiões codificantes (*Hinds et al., 2006; Lazarus et al., 2002*). Variações genéticas nesses genes podem ter um papel chave na susceptibilidade a várias doenças de natureza infecciosa ou autoimune, que tenham algum componente inflamatório (*Lazarus et al., 2002*).

SNPs, deleções/inserções e microsatélites encontrados nesses genes são segregados de forma não aleatória, num fenômeno genético conhecido

como *linkage disequilibrium* ou desequilíbrio de ligação (LD). *Linkage disequilibrium* é um termo utilizado nos estudos de genética de populações e pode ser definido como uma associação não aleatória de alelos em dois ou mais sítios gênicos vizinhos que são herdados juntos de forma mais freqüente do que a esperada pelo simples acaso, não necessariamente no mesmo cromossomo (*Burgner et al., 2006; Zhao et al., 2007*). Através desse fenômeno, essas alterações genéticas podem ser herdadas na forma de Haplótipos, isto é, uma combinação de diferentes SNPs ou deleções/inserções ou microsátélites segregadas como uma única unidade gênica (*Burgner et al., 2006*).

Vários estudos têm demonstrado a influência de fatores genéticos na infecção causada pelo VHC (*Aguilar-Reina et al., 2005; Barrett et al., 2003; Dai et al., 2005; Dai et al., 2006; Edwards-Smith, 1999; Huang et al., 2007; Lio et al., 2003; Minton et al., 2005; Paladino et al., 2006; Persico et al., 2006; Thio et al., 2000; Saito et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Valenti et al., 2005; Yee et al., 2001*).

Os estudos realizados nos genes do complexo antígeno leucocitário humano (HLA) foram os primeiros estudos a mostrarem associação da infecção pelo VHC com características genéticas. A presença dos alelos DQB*0301, DQA1*03, DRB1*1101, DRB1*1302, DR13 e DR5 já foram associados com o clareamento viral, progressão e susceptibilidade a infecção pelo VHC em diversas populações (*Fanning et al., 2001; Hong et al., 2005; Thio et al., 2000; Yee, 2004*).

Outros genes envolvidos na resposta imunológica ao VHC estão

sendo extensamente estudados atualmente. Um SNP na posição -670 da região promotora do gene *Fas* onde ocorre a troca de uma adenina por guanina, o alelo -670A foi associado a altos níveis de necrose periportal em paciente crônicos pelo VHC (Aguilar-Reina et al., 2005).

Genes relacionados a citocinas também estão sendo alvo de diversos estudos recentes, entretanto, maior interesse está sendo dado ao estudo de genes relacionados direta ou indiretamente à resposta ao IFN- α .

Diversos polimorfismos nos genes das citocinas IL1, IL6, TGF- β , Interferon- γ foram estudados em diversas populações, contudo, com resultados discordantes (Barrett et al., 2003; Dai et al., 2005; Huang et al., 2007; Minton et al., 2005; Paladino et al., 2006; Thio et al., 2000; Saito et al., 2004).

SNPs encontrados nos genes do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e na interleucina 10 (IL10) parecem ter um importante papel na resposta à terapia com IFN- α . Porém, diversos estudos realizados com diferentes populações apresentaram resultados conflitantes, mostrando forte associação com a resposta ao tratamento antiviral em alguns, e pouco ou nenhuma associação em outras, mostrando claramente o efeito da heterogeneidade genética das populações de estudo (Barrett et al., 2003; Dai et al., 2005; Dai et al., 2006; Edwards-Smith, 1999; Lio et al., 2003; Minton et al., 2005; Paladino et al., 2006; Persico et al., 2006; Thio et al., 2000; Valenti et al., 2005; Yee et al., 2001).

1.9. Interleucina 10

Em 1989, Fiorentino et al. (1989) descreveram uma substância que estava presente no sobrenadante de cultivos celulares de linfócitos Th2, e que era capaz de inibir a produção de citocinas produzidas por células Th1 em cultivos celulares. Tal substância foi denominada Fator Inibidor da Síntese de Citocinas.

Posteriormente essa citocina passou a ser chamada "interleucina 10", uma vez que as análises imunoquímicas e bioquímicas indicaram que o Fator Inibidor da Síntese de Citocinas era uma nova citocina (*Moore et al., 1990*).

1.9.1. Proteína, estrutura gênica, receptor e expressão do gene IL10

A IL10, é uma estrutura homodimérica, com 18 kDa, sem carboidratos detectáveis, constituída por uma cadeia polipeptídica que se estrutura em quatro α -hélices (*Moore et al., 2001*) (Figura 3).

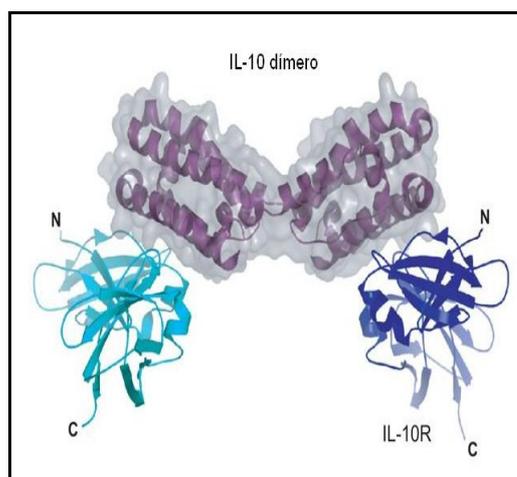


Figura 3. Estrutura tridimensional da IL10 e do IL10R

Fonte: <http://stke.sciencemag.org/content/sigtrans/vol2004/issue231/images/large/2312004re7F8.jpeg>

O gene IL10 contém cinco éxons e ocupa aproximadamente 5,1 kb no cromossomo 1 (Kim *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 2001), entre 1q31 e 1q32 (Eskdale *et al.*, 1997) (Figura 4). Em contraste com o que ocorre com os genes que codificam outras citocinas, a transcrição do gene IL10 pode ser regulada por fatores transcricionais Sp1 e Sp3, expressos constitutivamente em diferentes tipos celulares. Esses fatores transcricionais ligam-se às seqüências-consenso ricas em G e C, presentes na região promotora do gene IL10 (Brightbill *et al.*, 2000; Tone *et al.*, 2000). Genes homólogos ao gene IL10 foram identificados no genoma humano (Fickenscher *et al.*, 2002) e também no genoma de murinos (Soo *et al.*, 1999). Foram também encontrados genes homólogos ao gene IL10 no vírus Epstein-Barr (EBV), herpesvírus tipo 2 equino (EHV2), poxvírus Orf e citomegalovírus humano (Fickenscher *et al.*, 2002) Há evidência que os mesmos representam genes de origem animal que, incorporados ao genoma viral, permitiram interações particulares do vírus com o hospedeiro (Moore *et al.*, 2001).

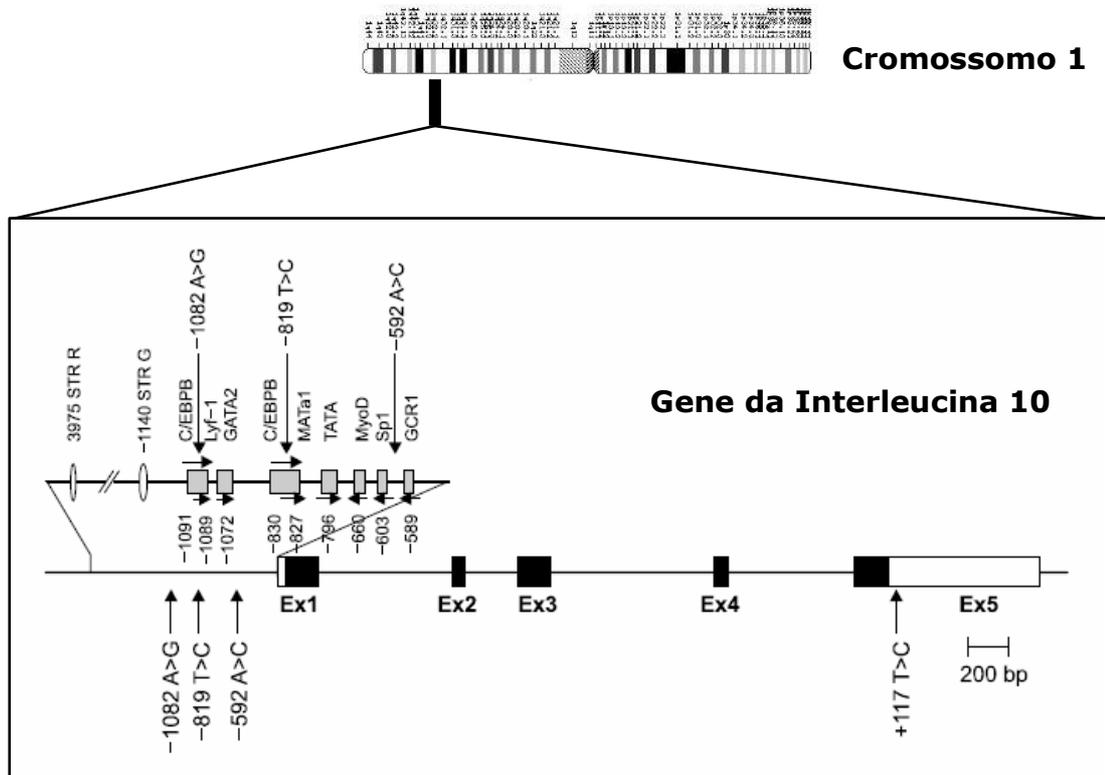


Figura 4. Representação esquemática da estrutura do gene da IL10. Éxons estão marcados por blocos pretos e a região 5' e 3' UTR por blocos brancos. Os sítios de ligação dos fatores de transcrição estão marcados por blocos cinza.

A IL10 se liga ao seu receptor, IL10R1, com alta afinidade (kd ~ 35-200 pM) (Moore *et al.*, 2001). O IL10R1 utiliza uma subunidade acessória para a sinalização, IL10R2. A ativação que acontece após a ligação da IL10 a seus receptores ocorre em função da regulação gênica e a via de ativação mais estudada é a JAK/STAT (STAT-Signal Transducer and Activator of Transcription, Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição) (Moore *et al.*, 2001; Murray, 2007). A fosforilação das tirosinas-quinase desencadeia a dimerização de STATs que, deslocadas para o núcleo, atuam sobre genes-alvo, podendo inibir a expressão dos genes que codificam outras citocinas, como IFNA e IFNG (Ito *et al.*, 1999) (Figura 5).

1.9.2. Função biológica da citocina IL10

A IL10 também pode ser produzida por linfócitos Th2, linfócitos Th0, células B, queratinócitos e células dendríticas (*Blackburn e Wherry, 2007; Eskdale et al., 1998; Mocellin et al., 2003*).

A IL10 é uma citocina antiinflamatória que inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios normalmente secretados por monócitos/macrófagos ativados, tais como: IL1 α , IL1 β , IL6, IL8, IL12, IL18, GM-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Monócitos), TNF- α , LIF (Fator Inibidor da Leucemia), PAF (Fator Ativador de Plaquetas), TFA (Fator de Atividade Tissular), quimiocinas e PGE2 (prostaglandina-E2) (*Fiorentino et al., 1991; Mocellin et al., 2003*).

