



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
INTERLEUCINA 18 (-137 G/C E -607 C/A) EM PACIENTES PORTADORES DO
VÍRUS DA HEPATITE C DE BELÉM-PA**

KEMPER NUNES DOS SANTOS

BELÉM-PA
2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Santos, Kemper Nunes dos.

Análise de polimorfismo na região promotora do gene da Interleucina 18 (-137 G/C e -607 C/A) em pacientes portadores do vírus da hepatite C de Belém, Pará / Kemper Nunes dos Santos; orientadora, Luisa Caricio Martins. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Vírus da hepatite C. 2. Hepatite C – Belém (PA). 3. Polimorfismo. 4. Biologia molecular. I. Martins, Luisa Caricio, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.36230098115

KEMPER NUNES DOS SANTOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA
INTERLEUCINA 18 (-137 G/C E -607 C/A) EM PACIENTES PORTADORES DO
VÍRUS DA HEPATITE C DE BELÉM-PA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais, sob orientação da professora Dra. Luisa Caricio Martins.

BELÉM-PA

2012

KEMPER NUNES DOS SANTOS

ANÁLISE DE POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA INTERLEUCINA 18 (-137 G/C E -607 C/A) EM PACIENTES PORTADORES DO VÍRUS DA HEPATITE C DE BELÉM-PA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito à obtenção do grau de Mestre em Doenças Tropicais sob a orientação da professora Dra. Luísa Carício Martins.

Data da defesa: 23/03/2012

Conceito: _____

Banca examinadora

Dra. Luisa Carício Martins
Prof^a Orientadora – Doutora em Genética e Biologia Molecular – UFPA
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

Dra. Hellen Thais Fuzii
Membro avaliador – Doutora em Pediatria e Ciências Aplicadas à Pediatria – UFSP
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

Dra. Fabiola Elizabeth Villanova
Membro avaliador – Doutora em Ciências – Universidade de São Paulo
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/Universidade Federal do Pará

Dra Lívia Carício Martins
Membro avaliador – Doutora em Agentes Infecciosos e Parasitários – UFPA
Instituto Evandro Chagas – Departamento de Arbovírus

Que a luz da consciência ilumine minhas decisões para que o espelho da vida reflita em mim sempre bondade, humildade, sabedoria e justiça.

Kemper dos Santos

Nós somos a consequência plena de todas as escolhas que um dia o destino nos permitiu fazer.

Kemper dos Santos

Dedico este trabalho à todos que confiaram e acreditaram na minha capacidade. Aos meus pais, José Sena e Vera Lúcia, minha esposa, Marcella Almeida, meus sogros Maria de Jesus e Odorico Ribeiro, e à minha estimada orientadora, Dra. Luísa Carício Martins. Esta é uma conquista compartilhada entre todos nós.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelas oportunidades e por conceder-me lucidez para discerni-las, por me dar forças para que eu possa superá-las com sucesso e ética, e por me permitir uma segunda chance quando tudo parecia esquecido...

Aos meus pais, José Sena e Vera Lúcia, por terem estado ao meu lado nos momentos mais difíceis e por acreditarem em mim quando muitos não o fizeram, que a superação em todos os desafios tenham valido a pena e que este momento esteja entre as melhores formas de agradecê-los por tudo.

À minha querida esposa e eterna namorada, Marcella “Kelly” de Almeida, por todos os momentos compartilhados e que tornam nossas vidas tão especiais. Que nossa felicidade, cumplicidade e respeito descansem integras a cada anoitecer e despertem renovadas ao nascer de cada novo dia, sempre.

Aos meus amigos Rafael (repolho), pelas palavras em tempos distantes que me fizeram acreditar que meus sonhos deveriam ser encarados como objetivos alcançáveis, são elas que me direcionam às muitas das minhas escolhas, ao Oskar, que de aliado das divertidas e intermináveis mesas de RPG, se tornou um grande amigo e ainda nos presenteou com a amizade e cumplicidade desta maravilhosa pessoa que é a Renata, ao Paulo (Neruda), figura única que representa em sua totalidade o verdadeiro significado da palavra amizade, ao Luís Carlos, irmão, amigo e companheiro, ao Siddartha, que por não ter comparecido à minha defesa garantiu que tudo saísse conforme desejado, ao Márcio e Lili, grandes amigos e queridos compadres, ao Mauro (drac), que apesar de distante, para mim, ainda continua sendo um grande amigo, ao Bruno (osso), amigo e cunhado, ao Bruno (gládios), “garoto inseqüente”, à Andreza e Helline, irmãs, amigas e companheiras, à Elaine (ruiva), chata, porém querida, e à Liliane, uma grande amiga e irmã caçula, não pela idade que tem, mas pelas besteiras que faz. Não poderia esquecer também da galera do RPG do Maguari, Paulo, Anderson (obeso), Thiago (chokito), Alexandre (Black), Ricardo (pit), e todos os demais, pessoas valiosas e amigos promissores. Aos amigos do laboratório de patologia clínica do NMT-UFPA, por me ensinarem quando eu não possuía o conhecimento e por aprenderem comigo quando eu o tinha, em especial à Dra. Luísa Carício por ter me concedido a oportunidade, em 2007, quando ainda graduando, de fazer parte deste grupo de pesquisa que me tornou o profissional que hoje acredito ser, ao seu esposo Patrick, por ter me feito o

convite, e à Amanda, pelos ensinamentos e pelo companheirismo dentro e fora do Núcleo de Medicina Tropical. Por fim, aos pacientes que aceitaram sua participação neste projeto. Que de alguma forma, sua disponibilidade seja gratificada com os frutos deste trabalho. Aos professores e todos os demais profissionais do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA.

RESUMO

Desde a sua descoberta, em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) tem sido reconhecido como a maior causa de doença hepática crônica no mundo. Considerado um problema de saúde pública mundial que envolve entre 170 a 350 milhões de pessoas infectadas. Fatores genéticos do hospedeiro têm sido implicados na persistência da infecção pelo HCV. Estudos sugerem que dois polimorfismos de nucleotídeos únicos na posição -607 C/A (rs1946518) e -137 G/C (rs187238) na região promotora do gene da IL-18 têm sido encontrados e associados com a atividade de transcrição do promotor da IL-18 e, potencialmente, de IFN- γ , sendo associados ao atraso na depuração viral e na persistência da doença. Foi realizado um estudo do tipo transversal analítico no município de Belém-PA, em 152 amostras sanguíneas de pacientes infectados pelo HCV e 188 controles não infectados. As amostras foram submetidas à RT-PCR, para detecção do RNA viral e, posteriormente, à RFLP-PCR para avaliação do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A. Os resultados não revelaram diferença significativa para os polimorfismos da IL-18 entre os pacientes e grupo controle. Mas revelou diferença significativa para os genótipos homocigotos G/G (39,1%), na posição -137 (OR = 3.00, IC [95%] = 1.24 – 7.22, $p = 0.02$), e A/A (21,7%), posição -607 (OR = 3.62, IC [95%] = 1.25 – 10.45, $p = 0.03$), entre as mulheres, em relação aos homens (22,6% e 7,6%). Os resultados demonstraram indícios que entre as mulheres, a presença do polimorfismo homocigoto A/A (-607) atue como fator protetor contra a infecção pelo HCV, já que o genótipo A/A (-607) tem sido relacionado em alguns estudos à doença hepática leve e à depuração viral.

Palavras-Chaves: Polimorfismo, IL-18, HCV, IFN- γ , Biologia Molecular.

ABSTRACT

Since its discovery in 1989, the hepatitis C virus (HCV) has been recognized as a major cause of chronic liver disease worldwide. Considered a public health problem worldwide involving between 170 to 350 million people infected. Host genetic factors have been implicated in the persistence of HCV infection. Studies suggest that two single nucleotide polymorphisms at position -607 C/A (rs1946518) and -137 G/C (rs187238) in the region of the gene IL-18 and have been found associated with the transcriptional promoter activity of IL -18, and potentially of IFN- γ , being associated with delayed viral clearance and persistence of the disease. We conducted a cross-sectional analytical study of the city of Belém-PA in 152 blood samples from patients infected with HCV and 188 uninfected controls. The samples were subjected to RT-PCR (Reverse Transcriptase - PCR) for detection of viral RNA and, subsequently, the PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) to evaluate the polymorphism in the promoter region of IL-18 gene at positions -137 G/C and -607 C/A. The results showed no significant difference for IL-18 polymorphisms between patients and control group. But showed a significant difference for homozygous genotypes G/G (39.1%) at position -137 (OR = 3.00, CI [95%] = 1.24 – 7.22, $p = 0.02$), and A/A (21.7 %), position -607 (OR = 3.62, CI [95%] = 1.25 – 10.45, $p = 0.03$) among women than men (22.6% and 7.6%). The results showed evidence that among women, the presence of the polymorphism homozygous A/A (-607) acts as a protective factor against HCV infection, genotype as the A/A (-607) have been linked in some studies with liver disease and mild viral clearance.

Key Words: Polymorphism, IL-18, HCV, IFN- γ , Molecular Biology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo estrutural do HCV.....	20
Figura 2	Estrutura genômica do HCV.....	21
Figura 3	Efeitos na homeostase da célula hospedeira durante a infecção pelo HCV.....	26
Figura 4	Interleucina 18; processamento, receptores e regulação.....	30
Figura 5	Imagem ilustrando o SNP na posição -137 em gel de eletroforese a 3% representando amostras tratadas com a enzima de restrição Bgl II (RFLP-PCR). Pode-se observar o perfil das bandas de 141pb, para o alelo C e 105pb, para o alelo G. As amostras dos poços 1, 2, 3, 4 e 5, apresentaram cortes de 141pb e 105pb, sugerindo perfil heterozigoto (C/G) à estes pacientes, enquanto que a amostra 6 apresentou corte único de 141pb, sugerindo se tratar de um caso homozigoto (C/C).....	45
Figura 6	Foto de eletroforese em gel de agarose 3% representando o SNP na posição -607, em amostras tratadas com a enzima de restrição Dra I (RFLP-PCR). Pode-se observar os tamanhos das bandas, sendo de 154pb, para o alelo C, e 125pb, para o alelo A. Resultados obtendo o perfil heterozigoto (C/A) foram encontrados nas amostras 1, 3, 4, 6 e 9. As amostras 5, 7 e 10 apresentaram o perfil homozigoto com alelos C/C (154pb), e as amostras 2 e 8, também homozigotos, mas com alelos A/A (125pb).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Protocolo da RT-PCR para a detecção do HCV.....	39
Tabela 2	Protocolo de amplificação em termociclador da RT-PCR para o HCV.....	39
Tabela 3	Protocolo da PCR para a detecção do HCV.....	40
Tabela 4	Protocolo de amplificação em termociclador da PCR para o HCV.....	40
Tabela 5	Protocolo da RFLP-PCR para a identificação dos genótipos do HCV.....	41
Tabela 6	Protocolo da PCR para a posição -137 G/C.....	43
Tabela 7	Protocolo utilizado para amplificação em termociclador do SNP - 137 G/C, na região promotora do gene da IL-18.....	43
Tabela 8	Protocolo da PCR para a posição -607 C/A.....	44
Tabela 9	Protocolo utilizado para amplificação em termociclador da SNP - 607 C/A, da região promotora do gene da IL-8.....	44
Tabela 10	Polimorfismo da IL-18, relacionada entre os pacientes e os resultados apresentados na PCR.....	47
Tabela 11	Polimorfismo da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A), relacionada entre os pacientes e os genótipos encontrados do HCV.....	48
Tabela 12	Polimorfismo da IL-18 nos pacientes e grupo controle.....	49
Tabela 13	Relação entre os gêneros e a frequência dos genótipos no SNP da IL-18.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Grau Celsius

µl: microlitro

A: Amperagem

AcPL: Proteína acessória tipo-subunidade

AMPc: Adenosina monofosfato ciclina

Anti-HCV: anticorpo contra o vírus da hepatite C

AP-1: Proteína ativadora 1

AVA II: *Anabaena variabilis*

Bgl II: *Bacillus globigii*

C: Proteína do core

CDKs: Quinases dependentes de ciclinas

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

CREB: Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxi-nucleotídeo trifosfato

Dra I: *Deinococcus radiophilus*

E1: Envelope 1

E2: Envelope 2

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético.

ELISA: Ensaio imuno-adsorvente de ligação à enzima

Fas: Proteína de morte celular

FasL: Ligante da proteína de morte celular

H4TF-1: Fatores de Transcrição H4-1

HBV: Vírus da hepatite B

HCC: Carcinoma hepatocelular

HCV: Vírus da hepatite C

HEMOPA: Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HIV-1: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSCs: Células hepáticas estreladas

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC: Intervalo de Confiança

IFN- γ : Interferon gama
IL-1: Interleucina 1
IL-10: Interleucina 10
IL-12: Interleucina 12
IL-18: Interleucina 18
IL-18BP: Proteínas de ligação da interleucina 18
IL-18R: Receptor da Interleucina 18
IL-18RAP: Proteína acessório do receptor da interleucina 18
IL-18Rrp: Receptor relacionado à proteína da interleucina 18
IL-1F10: Intereucina 1F10
IL-1F4: Interleucina 1F4
IL-1F5: Interleucina 1F5
IL-1R: Receptor da Interleucina 1
IL-1Ra: Antagonista do receptor de interleucina 1
IL-1 α : Interleucina 1 alfa
IL-1 β : Interleucina 1 beta
IL-2: Interleucina 2
IL-33: Interleucina 33
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
IRAK: Quinase associada ao receptor de interleucina 1
JNK: Proteína Jun N-terminal quinase
K10: Queratina 10
K11: Queratina 11
K15: Queratina 15
K16: Queratina 16
kb: Kilobases
kDa: Kilodaltons
LTCs: Linfócitos T citotóxicos
MAPKs: Proteínas quinases de atividade mitogênica
MgCL₂: Cloreto de Magnésio
MIP: Proteínas inflamatórias macrofágicas
ml: mililitro
MyD88: Fator de diferenciação mielóide primária-88

NCR: Região não codificadora
NF- κ B: Fator nuclear kappa beta
NK: Células assassinas
nm: Nanômetros
nM: Nanomolar
NMT: Núcleo de Medicina Tropical
NOSi: Óxido nítrico induzível
NS2: Não estrutural 2
NS3: Não estrutural 3
NS4A: Não estrutural 4A
NS4B: Não estrutural 4B
NS5A: Não estrutural 5A
NS5B: Não estrutural 5B
OR: Razão de possibilidade
ORF: Matriz de leitura aberta
 p : Probabilidade de significância
p21: Proteína 21
p53: Proteína 53
p63: Proteína 63
p7: Proteína 7
p73: Proteína 73
PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos
pb: Pares de base
PCNA: Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR: Reação em cadeia da polimerase
pg/ml: Picograma por mililitro
pRb: Proteína do retinoblastoma
Pró-IL-1 β : Pró interleucina 1 beta
Pró-IL-18: Pró interleucina 18
PRP: Receptor de reconhecimento padrão
R2: Coeficiente de determinação
RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
RIG-I: Receptor de ácido retinóico gene induzível
RNA: Ácido ribonucleico