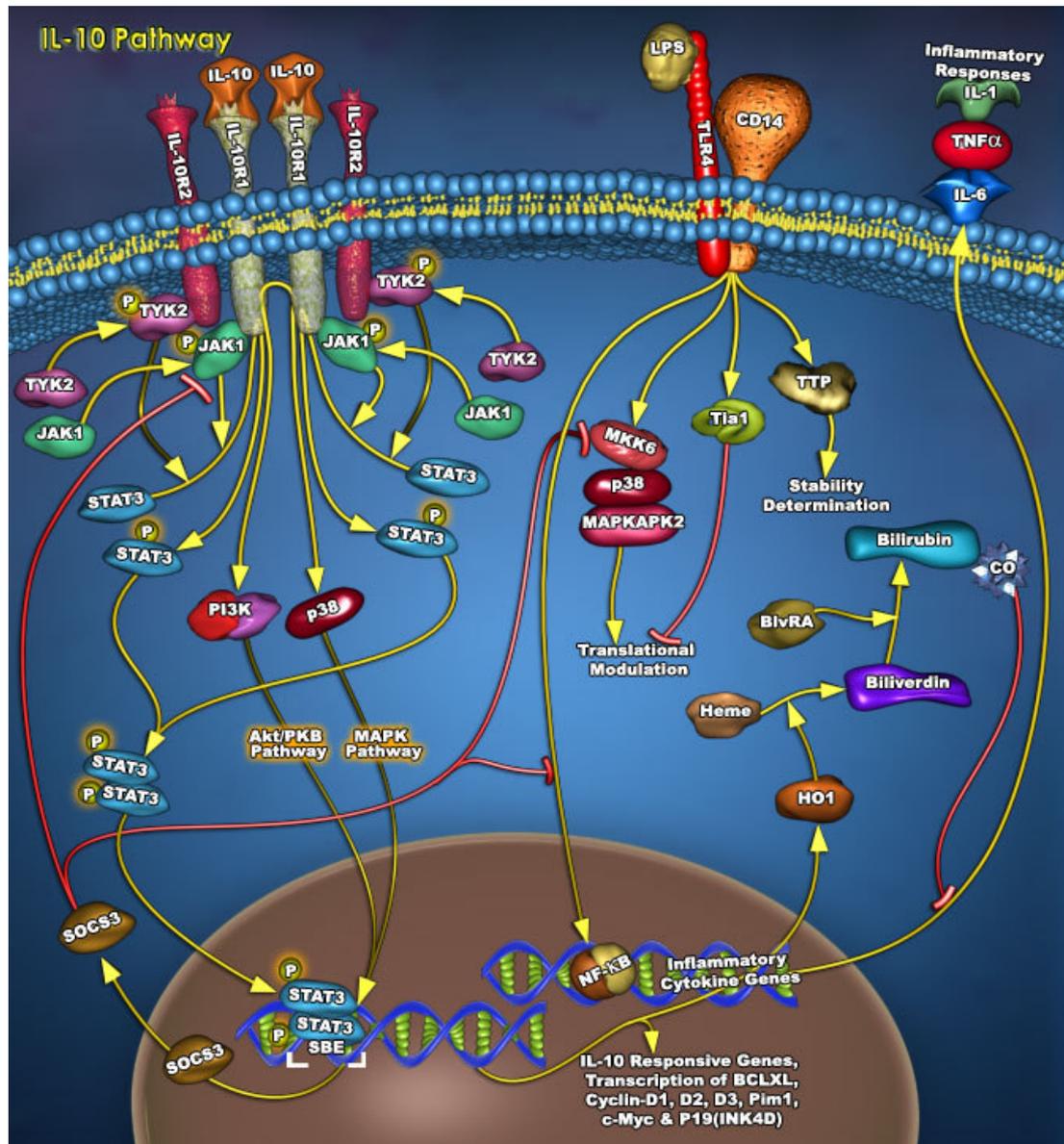


Figura 5. Vias celulares ativadas pela IL10.

Os monócitos/macrófagos parecem ser os alvos principais da IL10 que inibe a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7), e CD86 (B7.2) em monócitos, mesmo após a indução dessas moléculas por IL4 ou IFN- γ , reduzindo drasticamente a proliferação de linfócitos T (*Mocellin*

et al., 2003). Ao contrário, a IL10 estimula a expressão de receptores para a porção Fc de IgG (Imunoglobulinas G) em monócitos/macrófagos humanos, fato correlacionado com o aumento da sua capacidade fagocítica (*Spittler et al., 1995*).

Células dendríticas humanas e murinas se caracterizam pela sua capacidade de ativar células T em repouso e iniciar uma resposta imune. Em geral, os efeitos da IL10 sobre as células dendríticas são consistentes com inibição da resposta inflamatória Th1 (*Blackburn e Wherry, 2007; Mocellin et al., 2003; Moore et al., 2001*).

A inibição das células Th1 pela IL10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas Th1 por células T e macrófagos. A IL10 inibe fortemente a produção da citocina IL12, a qual pode induzir a síntese de IL10 por células T, sugestivo de que o sistema imune é equipado com um mecanismo de feedback negativo relacionado à ativação das células T (*Mocellin et al., 2003*).

O efeito inibidor da IL10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (*Moore et al., 2001*).

1.9.3. Polimorfismos e níveis de expressão do gene IL10

Estudos familiares e de gêmeos sugerem que aproximadamente 75% da variação na produção da IL10 é geneticamente determinada. Há diferenças significativas na capacidade de síntese de IL10 após estimulação

de sangue total com LPS em culturas in vitro (*Edwards-Smith et al., 1999; Kimball et al., 2001*).

Vários polimorfismos dentro da região promotora do gene IL10 foram descritos como funcionais, incluindo duas repetições dinucleotídicas de citosina e adenina (CA) e três polimorfismos bialélicos na região promotora -1082, -819 e -592, designados a partir do sítio de início da transcrição (+1).

Com relação aos três polimorfismos bialélicos que foram identificados na região promotora -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) ocorre desequilíbrio de ligação entre os SNPs -819 e -592 e somente três de oito possíveis haplótipos (GCC, GCA, GTC, GTA, ACC, ACA, ATC e ATA) foram encontrados em populações caucasóides: GCC, ACC e ATA. Os genótipos -1082: GG, GA e AA, correspondem aos fenótipos alto, intermediário e baixo produtor da citocina IL10, independente das variações nucleotídicas presentes nas posições -819 e -592 do gene IL10 (*Eder et al., 2007; Pawlik et al., 2005; Persico et al., 2006; Yee et al., 2001*).

Vários estudos têm associado a resistência à terapia com IFN- α com os níveis de expressão da IL10. Altos níveis de IL10 no plasma antes do tratamento têm sido descritos como fatores preditivos de uma resposta sustentada à terapia antiviral para a infecção crônica pelo VHC (*Amaraa et al., 2002; Edwards-Smith et al., 1999; Knapp et al., 2003; Lio et al., 2003; Vidigal et al., 2002; Yee et al., 2001*).

Na literatura encontramos poucos estudos avaliando a presença dos polimorfismos da região promotora da IL10 na população brasileira associados a doenças infecciosas (*Albuquerque et al., 2004; Malhota et al.,*

2005; Moraes et al., 2003; Scarel-Caminaga et al., 2004; Xavier et al., 2007).

Apesar do aparente importante papel desempenhado pela IL10 na resposta a infecção crônica pelo VHC, não há estudos avaliando a influência dos polimorfismos da região promotora desse gene na nossa população, que apresenta possivelmente características genéticas distintas das encontradas em populações européias ou norte-americanas.

2. OBJETIVOS

- 2.1.** Avaliar a frequência relativa dos polimorfismos -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) da região promotora do gene da IL10 em indivíduos portadores de infecção crônica pelo VHC tratados com combinação de interferon e ribavirina.
- 2.2.** Avaliar a influência dos polimorfismos -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) da região promotora do gene da IL10 sobre a resposta à terapêutica em indivíduos portadores de infecção crônica pelo VHC.
-

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O grupo de estudo (GE) foi constituído por 108 pacientes com infecção crônica por VHC e histórico de ao menos uma PCR-VHC positiva, tratados com interferon ou interferon-peguilado em associação com ribavirina e idade entre 12 e 65 anos, selecionados aleatoriamente entre os pacientes atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais, departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para a inclusão dos indivíduos no estudo, foram obedecidos os seguintes critérios: anti-VHC positivo e histórico de PCR positiva e de tratamento antiviral contra o VHC.

Foram excluídos os indivíduos que apresentaram hepatocarcinoma, cirrose descompensada (*Child B* ou *C*), doença grave concomitante, mulheres grávidas ou em aleitamento e pacientes com diagnóstico de HIV e/ou VHB.

Ao final da terapia, os indivíduos que não apresentaram normalização nos valores de atividade sérica de ALT e/ou negatificação do RNA-VHC, foram classificados como não-respondedores (NR) e os que apresentaram normalização desses valores foram classificados como respondedores (SR).

Esta classificação foi realizada de acordo com os dados obtidos no levantamento dos prontuários de cada indivíduo participante.

O grupo de NR foi constituído por 54 indivíduos, e o grupo classificado como SR foi constituído por 54 indivíduos.

O presente estudo teve a colaboração de pesquisadores do Laboratório de Hepatites (LIM 47) do Departamento de Moléstia Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2. Aspectos éticos do estudo

Os indivíduos foram entrevistados e informados do teor do estudo e, antes de qualquer procedimento, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido concordando em participar do mesmo (Anexo A). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-HCFMUSP) sob o número 963/02, em 11/12/2002.

3.3. Material biológico

Amostras de sangue periférico foram obtidas após jejum de 8 a 12 horas, por punção venosa, no período de janeiro de 2002 a janeiro 2006. Um tubo de 4,5 mL com EDTA (1 mg/mL de K₃EDTA por mL de sangue) foi utilizado para a extração do DNA genômico e um tubo de 10 mL seco (sem anticoagulante) foi utilizado para pesquisa de RNA-VHC e genotipagem do VHC.

3.4. Métodos

3.4.1. *Determinação das enzimas hepáticas (ALT, AST e GGT)*

As dosagens das enzimas hepáticas alanina amino-transferase (ALT), aspartato amino-transferase (AST) e gama glutamil-transferase (GGT) foram realizadas no equipamento COBAS INTEGRA (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basileia, Suíça), segundo as instruções do fabricante. Os valores de referência utilizados estão discriminados no Quadro 1. Estes testes foram realizados na Divisão de Laboratório Central do HC-FMUSP.

Quadro 1. Valores de referência utilizados para ALT, AST e GGT

Exames (U/L)*	Valores de Referência	
	Homem	Mulher
ALT	10 - 44	10 - 36
AST	10 - 34	10 - 30
GGT	11 - 50	7 - 32

* U/L: unidades por litro

3.4.2. *Detecção do vírus da hepatite C por PCR*

Foi utilizado uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) qualitativa para a detecção no sangue, utilizando o AMPLICOR Hepatitis C Vírus (HCV) Test, v 2.0 (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, USA), baseado em cinco processos principais: preparação da amostra; transcrição reversa do RNA alvo para produzir DNA complementar (cDNA); amplificação por PCR do cDNA alvo usando iniciadores específicos complementares do VHC;

hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos; e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica. O limite de detecção considerado no teste foi 50 UI/ml (*Desombere et al., 2005; Pawlotsky, 2002a*).

3.4.3. Genotipagem do vírus da hepatite C por hibridização reversa (Line Probe Assay - LIPA)

Para a genotipagem do vírus da hepatite C foi utilizada a técnica de hibridização reversa (VERSANT™ HCV Genotype Assay-LIPA, Bayer Corp., Tarrytown, NY, USA). O procedimento foi realizado em 3 etapas: hibridização, lavagem e desenvolvimento de cor.

Hibridização: brevemente, em uma canaleta de reação, misturou-se 10 µL de produto de PCR gerado na reação de Amplicor Roche e 10 µL de uma solução denaturante, seguido de um período de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente (TA). Após adicionou-se 2 mL de uma solução de hibridização agitando-se manualmente. Na próxima etapa, mergulharam-se as fitas de hibridização nesta solução e incubou-se por 1 hora a 50 °C.

Lavagem: O líquido das canaletas foi aspirado com bomba de vácuo e as fitas foram lavadas duas vezes com 2 mL de uma solução de lavagem, sendo agitadas manualmente por 1 minuto entre cada lavagem. Foram adicionados 2 mL da solução de lavagem, incubando-se após, em banho-maria sob agitação por 30 minutos a 50 °C.

Desenvolvimento de cor: A solução de lavagem foi aspirada e as fitas

lavadas duas vezes com a solução de lavagem, para cada lavagem houve agitação por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 2 mL de conjugado diluído, que foi incubado a TA sob agitação por 30 minutos.

Depois deste período, lavou-se novamente duas vezes com a solução de lavagem e uma vez com diluente do substrato, agitando-se por 1 minuto entre cada lavagem.

Após a aspiração do diluente do substrato, adicionou-se 2 mL do Substrato Diluído, incubando-se após, por 30 minutos sob agitação à TA. O substrato diluído foi aspirado e as fitas foram lavadas com água destilada duas vezes com agitação de 3 minutos após cada lavagem. As fitas foram retiradas da água e secadas em papel absorvente e interpretadas visualmente segundo o mapa fornecido pelo fabricante do kit. (*Stuyver et al., 1996*).

3.4.4. Extração do DNA genômico

DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina modificado (*SALAZAR et al., 1998*). Brevemente, as amostras de sangue foram submetidas a lise celular com 900 µL do tampão Tris-1 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µL do tampão Tris-2 (Tris-HCl a 10 mM pH 8,0, KCl a 10 mM, MgCl₂ a 10 mM, EDTA a 2 mM pH 8,0, NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µL de NaCl 5 M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e

purificado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspendido em 100 µL do tampão TE (Tris-HCl a 10 mM e EDTA a 1mM, pH 8,0) e mantido a -20°C.