RNA_m: Ácido ribonucléico mensageiro

RPM: Rotação por minuto

RSA I: *Rhodopseudomonas sphaeroides*

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

TBE: Tris-borato-EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF- β : Fator de transformação do crescimento beta

Th1: T auxiliar 1

Th2: T auxiliar 2

TNF: Fator de necrose tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Toll-Like: Tipo Toledo

U/ μ l: Unidade por microlitro

UFPA: Universidade Federal do Pará

V: Voltagem

vs: Versus

α -SMA: Alfa actina de músculo liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	JUSTIFICATIVA.....	19
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
3.1	CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HCV.....	20
3.2	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV.....	21
3.3	ASPECTOS CLINICOS DA INFECÇÃO PELO HCV.....	23
3.4	ASPECTOS PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HCV.....	24
3.5	ASPECTOS PRÓ-ONCOGÊNICOS DO HCV.....	25
3.6	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO PELO HCV.....	27
3.7	IL-18.....	29
3.8	IL-18 E SUA RELAÇÃO NA INFECÇÃO PELO HCV.....	32
3.9	POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 E SUA RELAÇÃO NA INFECÇÃO PELO HCV.....	33
4	OBJETIVOS.....	34
4.1	OBJETIVO GERAL.....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
5	METODOLOGIA.....	35
5.1	CASUÍSTICA.....	35
5.1.1	Desenho do Estudo.....	35
5.1.2	Caracterização da Amostra.....	35
5.1.3	Crterios de Inclusão e Exclusão.....	36
5.1.4	Local do Estudo.....	36
5.1.5	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	36
5.2	MÉTODOS LABORATORIAIS.....	37
5.2.1	Obtenção das Amostras Biológicas.....	37
5.2.2	Testes Sorológicos.....	37
5.2.3	Extração do RNA do HCV para a Realização da RT-PCR.....	38
5.2.4	Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa (RT- PCR).....	38
5.2.5	Identificação dos Genótipos do HCV por RFLP-PCR.....	41
5.2.6	Extração do DNA para a Detecção do Polimorfismo da IL-18.....	42
5.2.7	Identificação do Polimorfismo do Gene da IL-18 (-137 G/C e -607	

	C/A).....	42
5.2.8	Identificação do Polimorfismo do Gene da IL-18 por RFLP-PCR.....	44
5.2.10	Análise Estatística.....	46
6	RESULTADOS	47
6.1	AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA IL-18 EM COMPARAÇÃO À PCR DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HCV.....	47
6.2	AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO HCV AO POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18.....	48
6.3	DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 (-137 G/C e -607 C/A) NOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE.....	48
6.4	AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 (-137 G/C e -607 C/A), ENTRE OS GÊNEROS.....	49
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta, em 1989, o vírus da hepatite C (HCV) tem sido reconhecido como a maior causa de doença hepática crônica no mundo (SHEPARD et al., 2005). Considerado um problema de saúde pública mundial que envolve entre 170 a 350 milhões de pessoas infectadas (AHMAD et al., 2011; ASSELAH et al., 2010; VISO et al., 2007). Aproximadamente 3% da população mundial sofrem com a hepatite C crônica (AHMAD et al., 2011; TOMANOVIC et al., 2009). Não se conhece, com precisão, a prevalência do HCV no nosso país: diversas regiões sugerem que esteja entre 1% a 2% da população em geral (FERREIRA, SILVEIRA, 2004).

A epidemiologia do HCV tem sido fortemente associada a certos grupos de risco em exposição a produtos do sangue (ELASIFER et al., 2010). A recepção de transfusões sanguíneas antes de 1990 também é visto como fator de risco, entretanto, alguns casos de contaminação podem não apresentar fatores de risco associados (LAUER, WALKER, 2001). A transmissão materno-fetal ocorre, mas é pouco freqüente e muitas vezes associada à co-infecção com HIV-1 na mãe. A transmissão sexual parece ser um meio ineficiente, sendo menos eficiente do que nos casos relacionados ao HIV-1. A co-infecção com HIV-1 parece aumentar o risco de transmissão sexual e materno-fetal do HCV (LAUER, WALKER, 2001).

A replicação viral a nível hepático e por tempo prolongado pode levar a manifestações clínicas graves, como fibrose hepática, cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC). Cerca de um terço dos pacientes infectados cronicamente pelo HCV desenvolve cirrose e HCC (BALDICK et al., 2010; MANOHAR et al., 2009). Nos países em desenvolvimento 50% a 70% dos adultos infectados pelo HCV irão desenvolver infecção crônica (BRADLEY, 1992; IOANNOU et al., 2010). Cirrose com ou sem HCC ocorre em aproximadamente 20% dos casos (LOPES et al., 1995).

As citocinas têm um papel indispensável na diferenciação, maturação, ativação funcional das células do sistema imunológico e na regulação da resposta imunológica que controla a depuração do HCV ou sua persistência (AN et al., 2008; MANOHAR et al., 2009). Os genes predominantes envolvidos na progressão da doença e persistência pelo HCV estão relacionados à replicação e mediação da resposta imunológica (MANOHAR et al., 2009). Fatores genéticos do hospedeiro têm sido implicados na persistência da infecção pelo HCV. Sabe-se que dois

polimorfismos na região promotora dos genes da interleucina 18 (IL-18) e seus haplótipos podem afetar sua expressão gênica (AN et al., 2008).

A IL-18, também chamada de fator indutor de interferon gama (INF- γ) e membro da família de citocinas IL-1, é uma citocina pró-inflamatória importante na indução tanto da resposta Th1 quanto Th2 (AN et al., 2008; GRACIE et al., 2003; MANOHAR et al., 2009; MORALES et al., 2010). Ela é produzida por uma variedade de células do sistema imunológico, tais como monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas, a partir de um precursor biologicamente inativo – pró-IL-18 – durante a resposta imunológica aguda (AN et al., 2008; MANOHAR et al., 2009; MORALES et al., 2010). A IL-18 é uma citocina obrigatória para a produção de INF- γ e sua regulação é maior nos pacientes cronicamente infectadas pelo HCV do que em pessoas saudáveis ou portadores assintomáticos (MANOHAR et al., 2009; MORALES et al., 2010). Seu nível superior está co-relacionado com lesão hepática, indicando um papel chave da IL-18 na patogênese pelo HCV (AN et al., 2008; SCHVOERER et al., 2003).

Supõe que polimorfismos na região promotora do gene possam modular a expressão e os níveis protéicos da IL-18, influenciando na evolução da infecção pelo HCV (AN et al., 2008). Estudos sugerem que dois polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) na posição -607 C/A (rs1946518) e -137 G/C (rs187238) na região promotora do gene da IL-18 têm sido encontrados e associados com a atividade de transcrição do promotor da IL-18 e, potencialmente, de IFN- γ , sendo associados ao atraso na depuração viral e na persistência da doença (AN et al., 2008; MANOHAR et al., 2009).

2 JUSTIFICATIVA

A progressão da doença pelo HCV varia entre os indivíduos. Evidências suficientes sugerem que tal progressão seja multifatorial, o que inclui fatores virais, imunológicos e genéticos (MANOHAR et al., 2009). Fatores genéticos são importantes na patogênese das principais doenças humanas. Sabe-se que populações humanas variam geneticamente por conta de polimorfismos que podem afetar os aspectos da resposta imunológica (KHRIPKO et al., 2008).