A integridade das amostras de DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE (Tris-acetato a 400 mM e EDTA a 10 mM) em uma cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). O gel foi imerso em tampão TAE e as amostras contendo 5 µL do DNA e misturadas a 2 µL do tampão de corrida BlueJuice™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) foram aplicadas. A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 45 minutos, utilizando uma fonte modelo EPS 301 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas no sistema de digitalização de imagens MultiImage Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA) sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (10 µg/mL).

3.4.5. *Análise dos polimorfismos -1082(G>A), -819(C>T) e -592(C>A) da região promotora do gene da IL10*

Para a realização da análise dos polimorfismos do promotor da IL10 foram realizadas reações em cadeia pela polimerase alelo-específicas (ARMS-PCR) conforme descrito na literatura (Ye *et al.*, 2001). Esta técnica é baseada na utilização de dois pares de oligonucleotídeos iniciadores (*PRIMERS*) diferentes ao mesmo tempo: um par externo (*sense* e *antisense* externos) a posição do polimorfismo (SNP) e um oligonucleotídeo específico

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

para cada alelo a ser identificado, sendo um oligonucleotídeo desenhado para ter a função de iniciador *sense* e o outro como *antisense* (Figura 6). Durante a dinâmica da reação, se ocorreu o alinhamento de um oligonucleotídeo alelo específico (pela presença do alelo no genoma) foi formado um produto de PCR específico para aquele alelo. Se o primer alelo específico for o *antisense* da reação, o oligonucleotídeo *sense* externo à região do polimorfismo foi utilizado para a produção deste fragmento; se o primer alelo específico tiver sido o *sense*, o oligonucleotídeo *antisente* externo foi o utilizado. Independente da formação do produto alelo específico, sempre foi formado na reação um produto de PCR correspondente ao gerado pelos primers externos ao polimorfismo em questão, funcionando como um controle da reação em si.

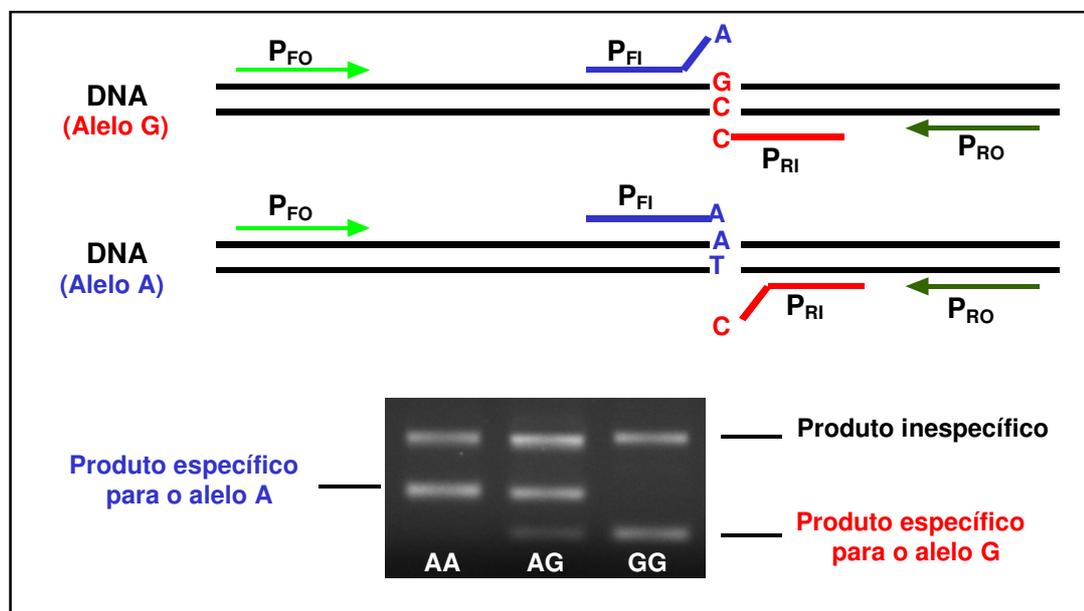


Figura 6. Representação esquemática da técnica de ARMS-PCR utilizada para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10. (P_{FO} : iniciador *sense* externo; P_{RO} : iniciador *antisense* externo; P_{FI} : iniciador *sense* alelo específico; P_{RI} : iniciador *antisense* alelo específico).

Na realização das reações foram sintetizados os oligonucleotídeos iniciadores para a identificação de dois de cada um dos três polimorfismos dessa região do gene da IL10, conforme indicados no Quadro 2. Para a região -819 (C>T), em virtude de este polimorfismo estar em desequilíbrio de ligação com o -592 (C>A), não foi necessário o desenho de iniciadores específicos para esta região. Foram desenhados dois pares de iniciadores para cada reação, sendo um par externo à região do polimorfismo (P_{FO} e P_{RO}) e um par alelo específico (P_{FI} e P_{RI}).

Quadro 2. Seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10

SNP	Primer	Seqüências	Tm*
-1082(G>A)	P1 _{FI} (Alelo G)	5' - AAC ACT ACT AAg gCT TCT TTg gTA A - 3'	58°C
	P2 _{RI} (Alelo A)	5' - TCT TAC CTA TCC CTA CTT CCA CC - 3'	
	P3 _{FO}	5' - gTT CCT CCC AgT TAC AgT CTA AAC - 3'	
	P4 _{RO}	5' - AgA ATg AAA CCT Tgg ATT AAA TTg - 3'	
-592(C>A)	P5 _{FI} (Alelo C)	5' - ACA TCC TgT gAC CCC gCC TAT C - 3'	61°C
	P6 _{RI} (Alelo A)	5' - TTC CAg AgA CTg gCT TCC TAC ggT - 3'	
	P7 _{FO}	5' - AgA ggT ggA AAC ATg TgC CTg AgA - 3'	
	P8 _{RO}	5' - Agg CAg TCA CCT TAg gTC TCT ggg - 3'	

*Tm=temperatura de fusão ou melting

As seqüências foram confirmadas por meio do banco de dados BLAST, contido no site do National Center of Biotechnology Information (NCBI) do NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

As reações de ARMS-PCR foram realizadas com os seguintes parâmetros: em um volume final de 50 µL, foi aplicada uma unidade da

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

enzima polimerase Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity 5U/ μ L (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), tampão da reação de PCR [600 mM Tris-SO₄ (pH 8.9), 180 mM sulfato de amônio], desoxinucleotídeos (dNTP) na concentração de 0,2 mM cada (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), cada oligonucleotídeo nas concentrações finais de 0,30 mM para os P_{RI} e P_{FI}, e 0,15 mM para os P_{RO} e P_{FO}, e 30 ng de DNA genômico. Os parâmetros (tempos de hibridação e extensão, temperaturas de desnaturação, hibridação e extensão, e o número de ciclos) foram testados e otimizados no termociclador PTC 200[™] (M&J Research, Watertown, MA, EUA).

As condições de amplificação foram as seguintes:

- um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos;
- seguidos de 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, pareamento a 58°C ou 61°C por 1 minuto e extensão a 70°C por 1 minuto;
- um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após a ARMS-PCR, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TAE (Tris-acetato a 400 mM e EDTA a 10 mM) em uma cuba eletroforética (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Foram aplicados 10 μ L do produto de PCR gerado, diluído em 2 μ L de tampão de corrida BlueJuice[™] (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA) e 5 μ L do marcador de tamanho molecular de DNA de 100 bp (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 1 hora, utilizando uma fonte modelo EPS 301

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Após a eletroforese, as bandas de DNA foram visualizadas no sistema de digitalização de imagens Multimage Light Cabinet (AlphaInnotech, San Leandro, CA, EUA) sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídeo (10 µg/mL) e as imagens registradas em arquivos digitais.

Os alelos dos polimorfismos da região promotora do gene da IL10 foram identificados nas imagens geradas, de acordo com o tamanho dos fragmentos gerados nas reações de PCR realizadas (Quadro 3).

Quadro 3. Padrão dos tamanhos dos produtos de PCR utilizados para a identificação dos polimorfismos da região promotora da IL10

SNP	Produto PCR (pares de bases)	Genótipos IL-10
-1082(G>A)	Inespecífico 427 pb Alelo G 290 pb Alelo A 206 pb	GG/GA/AA
-592(C>A)	Inespecífico 203 pb Alelo C 146 pb Alelo A 103 pb	CC/CA/AA

A Figura 7 mostra a imagem de uma eletroforese em gel de agarose de produtos de ARMS-PCR de indivíduos homocigotos GG e AA, e heterocigotos GA para o polimorfismo -1082(G>A) da região promotora da IL-10.

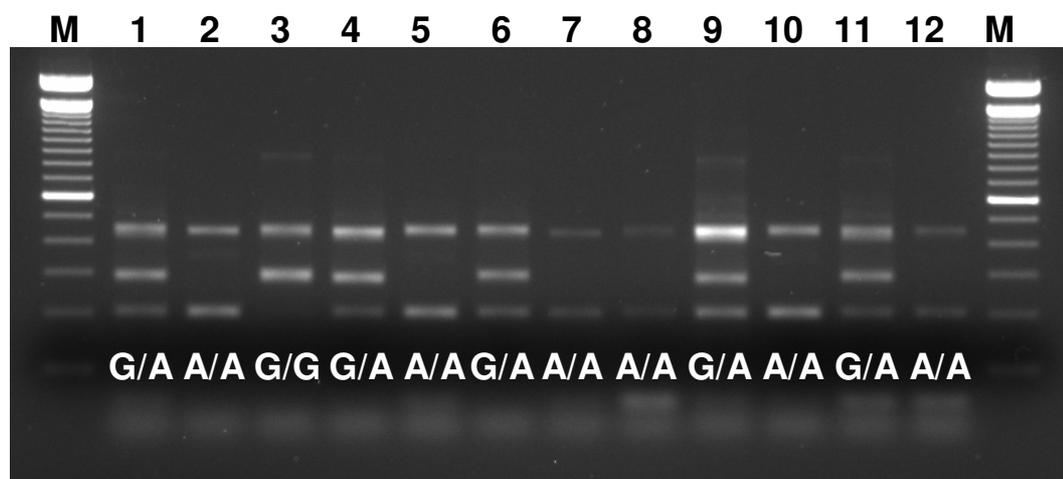


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 3% dos produtos de amplificação do polimorfismo -1082(G>A) da região promotora do gene da IL10. M representa um padrão de tamanho molecular de 100 pares de bases. Nas linhas 1 a 12 genótipos identificados para a região -1082(G>A).

3.4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism para Windows, versão 4.0 (GraphPad Software, EUA) e apresentados em forma gráfica por utilização do Software Excel (Microsoft, EUA). Para o cálculo do equilíbrio de Hardy-Weinberg e da análise de desequilíbrio de ligação foi utilizado o programa ARLEQUIN Ver 3.1 (*Excoffier et al., 2005*). Foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos níveis descritivos (valores de *P*) foram inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Dados epidemiológicos, clínicos, bioquímicos e virológicos dos indivíduos

Dos 108 pacientes selecionados, 58 eram homens e 50 mulheres. A média de idade do grupo de estudo foi de 45,9 anos, com mediana de 48 anos. Os dados epidemiológicos, clínicos e virológicos dos indivíduos estão descritos nas **Tabelas 1 e 2**.

Com relação ao genótipo viral foram encontradas as seguintes freqüências nos pacientes selecionados: **1** (74,1%), **3** (18,5%), **2** (5,6%) e **5** (1,8%).

Os pacientes selecionados para o estudo receberam como terapia antiviral: interferon convencional (**I**), interferon convencional associado à ribavirina (**I+R**) e interferon-peguilado associado à ribavirina (**PegI+R**) nas doses padrão ou individualizadas segundo critérios médicos. Entre os pacientes selecionados foram encontradas as seguintes freqüências para a terapia antiviral utilizada: **I** 6,5%, **I+R** 79,6% e **PegI+R** 13,9%.

Na **Tabela 1**, são descritas as características dos pacientes por sexo. As médias das idades foram semelhantes entre homens e mulheres e não houve diferença significativa entre os pacientes selecionados para o estudo, quando separados com relação ao sexo, referente ao genótipo viral, terapia antiviral utilizada ou tipo de desfecho a terapia (se SR ou NR).

RESULTADOS

Tabela 1. Características epidemiológicas, clínicas e virológicas dos indivíduos participantes do estudo classificados por sexo

Parâmetros	Mulheres (n = 50)	Homens (n = 58)	
Idade (anos)*	46 ± 12 [21 - 68]	46 ± 11 [23 - 62]	$P=0,9676^a$
Resposta terapia			
NR	20 (40,0%)	24 (41,4%)	$\chi^2 = 0,0212$; 1g.l; $P = 0,8843$
SR	30 (60,0%)	34 (58,6%)	
Genótipo Viral			
1	39 (78,0%)	41 (70,1%)	$P=0,8191^b$
Não 1	11 (22,0%)	14 (29,9%)	
Terapia			
I	3 (5,6%)	4 (7,4%)	$\chi^2 = 0,7840$; 2g.l; $P=0,6757$
I+R	47 (87,0%)	39 (72,2%)	
PegI+R	4 (7,4%)	11 (20,4%)	

***Média±DP**; valores mínimo e máximo entre colchetes; **n**, número de indivíduos; **g.l.**, grau de liberdade; **I**, interferon convencional; **I+R**, interferon convencional associado a ribavirina; **PegI+R**, interferon peguilado associado a ribavirina; **NR**, não respondedor à terapia antiviral; **SR**, respondedor à terapia antiviral (^ateste t, ^bteste exato de Fisher).

Na **Tabela 2**, são descritas as características de todos os indivíduos separados por desfecho a terapia antiviral. As médias das idades observadas foram semelhantes entre os grupos NR e SR. Podemos observar também que os grupos são semelhantes com relação ao genótipo viral e a terapia antiviral utilizada, não sendo encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 2. Características epidemiológicas, clínicas e virológicas dos indivíduos participantes do estudo classificados por desfecho a terapia antiviral

Parâmetros	NR (n = 54)	SR (n = 54)	
Idade (anos)*	47 ± 11 [21 - 62]	44 ± 12 [23 - 68]	P=0,1552 ^a
Gênero			
Masculino	34 (63,0%)	24 (44,4%)	$\chi^2 = 3,724$, 1g.l; P = 0,0536
Feminino	20 (37,0%)	30 (55,6%)	
Genótipo Viral			
1	44 (81,5%)	36 (66,7%)	P=0,1234 ^b
Não 1	10 (18,5%)	17 (33,3%)	
Terapia			
I	3 (5,6%)	4 (7,4%)	$\chi^2 = 4,154$; 2g.l; P=0,0536
I+R	47 (87,0%)	39 (72,2%)	
PegI+R	4 (7,4%)	11 (20,4%)	

***Média±DP**; valores mínimo e máximo entre colchetes; **n**, número de indivíduos; **g.l.**, grau de liberdade; **I**, interferon convencional; **I+R**, interferon convencional associado a ribavirina; **PegI+R**, interferon-peguilado associado a ribavirina; **NR**, não respondedor à terapia antiviral; **SR**, respondedor à terapia antiviral (^ateste t; ^bteste exato de Fisher).

A **Tabela 3** apresenta os dados das determinações das transaminases hepáticas dos indivíduos participantes do estudo segundo o tipo de desfecho à terapia antiviral. Foram realizadas determinações antes do início e também ao final do período de tratamento. Não foram observadas importantes diferenças estatísticas entre as médias de ALT e AST antes do tratamento antiviral. Os pacientes com resposta virológica ao final da terapia (SR), apresentaram médias de GGT menores do que as do grupo NR

RESULTADOS

($P < 0,05$), indicando que menores valores de GGT antes da terapia possa ser um fator de bom prognóstico a terapia. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para todas as enzimas hepáticas avaliadas ao final do tratamento. As médias de ALT, AST e GGT foram menores no grupo SR do que no grupo NR ao final da terapia.

Tabela 3. Características das enzimas hepáticas dos indivíduos participantes do estudo

Parâmetros (U/L)*	NR (n = 54)	SR (n = 54)	P ^a
ALT _i	71,5 ± 40,5	75,9 ± 68,3	0,6100
ALT _f	54,1 ± 32,8	29,4 ± 27,7	<0,0001
AST _i	52,7 ± 28,9	54,4 ± 44,4	0,8228
AST _f	45,2 ± 29,3	30,1 ± 23,4	0,0038
GGT _i	97,8 ± 96,8	62,8 ± 71,0	0,0355
GGT _f	83,0 ± 62,9	46,1 ± 78,5	0,0086

*Média±DP; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama glutamil transpeptidase; n, número de indivíduos; NR, não respondedor à terapia antiviral; SR, respondedor à terapia antiviral; i, início da terapia antiviral; f, final da terapia antiviral (^a teste t).

4.2. Estudo dos polimorfismos da região promotora da IL10

As freqüências dos genótipos e alelos dos polimorfismos da região promotora da IL10 nos grupos de NR e SR estão descritas na **Tabela 4**.

A relação entre as freqüências gênicas e genotípicas (Equilíbrio de Hardy-Weinberg), avaliada pelo teste de qui-quadrado (**Quadro 4**), mostrou que para os três polimorfismos estudados, o número de genótipos observados em ambos os grupos, obedece à distribuição esperada para

RESULTADOS

uma população em condições de equilíbrio (Esse resultado indica que a amostragem analisada é representativa da população permitindo, de forma confiável, a comparação das freqüências gênicas entre os grupos avaliados).

Tabela 4. Freqüências de genótipos e alelos dos polimorfismos da região promotora da IL10 em indivíduos agrupados como NR e SR à terapia antiviral

Polimorfismo	Genótipos			Alelos	
	AA	GA	GG	A	G
-1082 (G>A)					
NR (n = 54)	28 (46,3%)	19 (40,7%)	7 (13,0%)	0,69	0,31
SR (n = 54)	17 (31,5%)	25 (46,3%)	12 (22,2%)	0,55	0,45
	$\chi^2 = 4,823$; 2g.l.; $P=0,0897$			$P=0,0352^a$	
-819 (C>T)	CC	CT	TT	C	T
NR (n = 54)	27 (50,0%)	21 (38,9%)	6 (11,1%)	0,69	0,31
SR (n = 54)	23 (42,6%)	29 (53,7%)	2 (3,7%)	0,69	0,31
	$\chi^2 = 3,600$; 2g.l.; $P=0,1653$			$P>0,05^a$	
-592 (C>A)	CC	CA	AA	C	A
NR (n = 54)	27 (50,0%)	21 (38,9%)	6 (11,1%)	0,69	0,31
SR (n = 54)	23 (42,6%)	29 (53,7%)	2 (3,7%)	0,69	0,31
	$\chi^2 = 3,600$; 2g.l.; $P=0,1653$			$P>0,05^a$	

n, número de indivíduos; g.l., grau de liberdade; NR, não respondedor à terapia antiviral; SR, respondedor à terapia antiviral (^ateste exato de Fisher).

Quadro 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Polimorfismo -1082(G>A):	$\chi^2 = 0,4645$; 2g.l.; $P=0,7927$
Polimorfismos -819(C>T) e -529 (C>A):	$\chi^2 = 0,3941$; 2g.l.; $P=0,8211$

g.l., grau de liberdade

As análises dos genótipos e alelos dos polimorfismos da região promotora da IL10 não mostraram diferenças estatisticamente significativas, exceto para o alelos A e G do polimorfismo -1082. A freqüência do Alelo A

RESULTADOS

deste polimorfismo foi maior entre os pacientes do grupo NR do que no grupo SR. Este alelo está associado a baixa expressão da IL10 e pode ser um fator de mau prognóstico à resposta terapêutica à associação de interferon e ribavirina.

Para confirmar a possível associação do polimorfismo -1082 (G>A) da IL10 foram realizadas novas análises. Na **Tabela 5**, estão descritas as médias das concentrações das transaminases hepáticas (antes do início e ao final da terapia), distribuídas segundo os genótipos desse polimorfismo para os indivíduos participantes do estudo. Os valores médios da ALT, AST e GGT, no início e ao final da terapia, foram semelhantes nos três genótipos ($P>0,05$).

Tabela 5. Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos participantes do estudo

Transaminases (U/L)*	Genótipos -1082 (G>A)			P^a
	AA (n=45)	GA (n=44)	GG (n=19)	
ALT _i	67,4 ± 31,1	80,0 ± 74,5	74,3 ± 54,3	0,5824
ALT _f	46,2 ± 34,6	38,3 ± 30,3	38,7 ± 33,7	0,4801
AST _i	52,1 ± 24,5	53,3 ± 45,3	57,6 ± 43,9	0,8675
AST _f	42,0 ± 34,0	34,9 ± 22,5	33,4 ± 19,5	0,3672
GGT _i	77,9 ± 73,4	88,4 ± 96,0	65,7 ± 91,8	0,6229
GGT _f	72,8 ± 72,2	54,2 ± 50,4	68,0 ± 112	0,4788

***Média±DP**; **ALT**, alanina aminotransferase; **AST**, aspartato aminotransferase; **GGT**, gama glutamil transpeptidase; **n**, número de indivíduos; **i**, início da terapia antiviral; **f**, final da terapia antiviral (^aANOVA).

RESULTADOS

Nas **Tabelas 6 e 7**, temos a comparação dos valores médios de transaminases hepáticas (antes e ao final da terapia) segundo o polimorfismo -1082 (G>A) nos pacientes segundo tipo de desfecho a terapia antiviral. Observamos que houve distribuição semelhante para essas enzimas em todos os genótipos estudados independente do paciente ser respondedor ou não.

Tabela 6. Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como não respondedores a terapia

Transaminases (U/L)*	Genótipos -1082 (G>A)			P ^a
	AA (n=28)	GA (n=18)	GG (n=7)	
ALT _i	69,1 ± 30,2	73,3 ± 55,8	75,9 ± 32,8	0,9051
ALT _f	54,3 ± 36,9	50,7 ± 27,9	62,7 ± 31,4	0,7167
AST _i	54,2 ± 25,8	50,4 ± 36,5	52,9 ± 20,0	0,9163
AST _f	46,9 ± 36,4	42,2 ± 21,5	46,9 ± 16,6	0,8598
GGT _i	90,6 ± 85,3	119 ± 126	70,9 ± 28,2	0,4638
GGT _f	89,0 ± 70,0	74,9 ± 56,9	81,4 ± 54,9	0,7624

*Média±DP; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama glutamil transpeptidase; n, número de indivíduos; i, início da terapia antiviral; f, final da terapia antiviral (^aANOVA).

Na **Tabela 8**, temos a comparação dos valores médios de transaminases hepáticas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) e desfecho a terapia antiviral. A análise dos resultados obtidos para o genótipo AA não mostrou diferenças importantes entre os valores médios das transaminases (antes e depois do período de terapia) entre os pacientes

RESULTADOS

respondedores e não respondedores. Para os genótipos GA e GG, os valores são semelhantes entre os dois grupos de pacientes quando analisamos as médias dessas enzimas hepáticas antes do período de tratamento. Para o genótipo GA, as médias de ALT e GGT ao final do tratamento foram estatisticamente diferentes entre os pacientes dos grupos NR e SR. Para o genótipo GG, foi observado o mesmo resultado para as médias de AST e AST ao final do tratamento. Estes resultados mostram uma possível associação do Alelo G, responsável por uma maior expressão de IL10, à melhora bioquímica observada nos pacientes que tiveram resposta à terapia combinada de interferon e ribavirina.

Tabela 7. Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como respondedores a terapia

Transaminases (U/L)*	Genótipos -1082 (G>A)			P ^a
	AA (n=17)	GA (n=25)	GG (n=12)	
ALT _i	64,5 ± 33,2	84,8 ± 86,2	73,4 ± 65,1	0,6433
ALT _f	33,5 ± 27,1	28,8 ± 29,1	24,8 ± 27,2	0,7077
AST _i	48,8 ± 22,6	55,3 ± 51,4	60,3 ± 54,0	0,7864
AST _f	34,3 ± 29,2	29,4 ± 22,0	25,5 ± 16,9	0,6050
GGT _i	57,8 ± 44,3	66,2 ± 60,7	62,7 ± 116	0,9344
GGT _f	47,1 ± 70,1	38,4 ± 39,0	60,8 ± 137	0,7259

*Média±DP; ALT, alanina aminotransferase; AST, aspartato aminotransferase; GGT, gama glutamil transpeptidase; n, número de indivíduos; i, início da terapia antiviral; f, final da terapia antiviral (^aANOVA).