Polimorfismo na região promotora da IL-18, nas posições -607 e -137, associado a variantes alélicas deste gene, não influencia a sequência proteica de aminoácidos, mas pode resultar em modificações na produção de citocinas. Em consequência, isto pode alterar a resposta imunológica mediada por citocinas, o que estaria associada a diversas doenças, tais como as doenças cardiovasculares, a doença de Crohn e doenças infecciosas, como a causada pelo HIV e na infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) (KHRIPKO et al., 2008; MANOHAR et al., 2009).

Estudos realizados em nativas do Hawaii mostraram associação positiva entre a presença do heterozigoto G/C, na posição -137, e o risco para o desenvolvimento de câncer do ovário (BUSHLEY et al., 2004). O alelo G, na posição -137, associa-se ao desenvolvimento da asma brônquica e processos alérgicos da pele (IMBODEN et al., 2006). Na China, pacientes com HBV crônico apresentam significativa frequência dos alelos G/G, na posição -137. Entretanto, a frequência do alelo C na posição -137 foi significativamente baixa nos infectados pelo HBV, indicando que a presença do alelo C nesta posição tenha um efeito protetor no desenvolvimento da infecção pelo HBV (ZHANG et al., 2005). Em biópsias de células gigantes durante vasculite grave e moderada, foi observada uma frequência significativa do alelo A, na posição -607, em comparação aos pacientes controles (47,8% versus 40,9%) (MORALES et al., 2010). Em pacientes infectados pelo HCV, houve uma frequência maior do alelo A/A na posição -607 para os pacientes com infecção moderada, comparados aqueles com infecção hepática severa (MANOHAR et al., 2009).

A importância da IL-18 na resposta imunológica e na defesa do hospedeiro está apenas começando a ser apreciada (SHARMA et al., 2008). Ainda não há informações claras da importância e o significado do polimorfismo dos promotores da IL-18 nas posições (-607 e -137) com o HCV (MANOHAR et al., 2009).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CLASSIFICAÇÃO E ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO HCV

O HCV é um pequeno vírus envelopado classificado como membro da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, levando em consideração sua similaridade biológica e genética em relação aos vírus da dengue e da febre amarela (BALSANO a ALISE, 2007; PENIN et al, 2004; SUZUKI et al, 2007).

Abaixo, na figura 1, está representada a partícula viral do HCV, podendo-se observar sua forma esférica, de tamanho estimado em 50nm, consistindo de um envelope derivado da membrana celular do hospedeiro, formado por glicoproteínas virais sensíveis a detergentes, e um capsídeo icosaédrico contendo uma molécula de RNA (TELLINGHUISEN et al, 2007).

A partícula viral do HCV é constituída de três proteínas estruturais, a proteína do core (C) e duas glicoproteínas (E1 e E2), e seis não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), além de uma proteína associada à membrana, p7 (BALSANO, ALISI, 2007; SUZUKI et al, 2007).

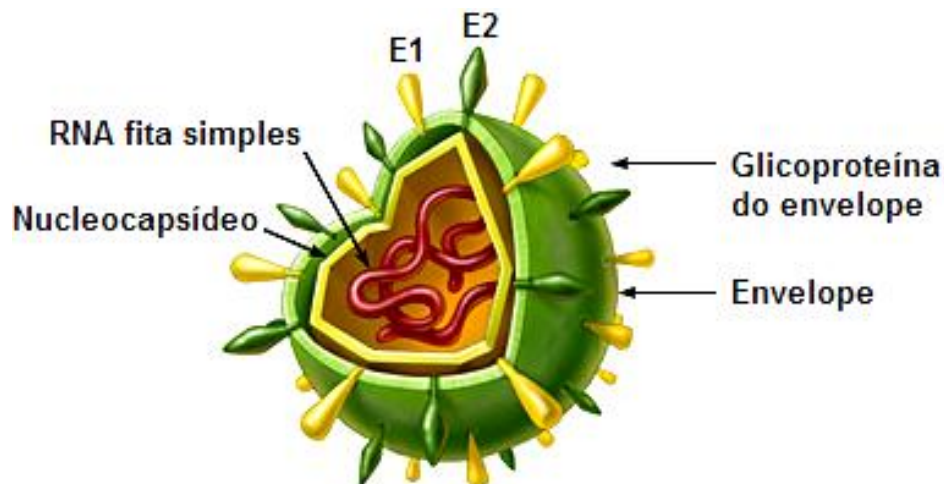


Figura 1: Modelo Estrutural do HCV
Fonte: <http://www.hopkins-gi.org> (Adaptado)

3.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HCV

O genoma do HCV contém uma molécula de RNA em fita simples de polaridade positiva medindo 9,7 kilobases (kb) de comprimento (BALSANO , ALISE, 2007; STRAUSS, 2001).

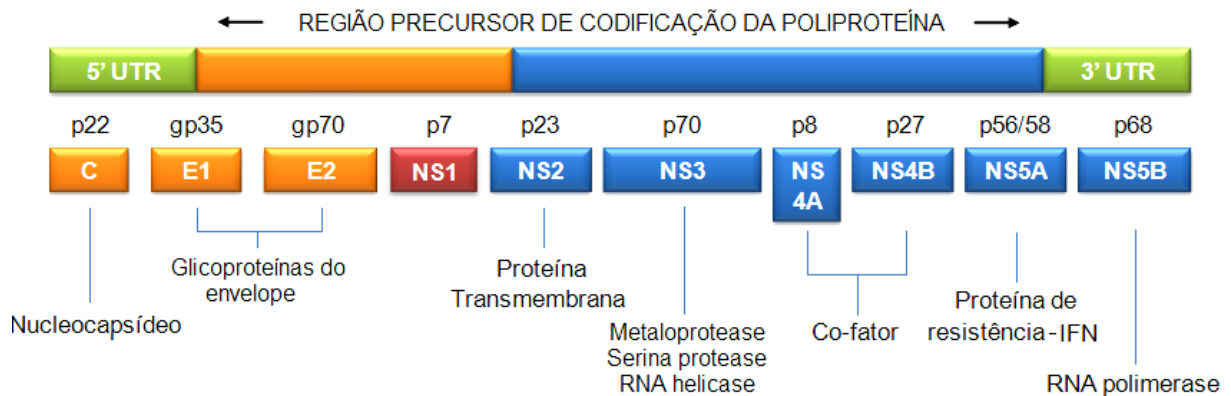


Figura 2: Estrutura Genômica do HCV
Fonte: ANZOLA , BURGOS, 2003 (Adaptado)

Como observado na figura 2 acima, o RNA viral possui duas regiões não-codificadoras de proteínas (NCR) nas extremidades terminais 5' e 3', e uma matriz de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 aminoácidos, que é clivada por proteases virais e peptidases das células do hospedeiro em proteínas estruturais (C, E1 e E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) responsáveis pelo processo de replicação viral (BALSANO, ALISE, 2007; BURLONE, BUDKWOSKA, 2009).

A primeira proteína estrutural codificada é chamada de proteína do C, com 21 kDa que forma o nucleocapsídeo viral. Estudos sugerem que se trata de uma proteína multifuncional e essencial para a replicação viral e patogênese. Além disso, é utilizada em ensaios sorológicos (anti-core), sendo altamente prevalente nos indivíduos infectados pelo HCV (BALSANO, ALISI, 2007; SUZUKI et al, 2007; TELLINGHUISEN et al, 2007). Duas glicoproteínas, E1 e E2, são consideradas componentes importantes do envelope viral, sendo liberadas da poliproteína precursora por peptidases sinais do retículo endoplasmático. E1 pesa

aproximadamente 33 a 35 kDa podendo estar envolvida no processo de encapsulamento do vírus, enquanto que E2, pesando entre 70 a 72 kDa, medeia a entrada do vírus na célula hospedeira (BALSANO, ALISI, 2007). Estudos evidenciam que o heterodímero E1-E2 está envolvido na entrada do vírus, já que a expressão de E1 ou E2 separadamente não resulta em infecção (BURLONE, BUDKWOSKA, 2009).