RESULTADOS

Tabela 8. Comparação dos valores médios das enzimas hepáticas classificadas segundo os genótipos do polimorfismo -1082 (G>A) da região promotora da IL10 em indivíduos classificados como não respondedores (NR) e respondedores (SR) a terapia

Genótipo -1082	Transaminases (U/L)*	NR (n = 54)	SR (n = 54)	P ^a
AA	ALT _i	69,1 ± 30,2	64,5 ± 33,2	0,6368
	ALT _f	54,3 ± 36,9	33,5 ± 27,5	0,0514
	AST _i	54,2 ± 25,8	48,8 ± 22,6	0,4809
	AST _f	46,9 ± 36,4	34,3 ± 29,2	0,2343
	GGT _i	90,6 ± 85,3	54,8 ± 44,3	0,1520
	GGT _f	89,0 ± 70,0	47,0 ± 70,1	0,0598
GA	ALT _i	73,3 ± 55,8	84,8 ± 86,2	0,6237
	ALT_f	50,7 ± 27,9	28,8 ± 29,1	0,0161
	AST _i	50,4 ± 36,5	55,3 ± 51,4	0,7345
	AST _f	42,2 ± 21,5	29,4 ± 22,0	0,0604
	GGT _i	119 ± 126	66,2 ± 60,7	0,0736
	GGT_f	74,9 ± 56,9	38,4 ± 39,0	0,0153
GG	ALT _i	75,9 ± 32,8	73,4 ± 65,1	0,9279
	ALT_f	62,7 ± 31,4	24,8 ± 27,2	0,0129
	AST _i	52,9 ± 20,0	60,3 ± 54,0	0,7314
	AST_f	46,9 ± 16,6	25,5 ± 16,9	0,0160
	GGT _i	70,9 ± 28,2	62,7 ± 116	0,8574
	GGT _f	81,4 ± 54,9	60,8 ± 137	0,7103

***Média±DP**; **ALT**, alanina aminotransferase; **AST**, aspartato aminotransferase; **GGT**, gama glutamil transpeptidase; **NR**, não respondedor à terapia antiviral; **SR**, respondedor à terapia antiviral; **n**, número de indivíduos; **i**, início da terapia antiviral; **f**, final da terapia antiviral (^a teste *t*).

5. DISCUSSÃO

Embora o tratamento da infecção crônica causada pelo VHC tenha melhorado de forma significativa na última década, somente de 38 a 63% dos pacientes alcançam resposta virológica sustentada (*Hadziyannis et al., 2004; Hofmann et al., 2005; Manns et al., 2006*).

A resistência ao tratamento padrão atual, uma combinação de interferon convencional ou peguilado e ribavirina, tem sido atribuída a vários fatores virais e a fatores inerentes ao hospedeiro.

A resistência à terapia é associada com a habilidade das proteínas do VHC em modular a resposta imunológica através de diferentes mecanismos, incluindo alteração na produção da citocina antiinflamatória IL10 (*Mangia et al., 2004, Aborsangaya et al., 2007*). A expressão de IL10 está associada a presença de polimorfismos no promotor do gene da IL10 (*Aborsangaya et al., 2007; Edwards-Smith et al., 1999; Kurreeman et al., 2004*).

Neste estudo, analisamos a possível influência dos polimorfismos na região promotora do gene da citocina IL10 na resposta à terapia antiviral para o VHC. Em nossos pacientes, em concordância com os resultados de Edward-Smith et al. (1999), não observamos influência dos genótipos dos polimorfismos -1082 (G>A), -819 (C>T) e -592 (C>A) na resposta terapêutica. Entretanto, a presença do alelo A do polimorfismo -1082, associado a uma menor expressão de IL10, pode ser associado com o desfecho desfavorável à terapia, ou seja, menores níveis de IL10 pode ser

um fator de mau prognóstico ao tratamento com IFN.

Vários estudos têm associado a resistência à terapia com IFN com os níveis de expressão de IL10. Altos níveis de IL10 no plasma antes do tratamento têm sido descritos como fatores preditivos de uma resposta sustentada à terapia antiviral para a infecção crônica do VHC (*Amaraa et al., 2002; Edwards-Smith et al., 1999; Vidigal et al., 2002; Yee et al., 2001*).

A associação de alelos e genótipos relacionados à alta expressão de IL10 com melhora bioquímica e virológica foi encontrada também nos trabalhos de Lio et al. (2003) e Persico et al. (2006).

O provável mecanismo dessa resistência é a ativação da expressão de proteínas regulatórias. Os supressores da sinalização de citocinas (SOCS) são uma família de proteínas que regulam negativamente a ação de citocinas quanto sua magnitude e duração (*Krebs e Hilton, 2001; Star e Hilton, 1999*). A família SOCS é composta de oito proteínas (SOCS1 a SOCS7 e CIS) que são induzidas em resposta à estimulação de uma variedade de citocinas. A superexpressão de SOCS também está associada a deficiência na sinalização de citocinas (*Krebs e Hilton, 2001*).

O mecanismo da resistência associada à ação da IL-10 é decorrente da indução de SOCS2, SOCS3 e CIS (*Cassatella et al., 1999; Ding et al., 2003; Shen et al., 2000*). Através da ligação aos resíduos de tirosinas fosforilados do receptor de IFN, as proteínas SOCS inibem a fosforilação das STATs e dessa forma bloqueiam a transdução do sinal do IFN- α , atenuando a formação das proteínas antivirais PKR, 2'5'-OAS e Mx (*Ichikawa et al., 2002; Ito et al., 1999; Krebs e Hilton, 2001; Shen et al., 2000; Starr e Hilton,*

1999).

Outro possível e importante mecanismo de atuação da IL10 na infecção pelo VHC é através do controle do equilíbrio Th1/Th2. Ambas as respostas T CD4+ e CD8+ aos antígenos do VHC têm importante papel na resolução da infecção (*Rigopoulou et al., 2005*).

O desenvolvimento de uma forte resposta T-helper (Th1), dirigida aos antígenos estruturais e não estruturais do VHC durante os estágios iniciais da infecção aguda, resulta em uma eliminação viral e resolução da infecção (*Mizukoshi e Rehermann, 2001; Neumann-Haefelin et al., 2005*). Similarmente, a expansão de células T CD8+ vírus específica durante o período de infecção aguda pelo VHC é associado com a eliminação viral (*Rigopoulou et al., 2005*).

O equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 é um dos mecanismos críticos para o controle da resposta imune efetora nas doenças infecciosas. Análises do perfil de citocinas em células mononucleares do sangue periférico revelaram que o *clearance* viral ocorre normalmente quando há predomínio de células com perfil Th1 CD4+ (com produção de IL2 e IFN- γ), enquanto pacientes com perfil Th2 (com produção predominante de IL4 e IL10) desenvolvem infecção crônica persistente pelo VHC (*Mizukoshi e Rehermann, 2001; Neumann-Haefelin et al., 2005; Rigopoulou et al., 2005*).

Estudos recentes têm mostrado que pacientes cronicamente infectados pelo VHC possuem perfil alterado de citocinas relacionadas aos epítomos para células T, com prevalência de células produtoras de IL10 e redução de células associadas à produção de IFN- γ (*Rigopoulou et al.,*

2005).

No equilíbrio Th1/Th2, a IL10 pode ter um papel importante na ativação de células apresentadoras de antígenos (APC) e na diferenciação de células T (*Blackburn e Wherry, 2007*). Altos níveis de IL10 podem ser favoráveis ao desenvolvimento de uma resposta imunológica de perfil Th2, não efetiva ao VHC e contribuir para a persistência da infecção e sucesso à terapia com IFN (*Lio et al., 2003; Mangia et al., 2004*).

De forma contrária ao observado na literatura, nossos resultados sugerem que altos níveis de IL10 pode ser um fator de bom prognóstico na terapia com IFN. O alelo A do polimorfismo -1082 (G>A), associado a menor expressão de IL10, foi mais freqüente no grupo de pacientes não respondedores à terapia antiviral. Isto pode ser explicado pelo papel da IL10 na função de células *natural killers* (NK).

A IL10 é um potente estimulador de células NK, uma função que pode contribuir para o clareamento viral e facilitar a aquisição de antígenos virais para células APC através das células mortas, fornecendo uma importante ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa (*Belardelli e Ferrantini, 2002; Mocellin et al., 2003*). Ativação de células NK pela IL10 atua nesta ligação por causa do recrutamento de monócitos e macrófagos induzidos por esta citocina (através da indução de quimiocina-4 e de receptores *scavenger* CD16 e CD64Fc γ , respectivamente) e é responsável pela citotoxicidade celular anticorpo-dependente e pela fagocitose de partículas opsonizadas (*Moore et al., 2001*). Esta fase de obtenção de antígenos da resposta inata tem três principais conseqüências: (a) possível clareamento viral; (b)

aumento na variabilidade de antígenos e (c) sinalização através de mecanismo dano celular dependente (apoptose e/ou necrose) para a ativação de APC (*Mocellin et al., 2003*).

Em resumo, nossos achados demonstraram o possível papel dos polimorfismos da região promotora do gene da IL10 na resposta à terapia antiviral em pacientes com infecção crônica pelo VHC. Entretanto, a resposta à terapia atual é basicamente dependente da atuação do sistema imunológico e este é geneticamente controlado por diversos genes independentes que atuam de forma coordenada. Alterações genéticas são encontradas na maioria desses genes e novos estudos ainda são necessários para a compreensão do papel de outros polimorfismos no clareamento viral e na resposta à terapia antiviral na infecção pelo VHC.

6. CONCLUSÕES

- 6.1. Na população de estudo foi observado para o polimorfismo -1082 da IL10 as seguintes freqüências: AA 46,3%, GA 40,7% e GG 13,0% para os pacientes não respondedores; e AA 31,5%, GA 46,3% e GG 22,2% para os pacientes respondedores a terapia.
- 6.2. Para o polimorfismo -592 (C>A) foram observadas as seguintes freqüências: CC 50,0%, CA 38,9% e AA 11,1% para os pacientes não respondedores; e CC 42,6%, CA 53,7% e AA 3,7% para os pacientes respondedores a terapia.
- 6.3. Não foi observada associação entre os genótipos dos polimorfismos da região promotora da IL10 e a resposta à terapia antiviral.
- 6.4. Os resultados do nosso estudo sugerem que a presença do alelo A do polimorfismo -1082 (G>A) pode estar associado com uma resposta desfavorável ao tratamento com interferon e ribavirina.
-

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1

CONSENTIMENTO INFORMADO E PÓS-INFORMAÇÃO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
 Documento de Identidade Nº :.....Sexo: ()M ()F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....
 CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....
 Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
 Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F
 Data de Nascimento:...../...../.....
 Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
 Bairro:.....Cidade:.....
 CEP:.....Telefone:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

Título do Protocolo de Pesquisa: **Influência dos polimorfismos no promotor do gene das interleucina-10 na resposta a antivirais em pacientes com hepatite C crônica**

Pesquisador: **Carlos Eduardo de Melo**

Cargo/Função: **Pós-graduando**

Inscrição Conselho Regional Nº: **CRF-SP 28981**

Unidade do HCFMUSP: **LIM47 – Laboratório de Hepatites**

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco (X) Risco Mínimo () Risco Médio () Risco Baixo () Risco Maior ()

Esta pesquisa não provoca nenhum tipo de risco ao voluntário.

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento.)

Duração da Pesquisa: Esta pesquisa tem a duração prevista de **dois anos** a partir do início em agosto de 2004.

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

A hepatite C é uma doença do fígado adquirida pelo contato com sangue ou outros fluidos corporais infectados e é causada pelo vírus HCV. O tratamento atual é feito com o uso de interferon alfa em combinação com ribavirina. Infelizmente, o tratamento não apresenta a eficácia desejada em razão de fatores relacionados ao genótipo viral e a fatores genéticos do paciente. Este estudo tem por objetivo verificar a influência dos fatores genéticos do paciente no tratamento da hepatite C crônica. Para isso vamos analisar o DNA das células do sangue, de forma a identificar alterações na composição genética do paciente e verificar se esta alteração tem alguma influência sobre o tratamento.

2. Procedimentos

Neste estudo para análise dos fatores genéticos serão realizados uma entrevista, um exame físico e a coleta de amostras de sangue para testes laboratoriais. A entrevista será realizada pelo pesquisador responsável. O exame físico será realizado por médicos hepatologistas das HCFMUSP. A coleta das amostras será realizada por enfermeiras do Ambulatório de Hepatites do HCFMUSP. Todos os procedimentos descritos acima serão realizados no Ambulatório de Hepatites do HCFMUSP.

Serão realizadas 5 coletas de sangue de 20 mL durante a pesquisa. As coletas de sangue serão realizadas nos períodos pré-tratamento e a cada final de mês até o final do tratamento. Estas amostras serão utilizadas para a extração do DNA total para as análises moleculares posteriores e para a determinação dos parâmetros bioquímicos.

3. Desconfortos e riscos esperados

A realização deste estudo não causará nenhum tipo de risco ao paciente. O único desconforto causado é o procedimento de coleta das amostras e é o mesmo de qualquer procedimento de coleta, como dor no local ou inchaço.

4. Benefícios aos participantes

Você estará ajudando a entender melhor a influência das características genéticas no tratamento da Hepatite C crônica. Além disso, você receberá os resultados dos testes de laboratório sem qualquer custo.

Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Colaborando com este estudo você não terá nenhuma vantagem a mais. Pois será atendido normalmente no Ambulatório de Hepatites ou em qualquer outro setor do Hospital das Clínicas.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Garantia de informação

Você tem acesso, a qualquer tempo, às informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

2. Participação voluntária e desistência

Você tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

3. Confidencialidade dos dados

Você tem garantido a salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos a saúde, decorrentes da pesquisa.

5. Você não pagará por qualquer medicação administrada ou testes de laboratório relacionados com a investigação. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação.

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS
PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE
INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Em caso de necessidade de esclarecimentos ou dúvidas sobre a pesquisa procurar:

Dr.....

Endereço:.....

Telefone:..... Horário:.....

Pesquisador.....

Endereço:.....

Telefone:.....

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo,dede

.....
 Assinatura do sujeito de pesquisa
 ou responsável legal

.....
 Assinatura do pesquisador
 (carimbo ou nome legível)

*Uma cópia do formulário de Consentimento Informado será fornecida para
você pelo médico do estudo.*

ANEXOS

7.2. Anexo 2: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes não-respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo.

ID	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Genótipo Viral	Medicação	IL-10 -1082	IL-10 -819	IL-10 -592	ALTi	ALTf	ASTi	ASTf	GGTi	GGTf	PCR VHCi	PCR VHCf
1	MAFF	F	45	B	1	pegI+R	AA	TT	AA	77	9	70	19	47	23	Detectado	Detectado
2	MJGM	F	45	B	1a	I+R	AA	CC	CC	70	30	58	25	50	102	Detectado	Detectado
3	PWC	M	45	B	1b	I+R	GG	CC	CC	79	72	70	57	123	186	Detectado	Detectado
4	MCF	F	25	M	1	I+R	AA	TT	AA	57	20	35	17	93	183	Detectado	Detectado
5	GWS	M	36	M	1	I+R	AA	TT	AA	29	37	20	27	38	63	Detectado	Detectado
6	AM	F	57	M	1b	I+R	GA	TC	AC	20	28	27	37	31	43	Detectado	Detectado
7	JLSB	M	62	B	1b	I+R	AA	TC	AC	55	34	38	25	62	42	Detectado	Detectado
8	MVO	M	26	B	1b	I+R	GA	TC	AC	82	56	45	42	87	61	Detectado	Detectado
9	JLS	M	40	B	1	I+R	GA	CC	CC	157	43	63	27	54	60	Detectado	Detectado
10	OO	M	60	B	1a	I+R	GA	CC	CC	58	69	34	52	143	101	Detectado	Detectado
11	JNR	M	48	B	1a	I+R	AA	CC	CC	99	190	101	193	131	171	Detectado	Detectado
12	WSL	M	44	B	2b	I+R	GA	CC	CC	40	16	32	21	19	16	Detectado	Detectado
13	JPS	M	44	B	3a	I+R	AA	TC	AC	25	56	21	36	16	20	Detectado	Detectado
14	TMJC	F	58	B	1b	pegI+R	GG	CC	CC	50	38	39	41	79	98	Detectado	Detectado
15	LPO	F	30	B	1a	I+R	AA	CC	CC	58	40	66	41	128	66	Detectado	Detectado
16	CAS	M	49	B	1a	I+R	GG	CC	CC	43	106	47	43	82	35	Detectado	Detectado
17	GCRF	M	32	M	1b	I+R	AA	TC	AC	84	63	38	39	47	38	Detectado	Detectado
18	AJS	M	53	B	1b	I+R	GA	TC	AC	57	45	44	108	36	29	Detectado	Detectado
19	MCS	F	21	B	1a/1b	I+R	GA	CC	CC	-	19	-	33	-	19	Detectado	Detectado
20	APF	M	49	B	3a	I	AA	CC	CC	-	-	-	-	-	-	Detectado	Detectado
21	RCS	M	28	B	2b	I+R	AA	TC	AC	88	66	57	41	103	77	Detectado	Detectado
22	ELP	M	53	B	1b	I+R	AA	CC	CC	131	87	122	108	77	53	Detectado	Detectado
23	EEP	M	54	B	3a	I+R	GG	CC	CC	106	53	63	55	50	54	Detectado	Detectado
24	OFMS	M	47	M	1a	I+R	GA	TC	AC	161	89	130	57	462	143	Detectado	Detectado
25	MG	M	61	B	1b	pegI+R	GA	CC	CC	100	82	73	74	256	228	Detectado	Detectado
26	ACE	M	59	B	1a	I+R	GG	CC	CC	115	53	82	41	70	81	Detectado	Detectado
27	JIS	M	60	B	1b	I	GG	CC	CC	102	98	46	72	56	96	Detectado	Detectado

ID (identificação); **Sexo** (F, feminino; M, masculino); **Idade** (anos); **Raça** (A, amarelo; B, caucasiano; M, mulato; N, negro); **Medicação** (I, interferon; I+R, interferon convencional associado a ribavirina; pegI+R, interferon peguilado associado a ribavirina); **ALT** (alanina aminotransferase, U/L); **AST** (aspartato aminotransferase, U/L); **GGT** (gama glutamil transferase, U/L); **PCR VHC** (PCR qualitativo para o VHC); **i** (início terapia antiviral); **f** (final terapia antiviral).

ANEXOS

7.2. Anexo 2: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes não-respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo (Continuação).

ID	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Genótipo Viral	Medicação	IL-10 - 1082	IL-10 -819	IL-10 -592	ALT _i	ALT _f	AST _i	AST _f	GGT _i	GGT _f	PCR VHC _i	PCR VHC _f
28	NMC	F	61	B	1b	I+R	AA	CC	CC	63	52	75	60	95	109	Detectado	Detectado
29	VLV	F	50	B	3a	I+R	GA	CC	CC	222	142	137	81	90	55	Detectado	Detectado
30	RPA	F	58	B	1b	I+R	GA	TC	AC	61	69	44	49	65	65	Detectado	Detectado
31	JMQ	M	50	B	1b	I+R	GA	TT	AA	58	52	24	23	25	28	Detectado	Detectado
32	AASF	M	52	M	1a/1b	I+R	AA	CC	CC	88	71	53	49	39	66	Detectado	Detectado
33	AEO	F	39	B	1b	I+R	GG	TC	AC	36	19	23	19	36	20	Detectado	Detectado
34	RLC	M	47	B	1b	I+R	GA	CC	CC	28	40	23	26	79	80	Detectado	Detectado
35	MP	M	57	B	1b	I+R	AA	TC	AC	84	16	86	24	96	25	Detectado	Detectado
36	ZPN	F	59	B	1b	I	GA	TC	AC	20	27	13	30	21	23	Detectado	Detectado
37	SCS	M	59	B	1b	I+R	AA	CC	CC	77	26	66	34	48	80	Detectado	Detectado
38	MAOM	M	57	B	1	I+R	GA	TC	AC	57	51	48	50	131	195	Detectado	Detectado
39	SJS	M	43	B	3a	I+R	AA	CC	CC	49	61	28	28	84	166	Detectado	Detectado
40	PROBB	M	48	B	1b	I+R	GA	TC	AC	29	66	24	44	26	50	Detectado	Detectado
41	CTC	F	42	B	1b	I+R	GA	TT	AA	27	36	19	22	13	16	Detectado	Detectado
42	SMT	F	50	B	3a	I+R	AA	TC	AC	49	32	40	28	48	37	Detectado	Detectado
43	ER	M	29	B	1b	I+R	GA	TC	AC	28	46	16	32	66	79	Detectado	Detectado
44	RCAFC	F	31	B	1a	I+R	GA	CC	CC	40	28	41	31	76	67	Detectado	Detectado
45	MICC	F	50	B	1b	I+R	AA	TC	AC	38	25	34	22	23	16	Detectado	Detectado
46	RDN	F	59	B	1b	I+R	AA	CC	CC	46	28	41	41	47	54	Detectado	Detectado
47	LCF	M	54	B	1b	I+R	AA	TC	AC	102	68	50	33	73	66	Detectado	Detectado
48	LMF	F	57	B	3a	I+R	AA	TC	AC	69	103	51	76	401	284	Detectado	Detectado
49	FG	F	60	B	3a	I+R	AA	CC	CC	143	83	84	74	242	181	Detectado	Detectado
50	DML	M	45	B	1a	I+R	GA	TC	AC	94	41	73	33	390	225	Detectado	Detectado
51	EMR	M	37	M	1a	I+R	AA	TC	AC	35	36	26	26	108	121	Detectado	Detectado
52	MPS	M	31	B	1b	pegI+R	GA	TT	AA	102	51	93	42	253	58	Detectado	Detectado
53	MLLO	F	55	B	1a	I+R	AA	CC	CC	82	68	74	62	48	66	Detectado	Detectado
54	JSSF	M	49	B	1b	I+R	GA	CC	CC	47	31	34	27	124	77	Detectado	Detectado

ID (identificação); **Sexo** (F, feminino; M, masculino); **Idade** (anos); **Raça** (A, amarelo; B, caucasiano; M, mulato; N, negro); **Medicação** (I, interferon; I+R, interferon convencional associado a ribavirina; pegI+R, interferon peguilado associado a ribavirina); **ALT** (alanina aminotransferase, U/L); **AST** (aspartato aminotransferase, U/L); **GGT** (gama glutamil transferase, U/L); **PCR VHC** (PCR qualitativo para o VHC); **i** (início terapia antiviral); **f** (final terapia antiviral).

ANEXOS

7.3. Anexo 3: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo.

ID	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Genótipo Viral	Medicação	IL-10 - 1082	IL-10 -819	IL-10 -592	ALTi	ALTf	ASTi	ASTf	GGTi	GGTf	PCR VHCi	PCR VHCf
1	TACF	F	39	B	1	I+R	GA	TC	AC	29	17	22	17	89	34	Detectado	Não Detectado
2	MB	F	25	B	1	I+R	GG	CC	CC	43	12	73	18	18	11	Detectado	Não Detectado
3	ACP	M	51	B	2	I+R	GG	CC	CC	20	19	28	23	40	37	Detectado	Não Detectado
4	RM	M	55	B	2	I+R	GG	CC	CC	30	15	31	26	20	15	Detectado	Não Detectado
5	MRN	F	47	B	5a	I+R	GG	CC	CC	57	17	31	21	30	26	Detectado	Não Detectado
6	SMCC	F	50	B	1a	I+R	GA	CC	CC	28	28	27	39	11	8	Detectado	Não Detectado
7	ALC	M	24	M	1b	I+R	AA	TC	AC	75	20	45	25	38	25	Detectado	Não Detectado
8	DAO	M	38	B	1b	I+R	AA	TC	AC	16	27	27	22	23	29	Detectado	Não Detectado
9	RSM	F	68	B	1b	I+R	AA	TC	AC	76	36	46	29	35	27	Detectado	Não Detectado
10	AC	M	38	B	3a	I+R	GA	TC	AC	86	25	60	25	30	14	Detectado	Não Detectado
11	LASS	F	47	B	1a	I+R	GG	CC	CC	113	16	66	21	28	12	Detectado	Não Detectado
12	SRT	F	58	B	1a	pegI+R	AA	TT	AA	120	128	89	132	126	307	Detectado	Não Detectado
13	MR	F	37	B	1b	I+R	AA	TC	AC	43	27	39	21	43	26	Detectado	Não Detectado
14	CROB	F	30	B	1b	I+R	GG	CC	CC	42	23	25	22	21	20	Detectado	Não Detectado
15	JASS	M	41	B	1b	pegI+R	GA	TC	AC	278	58	87	61	150	55	Detectado	Não Detectado
16	RML	M	49	B	3a	I+R	GA	TC	AC	113	16	108	24	113	41	Detectado	Não Detectado
17	MRC	F	25	B	3a	I+R	AA	TC	AC	60	15	47	19	17	10	Detectado	Não Detectado
18	ISK	F	63	B	1b	I+R	GA	TC	AC	108	15	108	18	65	14	Detectado	Não Detectado
19	VFS	M	44	M	1	I+R	GA	TC	AC	36	14	22	25	23	11	Detectado	Não Detectado
20	ECP	F	26	B	1b	pegI+R	GA	CC	CC	55	19	46	29	24	19	Detectado	Não Detectado
21	EPZ	M	42	B	1a/1b	I+R	GG	CC	CC	129	51	138	71	423	494	Detectado	Não Detectado
22	RFM	M	24	B	1b	pegI+R	GA	TC	AC	62	36	28	27	75	87	Detectado	Não Detectado
23	MAP	F	46	B	1b	I+R	AA	TC	AC	39	52	63	82	147	23	Detectado	Não Detectado
24	DHA	F	60	B	1a	I+R	GA	CC	CC	113	98	96	103	143	187	Detectado	Não Detectado
25	MG	F	58	B	1b	pegI+R	GA	TC	AC	26	14	26	20	22	16	Detectado	Não Detectado
26	JEMJ	M	23	B	3a	I+R	GA	TC	AC	149	22	52	20	232	64	Detectado	Não Detectado
27	MGR	F	52	M	2a/2c	I+R	GG	TC	AC	10	10	18	19	10	15	Detectado	Não Detectado

ID (identificação); **Sexo** (F, feminino; M, masculino); **Idade** (anos); **Raça** (A, amarelo; B, caucasiano; M, mulato; N, negro); **Medicação** (I, interferon; I+R, interferon convencional associado a ribavirina; pegI+R, interferon peguilado associado a ribavirina); **ALT** (alanina aminotransferase, U/L); **AST** (aspartato aminotransferase, U/L); **GGT** (gama glutamil transferase, U/L); **PCR VHC** (PCR qualitativo para o VHC); **i** (início terapia antiviral); **f** (final terapia antiviral).