Peptidases sinais do hospedeiro também são responsáveis pela biogênese da p7, uma pequena proteína de membrana, cujo papel preciso no ciclo viral não está bem definido (BALSANO, ALISI, 2007). Provavelmente a p7 está envolvida na formação de um canal iônico importante para a maturação e liberação da partícula viral (BALSANO, ALISI, 2007; SUZUKI et al, 2007; TELLINGHUISEN et al, 2007).

As proteínas não estruturais inclui as auto-proteases NS2/3, a serino-protease NS3, de 68 kDa, o polipeptídeo NS4A, medindo 6 kDa, as proteínas NS4B, que mede 26 kDa, a NS5A, de aproximadamente 56 a 58 kDa, e a RNA polimerase RNA-dependente NS5B, medindo 65 kDa (BALSANO, ALISI, 2007). As proteínas intracelulares NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B são responsáveis pela replicação viral e pelo processamento da poliproteína, sendo que NS2, NS3 e NS5A desempenham papéis diretamente relacionados à replicação viral. Embora não elucidados completamente, alguns estudos sugerem que o complexo NS4A/NS3 e a NS5A contribua para a habilidade do HCV de evadir da resposta imunológica, e que a NS5B codifica a RNA polimerase viral, responsável pela replicação do genoma do HCV (SUZUKI et al, 2007; TELLINGHUISEN et al, 2007).

A replicação viral é extremamente elevada estimando-se que mais de dez trilhões de partículas virais sejam produzidas a cada dia, mesmo na fase crônica da infecção (LAUER, WALKER, 2001; STRAUSS et al., 2001). Variantes adicionais do HCV de um mesmo genótipo e subtipo, conhecidas como quasispecies, desenvolvem-se nos indivíduos infectados como resultado da elevada taxa de erro da RNA polimerase RNA-dependente (RYCHOLWSKA e SZEWCYK, 2007). Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações (LAUER, WALKER, 2001; STRAUSS et al., 2001).

A análise filogenética das seqüências genômicas do HCV permitiu a caracterização de seis clades filogeneticamente distintas (genótipos) de 1 a 6, subdividida em mais de 70 subtipos (1a, 1b, 1c...) (ELASIFER et al., 2010; PERONE et al, 2008; ZARIFE et al, 2006).

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO HCV

Aproximadamente 3% da população (170 milhões de pessoas) sofrem de hepatite C crônica. O HCV é o principal agente etiológico da inflamação hepática crônica, podendo levar a cirrose e ao HCC (RYCHOLWSKA, SZEWCYK, 2007).

Está bem estabelecido que 70% a 90% das pessoas infectadas não eliminam o vírus durante a fase aguda da doença, tornando-se portadores crônicos. A razão para que o HCV leve a essas condições não está bem esclarecido (MCGUINNESS et al., 2000; TOMANOVIC et al., 2009; RYCHOLWSKA, SZEWCYK, 2007). Em 15% dos casos na infecção pelo HCV há hepatite aguda com icterícia (pele e olhos amarelos), febre, dores abdominais, mal estar, diarreia e fadiga. Podendo seguir, após alguns meses, a resolução e cura completa. Tais sintomas ocorrem devido à destruição eficiente e rápida dos hepatócitos infectados, pelo sistema imunológico, sendo esta a ação que permite a cura. (BEZERRA et al, 2007). Contudo, na maioria dos casos, cerca de 80%, a hepatite C aguda é assintomática com 20% dos casos crônicos desenvolvendo a cirrose e, 25% destes, evoluindo para o câncer hepático e a doença hepática fatal (RYCHOLWSKA, SZEWCYK, 2007). A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, que varia desde formas assintomáticas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa (LAUER, WALKER, 2001; STRAUSS et al., 2001). Alguns pacientes com hepatite C crônica irão desenvolver cirrose hepática em um curto período de tempo, casos denominados como fibrose acelerada, enquanto que outros terão uma baixa progressão da doença, chamados de fibrose leve, e o restante enquadrados em uma categoria denominada de “fibrose intermediária” (TOMANOVIC et al., 2009).

Estudos demonstram que o HCC desenvolve-se em 1% a 4% dos pacientes infectados nos primeiros cinco anos após o aparecimento da cirrose, mas a cirrose pode ocorrer em uma faixa de até 10 a 50 anos pós-infecção. Diversos estudos relatam que fatores do hospedeiro refletem no desenvolvimento da fibrose levando ao aparecimento do HCC (AHMAD et al., 2011).

Uma das notáveis características do HCV é sua habilidade em evadir do sistema imunológico do hospedeiro infectado (VASCONCELOS et al., 2006). Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV ainda não foram elucidados, mas a existência de quasiespecies e a grande capacidade mutagênica

do vírus propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro durante a infecção pelo HCV (LAUER , WALKER, 2001; STRAUSS et al., 2001).

Como na maioria das vezes as infecções, tanto agudas quanto crônicas, pelo HCV são assintomáticas, é possível sua detecção apenas pela investigação da presença de anticorpos específicos (VASCONCELOS et al., 2006).

3.4 ASPECTOS PATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HCV

O principal fator que leva à grande importância da hepatite C é a sua alta cronicidade (VASCONCELOS et al., 2006).

Na maioria dos infectados pelo HCV, a viremia é persistente em 85% a 90% dos casos e acompanhada de graus variáveis de inflamação hepática e fibrose (LAUER, WALKER, 2001; VASCONCELOS et al, 2006). Com persistência da viremia, a progressão do dano hepático pode caracterizar estágios de fibrose (inflamação e morte de hepatócitos) (BRASIL, 2008; GONÇALVES et al, 2008). Nos pacientes infectados pelo HCV, a biópsia hepática é considerada essencial para a avaliação do estágio de fibrose hepática. Entretanto, embora seja considerado padrão ouro para a avaliação da fibrose hepática na infecção crônica pelo HCV, o procedimento é invasivo, caro e inadequado para alguns pacientes, podendo estes vir a ter efeitos colaterais graves, como dor (0,06% a 22%) ou até morte (0,0088% a 0,3%) (AHMAD et al., 2011; MUMMADI et al., 2010).

A resposta relativamente fraca de linfócitos T citotóxicos em pacientes infectados com HCV crônico parece ser insuficiente para conter a evolução do vírus, mas suficiente para causar danos colaterais no fígado a partir de citocinas inflamatórias (LAUER, WALKER, 2001). 20% a 30% dos portadores de hepatite C crônica podem evoluir para formas histológicas graves ou cirrose, onde a estrutura hepática encontra-se comprometida. Estes pacientes têm um risco de 1% a 4% ao ano de desenvolver câncer de fígado (BRASIL, 2008; GONÇALVES et al, 2008). Estudos clínicos e epidemiológicos têm sugerido uma forte associação entre inflamações locais crônicas e certos tipos de cânceres (SERUGA et al., 2008).