ANEXOS

7.3. Anexo C: Dados biodemográficos, bioquímicos, virológicos, clínicos e genéticos dos pacientes respondedores a terapia antiviral dos indivíduos participantes do estudo (Continuação).

ID	Iniciais	Sexo	Idade	Raça	Genótipo Viral	Medicação	IL-10 - 1082	IL-10 -819	IL-10 -592	ALTi	ALTf	ASTi	ASTf	GGTi	GGTf	PCR VHCi	PCR VHCf
28	EI	M	53	B	2b	I+R	GA	CC	CC	98	20	61	25	36	22	Detectado	Não Detectado
29	FSS	F	49	B	1a	I+R	GA	CC	CC	40	14	32	17	32	17	Detectado	Não Detectado
30	ASM	F	30	B	1b	I+R	GA	CC	CC	25	10	25	18	13	13	Detectado	Não Detectado
31	RCSN	F	28	B	1b	I+R	GA	TC	AC	23	31	19	21	46	40	Detectado	Não Detectado
32	DMF	F	45	B	1b	I+R	GA	CC	CC	27	27	23	21	54	74	Detectado	Não Detectado
33	HTL	F	44	A	1b	I+R	AA	TC	AC	26	36	21	24	23	17	Detectado	Não Detectado
34	NNM	F	42	A	3a	I	AA	TC	AC	37	26	29	24	12	11	Detectado	Não Detectado
35	EPF	F	50	B	3a	I	GA	CC	CC	20	19	22	22	14	15	Detectado	Não Detectado
36	AAM	M	52	M	3a	pegI+R	GA	CC	CC	85	19	38	29	24	16	Detectado	Não Detectado
37	KI	F	29	B	1a	I+R	GG	TC	AC	58	15	34	17	9	12	Detectado	Não Detectado
38	AQN	F	59	B	3a	I+R	GG	TC	AC	204	10	186	17	54	10	Detectado	Não Detectado
39	FJSP	M	45	B	1a	I+R	GA	CC	CC	33	16	28	18	29	18	Detectado	Não Detectado
40	JO	M	24	N	1	I+R	AA	CC	CC	24	20	16	19	41	28	Detectado	Não Detectado
41	JRPS	M	52	B	3a	I+R	AA	TT	AA	114	31	53	28	64	34	Detectado	Não Detectado
42	VDM	M	37	M	3a	I+R	AA	TC	AC	76	53	50	32	76	79	Detectado	Não Detectado
43	MASD	F	45	B	1b	I+R	GA	TC	AC	11	13	15	16	12	13	Detectado	Não Detectado
44	NF	M	37	B	1	I	GA	TC	AC	19	17	16	12	10	28	Detectado	Não Detectado
45	PRP	M	49	B	1	I+R	AA	CC	CC	96	33	76	36	144	79	Detectado	Não Detectado
46	CBF	F	57	B	1b	pegI+R	AA	TC	AC	52	18	35	21	63	51	Detectado	Não Detectado
47	LFC	F	47	B	1	pegI+R	AA	TC	AC	58	14	39	17	17	9	Detectado	Não Detectado
48	AB	M	53	B	1b	pegI+R	AA	TC	AC	121	17	98	24	86	22	Detectado	Não Detectado
49	JLB	M	53	B	3a	pegI+R	GG	TC	AC	169	103	87	45	85	61	Detectado	Não Detectado
50	LCS	M	59	B	1b	I+R	GA	CC	CC	352	138	253	87	132	87	Detectado	Não Detectado
51	JCGS	M	47	B	1a	I+R	GA	CC	CC	227	16	101	17	178	27	Detectado	Não Detectado
52	RB	F	51	B	3a	pegI+R	AA	CC	CC	64	16	56	28	28	23	Detectado	Não Detectado
53	TCBS	F	36	B	1	I	GG	CC	CC	6	6	7	6	14	16	Detectado	Não Detectado
54	ACB	M	59	B	1b	I+R	GA	TC	AC	76	19	67	24	98	40	Detectado	Não Detectado

ID (identificação); **Sexo** (F, feminino; M, masculino); **Idade** (anos); **Raça** (A, amarelo; B, caucasiano; M, mulato; N, negro); **Medicação** (I, interferon; I+R, interferon convencional associado a ribavirina; pegI+R, interferon peguilado associado a ribavirina); **ALT** (alanina aminotransferase, U/L); **AST** (aspartato aminotransferase, U/L); **GGT** (gama glutamil transferase, U/L); **PCR VHC** (PCR qualitativo para o VHC); **i** (início terapia antiviral); **f** (final terapia antiviral)

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aborsangaya KB, Dembinski I, Khatkar S, Alphonse MP, Nickerson P, Rempel JD. Impact of aboriginal ethnicity on HCV core-induced IL-10 synthesis: interaction with IL-10 gene polymorphisms. **Hepatology**. 2007;45(3):623-30.

Aguilar-Reina J, Ruiz-Ferrer M, Pizarro MA, Antinolo G. The -670A > G polymorphism in the promoter region of the FAS gene is associated with necrosis in periportal areas in patients with chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**. 2005;12(6):568-73.

Albuquerque AG, Moraes M, Vanderborght PR, Romero M, Santos AR, Moraes MO, Moraes JR. Tumor necrosis factor and interleukin-10 gene promoter polymorphisms in Brazilian population and in Terena Indians. **Transplant Proc**. 2004;36(4):825-6.

Almarri A, El Dwick N, Al Kabi S, Sleem K, Rashed A, Ritter MA, Batchelor JR. Interferon-alpha therapy in HCV hepatitis: HLA phenotype and cirrhosis are independent predictors of clinical outcome. **Hum Immunol**. 1998;59(4):239-42.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amaraa R, Mareckova H, Urbanek P, Fucikova T. Production of interleukins 10 and 12 by activated peripheral blood monocytes/macrophages in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection with respect to the response to interferon and ribavirin treatment. **Immunol Lett.** 2002;83(3):209-14.

Asselah T, Bieche I, Paradis V, Bedossa P, Vidaud M, Marcellin P. Genetics, genomics, and proteomics: implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. **Semin Liver Dis.** 2007;27(1):13-27.

Baron S, Dianzani F. The interferons: a biological system with therapeutic potential in viral infections. **Antiviral Res.** 1994;24(2-3):97-110.

Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. **J Med Virol.** 2003;71(2):212-8.

Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. **Trends Immunol.** 2002;23(4):201-8.

Blackburn SD, Wherry EJ. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. **Trends Microbiol.** 2007;15(4):143-6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Branch AD, Stump DD, Gutierrez JA, Eng F, Walewski JL. The hepatitis C virus alternate reading frame (ARF) and its family of novel products: the alternate reading frame protein/F-protein, the double-frameshift protein, and others. **Semin Liver Dis.** 2005;25(1):105-17.

Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV): 2006 Update. **Int J Med Sci.** 2006;3(2):29-34.

Brightbill HD, Plevy SE, Modlin RL, Smale ST. A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. **J Immunol.** 2000;164(4):1940-51.

Brown RS Jr. Customizing treatment to patient populations. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.** 2007;4 Suppl 1:S3-9.

Burgner D, Jamieson SE, Blackwell JM. Genetic susceptibility to infectious diseases: big is beautiful, but will bigger be even better? **Lancet Infect Dis.** 2006;6(10):653-63.

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** 2005;38(1):41-9.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cassatella MA, Gaperini S, Bovolenta C, Calvzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A. Interleukin-10 selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. **Blood** 1999;94(8): 2880-2889.

Cavalheiro NP, Barone AA, Tengan FM. HCV serotypes in Brazilian patients. **Int J Infect Dis.** 2002;6(3):228-32.

Cavalheiro NP. *Hepatite C: transmissão entre casais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.

Cavalletto L, Chemello L, Donada C, Casarin P, Belussi F, Bernardinello E, Marino F, Pontisso P, Gatta A, Alberti A. The pattern of response to interferon alpha (alpha-IFN) predicts sustained response to a 6-month alpha-IFN and ribavirin retreatment for chronic hepatitis C. TVVH Study Group. **J Hepatol.** 2000;33(1):128-34.

Clementi M, Di Gianantonio E. Genetic susceptibility to infectious diseases. **Reprod Toxicol.** 2006;21(4):345-9.

Dai CY, Chuang WL, Chang WY, Chen SC, Lee LP, Hsieh MY, Hou NJ, Lin ZY, Hsieh MY, Wang LY, Yu ML. Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

dose interferon-alpha and ribavirin. **Antiviral Res.** 2005;67(2):93-7.

Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY, Hsieh MY, Hsieh MY, Wang LY, Chang WY, Yu ML. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. **J Viral Hepat.** 2006;13(11):770-4.

Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, Clinckspoor F, Leroux-Roels G. Comparison of qualitative (COBAS AMPLICOR HCV 2.0 versus VERSANT HCV RNA) and quantitative (COBAS AMPLICOR HCV monitor 2.0 versus VERSANT HCV RNA 3.0) assays for hepatitis C virus (HCV) RNA detection and quantification: impact on diagnosis and treatment of HCV infections. **J Clin Microbiol.** 2005;43(6):2590-7.

Di Marco V, Almasio P, Vaccaro A, Ferraro D, Parisi P, Cataldo MG, Di Stefano R, Craxi A. Combined treatment of relapse of chronic hepatitis C with high-dose alpha2b interferon plus ribavirin for 6 or 12 months. **J Hepatol.** 2000;33(3):456-62.

Ding Y, Chen D, Tarcsafalvi A, Su R, Qin L, Bromberg JS. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. **J Immunol.** 2003;170(3):1383-91.

Dusheiko G. Hepatitis C. **Medicine.** 2007;35(1):43-8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Eder T, Mayer R, Langsenlehner U, Renner W, Krippel P, Wascher TC, Pummer K, Kapp KS. Interleukin-10 [ATA] promoter haplotype and prostate cancer risk: a population-based study. **Eur J Cancer**. 2007;43(3):472-5.

Edwards-Smith CJ, Jonsson JR, Purdie DM, Bansal A, Shorthouse C, Powell EE. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**. 1999;30(2):526-30.

Einav S, Koziel MJ. Immunopathogenesis of hepatitis C virus in the immunosuppressed host. **Transpl Infect Dis**. 2002;4(2):85-92.

Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1998;95(16):9465-70.

Eskdale J, Kube D, Tesch H, Gallagher G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**. 1997;46(2):120-8.

Excoffier LG, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online** 2005;1:47-50.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, Whelton M, O'Sullivan K, Shanahan F. HLA class II genes determine the natural variance of hepatitis C viral load.

Hepatology. 2001;33(1):224-30.

Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. **Semin Liver Dis.** 2004;24 Suppl 2:9-18.

Fickenscher H, Hor S, Kupers H, Knappe A, Wittmann S, Sticht H. The interleukin-10 family of cytokines. **Trends Immunol.** 2002;23(2):89-96.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.** 1989;170(6):2081-95.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol.** 1991;147(11):3815-22.

Focaccia R, da Conceicao OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorenci R, Vieira De Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Saez-Alquezar A, Riscal JR, Fischer D. Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population. **Braz J Infect Dis.** 1998;2(6):269-284.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, Balan V, Diago M, Marcellin P, Ramadori G, Bodenheimer H Jr, Bernstein D, Rizzetto M, Zeuzem S, Pockros PJ, Lin A, Ackrill AM; PEGASYS International Study Group. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med.** 2004;140(5):346-55.

Heim MH, Moradpour D, Blum HE. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits signal transduction through the Jak-STAT pathway. **J Virol.** 1999;73(10):8469-75.

Hill AV. Immunogenetics and genomics. **Lancet.** 2001;357(9273):2037-41.

Hinds DA, Kloek AP, Jen M, Chen X, Frazer KA. Common deletions and SNPs are in linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Genet.** 2006;38(1):82-5.