A presença de linfócitos no parênquima hepático tem sido interpretada como evidência de dano imunologicamente mediado (LAUER, WALKER, 2001). Proteínas virais parecem modular a apoptose e esteatose levando a ativação de células

hepáticas estreladas (HSCs), fibrose e HCC. HSCs ativadas liberam partículas lipídicas armazenadas no citoplasma que proliferam e ganham volume microfilamentosos que consistem principalmente de α -actina de músculo liso (α -SMA), sendo considerado um marcador confiável de atividade das HSCs (TOMANOVIC et al., 2009). Embora HSCs ativadas sejam imunorreativas a diversos anticorpos, existe uma correlação positiva entre a atividade destas células com atividade necroinflamatória e/ou estágios de fibrose hepática (TOMANOVIC et al., 2009).

3.5 ASPECTOS PRÓ-ONCOGÊNICOS DO HCV

Oncogenicidade é a capacidade de induzir ou formar um tumor. A hipótese de que alguns cânceres podem ser causados por microorganismos, tais como certos vírus, tem mais de cem anos. Vírus oncogênicos causam câncer por induzirem mudanças ao afetarem os processos de controle da proliferação celular e apoptose. Além disso, sabe-se que diferentes proteínas virais são capazes de interagir com moléculas de sinalização e regulação celular influenciando-a, o que eleva os riscos de desenvolvimento oncológico (BALSAMO, ALISI, 2007).

Em condições normais, a resposta inflamatória é regulada por mecanismos de citocinas anti-inflamatórias, tais como a interleucina 10 (IL-10), fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e produção adrenal de cortisol. Entretanto, é certo o papel fundamental de algumas citocinas no desenvolvimento e na patogênese de diversas doenças inflamatórias (KOPF et al., 2010). Estudos clínicos e epidemiológicos sugerem uma forte associação entre a inflamação local crônica e alguns tipos de cânceres (SERUGA et al., 2008).

O HCV é um vírus de RNA sem um DNA intermediário de replicação, incapaz de integrar o seu genoma. Tais aspectos biológicos do HCV indicariam uma inabilidade na indução da transformação celular, mas numerosas evidências experimentais e epidemiológicas evidenciam a conexão do HCV ao HCC. Isto sugere que o HCV tem um papel indireto, apresentado pela inflamação crônica, e direto, alcançado pela modulação da expressão gênica e sinalização intracelular (ativação de fatores de transcrição e ciclo celular), na patogênese do HCC (BALSAMO, ALISI, 2007).

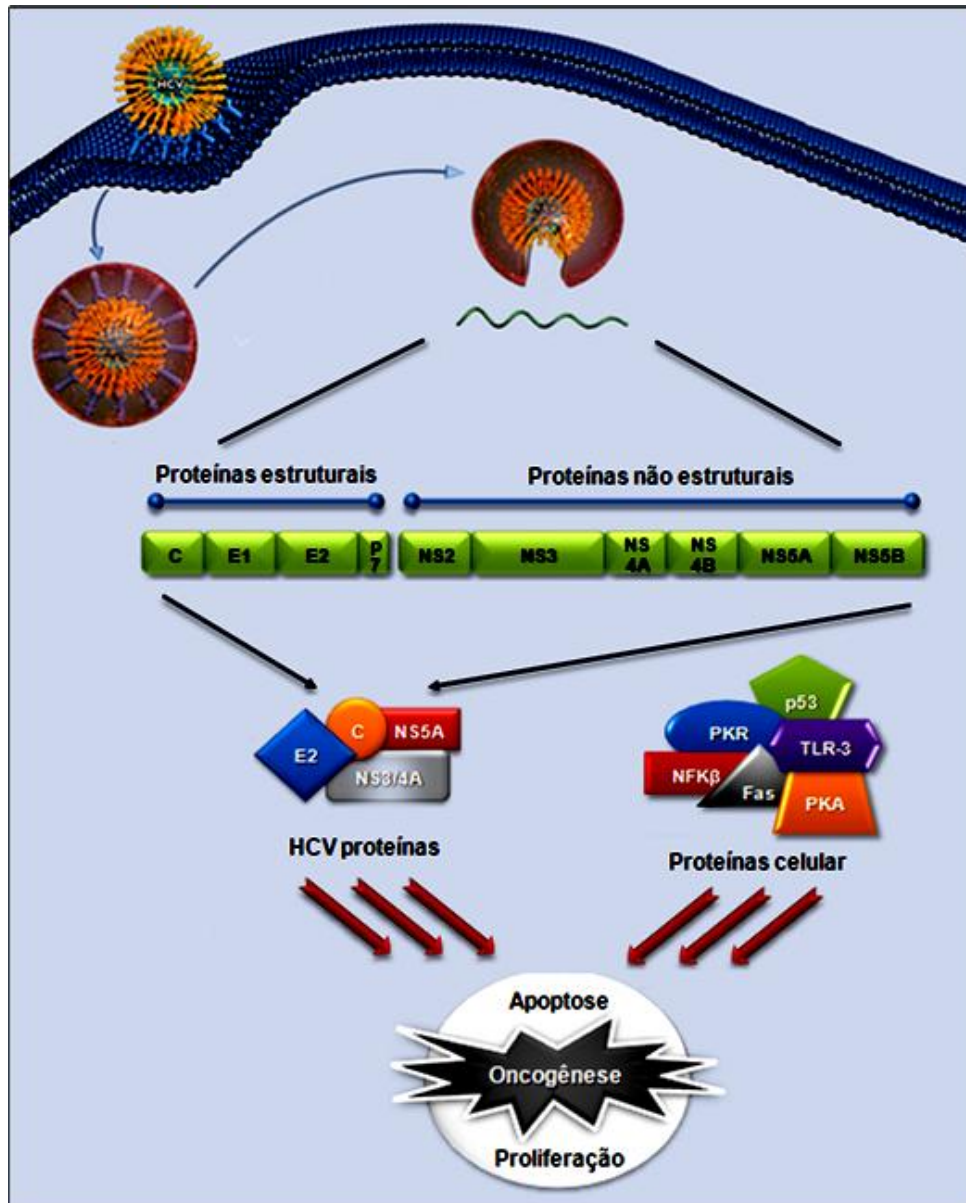


Figura 3: Efeitos na homeostase da célula hospedeira durante a infecção pelo HCV
 Fonte: BALSAMO, ALISI, 2007 (Adaptado)

Um dos aspectos do processo pro-oncogênico presentes na infecção pelo HCV é o impacto gerado diante da proliferação celular. Estudos recentes revelaram nos últimos anos que algumas das proteínas do HCV podem interagir diretamente e indiretamente com proteínas envolvidas no controle do ciclo celular. De fato, como pode ser observado na figura acima (figura 3), proteínas do C, E2, NS3 e NS5A modificam o ciclo celular ao ativarem a expressão e/ou a atividade de diferentes proteínas regulatórias (BALSAMO, ALISI, 2007).

A progressão em cada fase celular é controlada por um amplo espectro de moléculas regulatórias, incluindo ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (cdks), cdks inibitórias e sinalizadores intracelulares, tais como proteínas quinases de atividade mitogênica (MAPKs). A proteína do C interfere nas vias de Raf-MAPK ativando inúmeros fatores de transcrição, incluindo o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) e a proteína ativadora 1 (AP-1). Além disso, C também afeta o ciclo celular por desregular a atividade de pRb (proteína do retinoblastoma) e do complexo de ciclina-cdk. NS3 talvez desempenhe um papel central na transformação celular ao ativar oncogênes e moléculas de tradução em células infectadas pelo HCV, em particular a Raf-MAPK e a proteína Jun N-terminal quinase (JNK), vias de sinalização intimamente associadas ao crescimento e a proliferação celular. Por fim, NS5A supostamente interage com fatores de transcrição, tais como NF- $\kappa\beta$ e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), envolvidos na proliferação celular (BALSAMO, ALISI, 2007).