Hofmann WP, Zeuzem S, Sarrazin C. Hepatitis C virus-related resistance mechanisms to interferon alpha-based antiviral therapy. **J Clin Virol.** 2005;32(2):86-91.

Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, DRB1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **World J Gastroenterol.** 2005;11(46):7302-7.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Huang Y, Yang H, Borg BB, Su X, Rhodes SL, Yang K, Tong X, Tang G, Howell CD, Rosen HR, Thio CL, Thomas DL, Alter HJ, Sapp RK, Liang TJ. A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104(3):985-90.

Ichikawa T, Nakao K, Nakata K, Yamashita M, Hamasaki K, Shigeno M, Abiru S, Ishikawa H, Ishii N, Eguchi K. Involvement of IL-1beta and IL-10 in IFN-alpha-mediated antiviral gene induction in human hepatoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 2002;294(2):414-22.

Ito S, Ansari P, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly RP, Larner AC, Finbloom DS. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. **Blood.** 1999;93(5):1456-63.

Jacobson Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. **Clin Biochem.** 2001;34(3):167-71.

Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. **Intern Med.** 2006;45(4):183-91.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **J Immunol.** 1992;148(11):3618-23.

Kimball P, Elswick RK, Shiffman M. Ethnicity and cytokine production gauge response of patients with hepatitis C to interferon-alpha therapy. **J Med Virol.** 2001;65(3):510-6.

Knapp S, Hennig BJ, Frodsham AJ, Zhang L, Hellier S, Wright M, Goldin R, Hill AV, Thomas HC, Thursz MR. Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. **Immunogenetics.** 2003;55(6):362-9.

Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. **Stem Cells.** 2001;19(5):378-87.

Kurreeman FA, Schonkeren JJ, Heijmans BT, Toes RE, Huizinga TW. Transcription of the IL10 gene reveals allele-specific regulation at the mRNA level. **Hum Mol Genet.** 2004;13(16):1755-62.

Lazarus R, Vercelli D, Palmer LJ, Klimecki WJ, Silverman EK, Richter B, Riva A, Ramoni M, Martinez FD, Weiss ST, Kwiatkowski DJ. Single nucleotide polymorphisms in innate immunity genes: abundant variation and potential role in complex human disease. **Immunol Rev.** 2002;190:9-25.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae. **Clin Microbiol Rev.** 2000;13(1):67-82,

Lio D, Caruso C, Di Stefano R, Colonna Romano G, Ferraro D, Scola L, Crivello A, Licata A, Valenza LM, Candore G, Craxi A, Almasio PL. IL-10 and TNF-alpha polymorphisms and the recovery from HCV infection. **Hum Immunol.** 2003;64(7):674-80.

Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, Reddy BS, Bamezai RN. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. **Hum Genet.** 2005;118(2):295-300.

Mangia A, Santoro R, Piattelli M, Pazienza V, Grifa G, Iacobellis A, Andriulli A. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearance of HCV infection. **Cytokine.** 2004;25(3):103-9.

Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. **Gut.** 2006;55(9):1350-9.

Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. **Curr Opin Immunol.** 2005;17(5):510-6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med.** 1998;339(21):1485-92.

Memon MI, Memon MA. Hepatitis C: an epidemiological review. **J Viral Hepat.** 2002;9(2):84-100.

Mihm U, Herrmann E, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: predicting response in hepatitis C virus therapy. **Aliment Pharmacol Ther.** 2006;23(8):1043-54.

Minton EJ, Smillie D, Smith P, Shipley S, McKendrick MW, Gleeson DC, Underwood JC, Cannings C, Wilson AG; Trent Hepatitis C Study Group. Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes. **Hum Immunol.** 2005;66(2):127-32.

Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. **J Gastroenterol.** 2001;36(12):799-808.

Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. **Trends Immunol.** 2003;24(1):36-43.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** 2001;19:683-765.

Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. **Science.** 1990;248(4960):1230-4.

Moradpour D, Blum HE. A primer on the molecular virology of hepatitis C. **Liver Int.** 2004;24(6):519-25.

Moraes MO, Santos AR, Schonkeren JJ, Vanderborght PR, Ottenhoff TH, Moraes ME, Moraes JR, Sampaio EP, Sarno EN, Huizinga TW. Interleukin-10 promoter haplotypes are differently distributed in the Brazilian versus the Dutch population. **Immunogenetics.** 2003;54(12):896-9.

Muller U, Steinhoff U, Reis LF, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science.** 1994;264(5167):1918-21.

Murray PJ. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **J Immunol.** 2007;178(5):2623-9.

Neuman MG, Benhamou JP, Malkiewicz IM, Akremi R, Shear NH, Asselah T, Ibrahim A, Boyer N, Martinot-Peignoux M, Jacobson-Brown P, Katz GG, Le

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Breton V, Le Guludec G, Suneja A, Marcellin P. Cytokines as predictors for sustained response and as markers for immunomodulation in patients with chronic hepatitis C. **Clin Biochem.** 2001;34(3):173-82.

Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T cell response in hepatitis C virus infection. **J Clin Virol.** 2005;32(2):75-85.

Niederau C, Heintges T, Haussinger D. Treatment of chronic hepatitis C with a-interferon: an analysis of the literature. **Hepatogastroenterology.** 1996;43(12):1544-56.

NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. **NIH Consens State Sci Statements.** 2002;19(3):1-46.

Ouyang C, Krontiris TG. Identification and functional significance of SNPs underlying conserved haplotype frameworks across ethnic populations. **Pharmacogenet Genomics.** 2006;16(9):667-82.

Paladino N, Fainboim H, Theiler G, Schroder T, Munoz AE, Flores AC, Galdame O, Fainboim L. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. **J Virol.** 2006;80(18):9144-50.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Pawlik A, Kurzawski M, Szklarz BG, Herczynska M, Drozdziak M. Interleukin-10 promoter polymorphism in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol.** 2005;24(5):480-4.

Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. **Gastroenterology.** 2002a;122(6):1554-68.

Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol.** 2004;12(2):96-102.

Pawlotsky JM. The nature of interferon-alpha resistance in hepatitis C virus infection. **Curr Opin Infect Dis.** 2003;16(6):587-92.

Pawlotsky JM. Therapy of hepatitis C: from empiricism to eradication. **Hepatology.** 2006;43(2 Suppl 1):S207-20.

Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology.** 2002b;36(5 Suppl 1):S65-73.

Penin F, Dubuisson J, Rey FA, Moradpour D, Pawlotsky JM. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology.** 2004;39(1):5-19.

Persico M, Capasso M, Persico E, Masarone M, Renzo A, Spano D, Bruno S, Iolascon A. Interleukin-10 - 1082 GG polymorphism influences the

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

occurrence and the clinical characteristics of hepatitis C virus infection. **J Hepatol.** 2006;45(6):779-85.

Pestka S. The human interferon alpha species and receptors. **Biopolymers.** 2000;55(4):254-87.

Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM, Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology.** 2000;31(4):828-33.

Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opolon P, Zarski JP. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. **Hepatology.** 1996;24(4):778-89.

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. **Lancet.** 2003;362(9401):2095-100.

Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. **Science.** 2001;292(5525):2323-5.

Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, Shiffman M, Everson G, Reindollar R, Fried MW, Purdum PP 3rd, Jensen D, Smith C, Lee WM, Boyer TD, Lin A, Pedder S, DePamphilis J. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**. 2001;33(2):433-8.

Rigopoulou EI, Abbott WG, Haigh P, Naoumov NV. Blocking of interleukin-10 receptor--a novel approach to stimulate T-helper cell type 1 responses to hepatitis C virus. **Clin Immunol**. 2005;117(1):57-64.

Rosen HR, Gretch DR. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. **Mol Med Today**. 1999;5(9):393-9.

Saito T, Ji G, Shinzawa H, Okumoto K, Hattori E, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Ito JI, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Ishii K, Matsuura T, Inageda K, Muramatsu M, Kawata S. Genetic variations in humans associated with differences in the course of hepatitis C. **Biochem Biophys Res Commun**. 2004;317(2):335-41.

Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin Chem**. 1998;44(8 Pt 1):1748-50.

São Paulo (Estado) RESOLUÇÃO SS nº 39, de 31 de março de 2006. Aprova Norma Técnica expedida pela Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica, que estabelece as diretrizes

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

para o tratamento da Hepatite Viral C Crônica no âmbito do Sistema Único de Saúde do Estado de São Paulo. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo. Nº 62; 2006 01abr.; Seção 1; p.25.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Souza AP, Brito RB, Camargo LE, Line SR. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms are associated with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol**. 2004;31(6):443-8.

Schiff ER. Prevention of mortality from hepatitis B and hepatitis C. **Lancet**. 2006;368(9539):896-7.

Scott JD, Gretch DR: Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. **JAMA**. 2007;297:724-732.

Shackel NA, McCaughan GW. Intrahepatic interferon-stimulated gene responses: can they predict treatment responses in chronic hepatitis C infection? **Hepatology**. 2007;46(5):1326-8.

Shen X, Hong F, Nguyen VA, Gao B. IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3. **FEBS Lett**. 2000;480(2-3):132-6.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**. 2005;5(9):558-67.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Soo C, Shaw WW, Freymiller E, Longaker MT, Bertolami CN, Chiu R, Tieu A, Ting K. Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7. **J Cell Biochem.** 1999;74(1):1-10.

Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. **Immunology.** 1995;85(2):311-7.

Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. **Bioessays.** 1999;21(1):47-52.

Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. **Hepatology.** 2004;39(4):1147-71.

Strauss E. Hepatitis C. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2001;34(1):69-82.

Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, Hernandez F, Maertens G. Second-generation line probe assay for hepatitis C virus genotyping. **J Clin Microbiol.** 1996;34(9):2259-66.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Suzuki F, Arase Y, Suzuki Y, Tsubota A, Akuta N, Hosaka T, Someya T, Kobayashi M, Saitoh S, Ikeda K, Kobayashi M, Matsuda M, Takagi K, Satoh J, Kumada H. Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. **J Viral Hepat.** 2004;11(3):271-6.

Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. **Int J Med Sci.** 2006;3(2):41-6.

Tan SL, Katze MG. How hepatitis C virus counteracts the interferon response: the jury is still out on NS5A. **Virology.** 2001;284:1-12.

Taylor DR, Shi ST, Lai MM. Hepatitis C virus and interferon resistance. **Microbes and Infection.** 2000;2:1743-56.

Thio CL, Thomas DL, Carrington M. Chronic viral hepatitis and the human genome. **Hepatology.** 2000;31(4):819-27.

Tone M, Powell MJ, Tone Y, Thompson SA, Waldmann H. IL-10 gene expression is controlled by the transcription factors Sp1 and Sp3. **J Immunol.** 2000;165(1):286-91.

Tsubota A, Chayama K, Ikeda K, Yasuji A, Koida I, Saitoh S, Hashimoto M, Iwasaki S, Kobayashi M, Hiromitsu K. Factors predictive of response to

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

interferon-alpha therapy in hepatitis C virus infection. **Hepatology**. 1994;19(5):1088-94.

Tsuda N, Yuki N, Mochizuki K, Nagaoka T, Yamashiro M, Omura M, Hikiji K, Kato M. Long-term clinical and virological outcomes of chronic hepatitis C after successful interferon therapy. **J Med Virol**. 2004;74(3):406-13.

Tuite A, Gros P. The impact of genomics on the analysis of host resistance to infectious disease. **Microbes Infect**. 2006;8(6):1647-53.

Valenti L, Pulixi E, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Maggioni M, Orsatti A, Gianni C, Fargion S. TNFalpha genotype affects TNFalpha release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis. **J Hepatol**. 2005;43(6):944-50.

Vidigal PG, Germer JJ, Zein NN. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. **J Hepatol**. 2002;36(2):271-7.

Wong T, Lee SS. Hepatitis C: a review for primary care physicians. **CMAJ**. 2006;174(5):649-59.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Xavier GM, de Sá AR, Guimarães AL, da Silva TA, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. **J Oral Pathol Med.** 2007;36(8):476-81.

Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day IN. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Res.** 2001;29(17):E88-8.

Yee LJ, Tang J, Gibson AW, Kimberly R, Van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. **Hepatology.** 2001;33(3):708-12.

Yee LJ. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. **Genes Immun.** 2004;5(4):237-45.

Yoshioka K, Higashi Y, Yamada M, Aiyama T, Takayanagi M, Tanaka K, Okumura A, Iwata K, Kakumu S. Predictive factors in the response to interferon therapy in chronic hepatitis C. **Liver.** 1995;15(2):57-62.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol Rev.** 2000;13(2):223-35.

Zhao H, Nettleton D, Dekkers JC. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. **Genet Res.** 2007;89(1):1-6.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)