Em relação à alteração da resposta apoptótica, estudos *in vitro* demonstraram que a proteína do C tem efeitos opostos (inibição - ativação) tanto na proteína de morte celular (Fas) quanto TNF. Além disso, C também modula a atividade da expressão de uma variedade de proteínas envolvidas na apoptose (p53, p63, p73 e suas isoformas) (BALSAMO, ALISI, 2007). Estudos têm demonstrado que a proteína NS3 também pode prejudicar a resposta apoptótica especificamente pela repressão da atividade promotora da p21 (KWUN et al., 2001). Enquanto que NS5A interfere diretamente na ligação da p53 ao DNA, reprimindo a atividade transcricional de promotores, tais como p21 (BALSAMO, ALISI, 2007).

3.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA INFECÇÃO PELO HCV

A resposta imunológica às infecções virais é determinada por uma complexa interação entre o agente viral, tais como o genótipo viral, a carga viral e o aparecimento de quasispécies, e os fatores do hospedeiro, os quais estão incluídos a apresentação do antígeno, a resposta imunológica mediada por células e a resposta humoral (MCGUINNESS et al., 2000; THIRUMALA, 2010).

O sistema imunológico, inicialmente, tenta erradicar o vírus, mas o contexto da infecção crônica provavelmente promove dano e fibrose hepática através da toxicidade celular direta e pela liberação de citocinas inflamatórias (TOMANOVIC et

al., 2009). Evidências experimentais sugerem que a resposta imunológica para o HCV é sítio-específico. Estudos laboratoriais têm demonstrado uma significativa regulação intra-hepática elevada de citocinas associadas à resposta Th1 (IL-2 e IFN- γ) e uma baixa regulação de citocinas relacionadas à resposta Th2 (IL-10/23). Uma resposta Th1 persistente pode levar ao acúmulo gradual de dano hepático induzido primariamente por linfócitos T citotóxicos (LTCs), células NK e macrófagos (MCGUINNESS et al., 2000).

A elevada expressão de IFN- γ presente no fígado infectado pelo HCV mostra uma atividade de infiltrados monocitários e macrófagos residentes (células de Kupffer). Estes macrófagos expressam uma gama de citocinas, tais como fator de necrose tumoral α (TNF α), TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e certas quimiocinas, como as proteínas inflamatórias macrofágicas (MIP), que intensificam a continuidade de uma resposta hepática Th1 e incentivam ainda mais a migração de macrófagos/monócitos e células T para o foco inflamatório. Além disso, macrófagos intra-hepáticos ativados podem assumir um perfil citotóxico destruindo os hepatócitos infectados (MCGUINNESS et al., 2000).

Células imunológicas inatas expressam um conjunto de sensores para a detecção da infecção viral citosólica. O reconhecimento por estes sensores induz a produção de interferons do tipo I e à montagem de complexos inflamassomos que ativam a caspase-1, levando à produção de IL-1 β e IL-18 (THIRUMALA, 2010). A identificação e caracterização destes inflamassomos, um complexo multiproteico que recruta caspases inflamatórias e disparam sua ativação, proporcionou a compreensão dos mecanismos que controlam estes processos. A caspase-1, também conhecida como enzima precursora da IL-1 β , assim como a caspase-12, são dois componentes importantes na sinalização inflamatória (THIRUMALA et al., 2010; WANG et al., 2010).

O envolvimento do receptor de ácido retinóico gene induzível (RIG-I), um receptor de reconhecimento padrão (PRP) que detecta componentes microbiológicos conservados por certos vírus, conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), leva a ativação da caspase-1 (THIRUMALA et al., 2010; WANG et al., 2010). A caspase-1 ativada cliva as formas precursoras de IL-1 β , a pro-IL-1 β , e IL-18 em produtos biologicamente ativos, tendo um importante papel na imunidade inflamatória, na infecção e nos processos auto-imunes (KOPF et al., 2010; THIRUMALA et al., 2010; WANG et al., 2010). A maior

atividade da caspase 1 e superprodução da IL-1 β foram associadas a certos grupos de desordens inflamatórias (KOPF et al., 2010). A ativação intracelular da IL-18 pela caspase-1 induz a secreção de INF- γ e TNF α , além de elevar a citotoxicidade de células NK. A ativação da IL-18 também leva a produção de NOSi (óxido nítrico induzível), outro produto gênico pró-inflamatório que eleva a atividade inflamatória (KHRIPKO et al., 2008; MANOHAR et al., 2009).

Diferente da IL-1 β , que participa de processos sistêmicos e locais à infecção e lesão, induzindo febre e ativação linfocítica, a IL-18 não tem atividade pirogênica e suas principais funções parecem estar associadas à produção de IFN- γ por células T ativadas e NK, contribuindo para a resposta Th1 (THIRUMALA et al., 2010).

3.7 IL-18

A IL-18, também chamada de IL-1F4, que originalmente foi denominada de fator de indução de IFN- γ , é uma citocina obrigatória para a produção de IFN- γ tendo um papel chave na indução da resposta Th1 (MANOHAR et al., 2009; SIMS e SMITH, 2010). Ela faz parte da superfamília da IL-1 composta por 11 membros, sendo estes a IL-1 α , IL-1 β , receptor antagonista da IL-1 (IL-1Ra), IL-18, IL-33 e IL-1F5 a IL-1F10, que surgiram provavelmente a partir da duplicação de um gene ancestral comum, contendo uma estrutura gênica altamente conservada, incluindo o posicionamento idêntico de certos *introns* e a preservação das seqüências de aminoácidos (SIMS, SMITH, 2010).

A IL-18 deriva de um precursor biologicamente inativo – pró-IL-18 – expresso em sítios de inflamação crônica, doenças auto-imune, em uma variedade de cânceres e no contexto de inúmeras doenças infecciosas, produzido durante a resposta imunológica aguda e sintetizado por diferentes tipos celulares das linhagens hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer, queratinócitos, osteoblastos, células do cortex adrenal, células do epitélio intestinal, células da microglia e fibroblastos sinoviais (GRACIE et al., 2003; MORALES et al., 2010; SHARMA et al., 2008; SIMS, SMITH, 2010).

Pouco se conhece a respeito dos detalhes da regulação do gene da IL-18, a natureza dos estímulos para a sua expressão permanecem sob investigação. Contudo, sem a maquinaria enzimática necessária para o processamento da IL-18, a

expressão do RNAm da proteína pró-IL-18 não será necessariamente capaz de contribuir para sua atividade biológica (GRACIE et al., 2003).

A IL-18 possui pró-domínios amina-terminais que requerem a clivagem por um conjunto de proteínas conhecidas como inflamossomos, responsáveis por gerarem as formas biologicamente ativas a serem secretadas (MANOHAR et al., 2009; SIMS, SMITH, 2010). A IL-18, assim como a IL-1 β com a qual compartilha uma homologia estrutural, é produzida como um precursor inativo de 24 kDa (pró-IL-18), com ausência de um peptídeo sinal, que é clivada pela enzima endoprotease conversora de IL-1 β (caspase-1) gerando um produto biologicamente ativo de 18 kDa. Entretanto, a clivagem da pró-IL-18 não é exclusiva da caspase-1, estudos recentes tem indicado que a proteinase-3 também pode gerar atividade biológica ao clivar a pró-IL-18. Em contraste, a clivagem da pró-IL-18 ou da IL-18 madura pela caspase-3 resulta em peptídeos biologicamente inativos (GRACIE et al., 2003).

Mecanismos moleculares para a produção da IL-18 são mediados por receptores contendo domínios extracelulares de imunoglobulinas e um receptor na porção citoplasmática (IL-18R) (GRACIE et al., 2003; MANOHAR et al., 2009; SIMS, SMITH, 2010). IL-18R, semelhante a IL-1R, é expressa em uma variedade de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células NK e do endotélio muscular. IL-18R é um complexo heterodímero que possui duas subunidades, uma cadeia α (IL-18R α) responsável pela ligação extracelular da IL-18, e outra cadeia β (AcPL) não ligante (GRACIE et al., 2003; SIMS, SMITH, 2010).

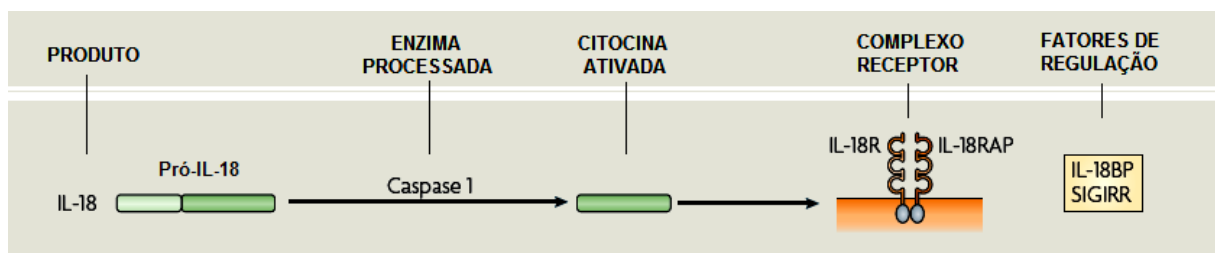


Figura 4: IL-18; processamento, receptores e regulação.

Legenda: R, receptor; AP, proteína acessório; IL-18BP, proteína de ligação da IL-18; SIGIRR, molécula receptor simples de imunoglobulina associada ao receptor da IL-1

Fonte: SIMS, SMITH, 2010 (Adaptado)

Como está representado na figura acima (figura 4), pró-IL-18 é expressa constitutivamente, mas necessita de um tratamento pela caspase-1 para ser ativada (SIMS, SMITH, 2010). A resposta é iniciada após a vinculação inicial da IL-18 com a

IL-18R, este complexo recruta a proteína acessória IL-18R (IL-18RAP) para a conseqüente interação com a subunidade secundária. Ocorre a formação de um complexo de sinalização de alta afinidade envolvido no recrutamento e ativação de proteínas de diferenciação mielóide primária-88 (MyD88) e quinase associada a IL-1R (IRAK), em conseqüente, há uma resposta biológica envolvendo a ativação de NF- κ B e MAPKs (GRACIE et al., 2003; MANOHAR et al., 2009; SIMS, SMITH, 2010). Esta ativação leva a síntese de genes pró-inflamatórios, tais como NOSi e INF- γ (MANOHAR et al., 2009).

A IL-18 possui papel crítico na regulação de moléculas imunológicas, tais como receptores tipo Toledo (Toll-Like) e na indução da expressão das quimiocinas IL-8, IL-2, INF- γ e células T. (GRACIE et al., 2003; SIMS, SMITH, 2010; KOPF ET al., 2010; MANOHAR et al., 2009).

A atividade da IL-18 é regulada por proteínas solúveis de ligação da IL-18 (IL-18BP). Quando ligada à IL-18BP, a IL-18 não poderá interagir com seus receptores celulares (IL-18R). IL-18BP circulante costuma ser vinte vezes maior do que os níveis de IL-18, no entanto, sob condições inflamatórias estes níveis poderão ser excedidos (SIMS, SMITH, 2010).

A IL-18 é um importante regulador da resposta imunológica celular e humoral, envolvida na indução Th1, assim como, na resposta imunológica do tipo Th2, dependendo do contexto do meio imunológico (AN et al., 2008; MANOHAR et al., 2009; MORALES et al., 2010). O complexo IL-18R pode ser regulado pelas células T (Th1) e células B (GRACIE et al., 2003). Na presença da IL-12 a IL-18 estimula a produção, essencialmente, de IFN γ , promovendo uma resposta imunológica mediada por Th1, enquanto que na ausência de IL-12, IL-18 estimula uma resposta tipo Th2 (AN et al., 2008; MANOHAR et al., 2009; MORALES et al., 2010).

A IL-18 está envolvida na patogenia de diversas doenças, incluindo a diabetes tipo I, artrite reumatóide, doença de Crohn e cirrose hepática (KHRIPKO et al., 2008). Além das infecções virais e de estar presente em outros processos patológicos, como em processos de hiperplasia, na atividade antitumoral, durante a asma tópica em fase aguda e na enterocolite necrosante (MORALES et al., 2010; KHRIPKO et al., 2008).

O gene da IL-18 está localizado no cromossomo 11q22.2-22.3 e vários polimorfismos na região promotora do gene da IL-18 tem sido associados a diferentes doenças inflamatórias e respostas auto-imunes (MORALES et al., 2010).

3.8 IL-18 E SUA RELAÇÃO NA INFECÇÃO PELO HCV

Durante a infecção pelo HCV e na cirrose hepática, há um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, principalmente da IL-18 (SHARMA et al., 2008). A IL-18 é um importante fator para o desenvolvimento e a inflamação na doença hepática (MANOHAR et al., 2009).

Há uma estreita relação entre a elevação dos níveis da IL-18 e a progressão da doença pelo HCV. Estudos demonstram um aumento da circulação plasmática da IL-18 e a gravidade da infecção pelo HCV. Além disso, a IL-18 está relacionada com a insuficiência hepática na hepatite C crônica, com atividade necroinflamatória e de fibrose, nestes pacientes (SHARMA et al., 2008). Foi demonstrado que elevados níveis de receptores para IL-18 estão associados à baixa resposta terapêutica com IFN em pacientes com HCV (ASAKAWA et al.; 2006). Tem-se observado danos hepáticos letais em modelos animais na indução terapêutica da IL-18, sugerindo que a IL-18 é um importante fator para o desenvolvimento da inflamação e da doença hepática (MANOHAR et al., 2009). Níveis elevados da IL-18 no plasma e da IL-18BP tem sido demonstrado em estudos recentes nos indivíduos com doença hepática crônica em comparação com pacientes controles saudáveis (KASER et al., 2002; LUDWICZEK et al., 2002). Estudo realizado por SHARMA e colaboradores, em 2008, observou que os níveis da IL-18 em amostras sorológicas de 50 pacientes em diferentes estágios da infecção pelo HCV, foram significativamente maiores quando comparadas a pacientes controles saudáveis (865.4 ± 283.4 pg/ml – em pacientes com HCV crônico, 1315.5 ± 714.1 pg/ml – em pacientes cirróticos e 297.6 ± 88.6 pg/ml – grupo controle; $p < 0.005$). Os níveis da IL-18 quando comparados à infecção pelos genótipos 1 e 3 do HCV, não demonstraram diferenças significantes (847.1 ± 382.7 pg/ml e 873.2 ± 246.6 pg/ml).

A IL-18 pode modular diretamente a viabilidade celular durante a replicação viral, favorecendo a eliminação e a disseminação de partículas virais. Isso pode ser atribuído ao aumento da apoptose mediada por FasL ou pela morte celular envolvendo células T e hepatócitos infectados (SHARMA et al., 2008).

INF- α exerce uma ação anti-inflamatória ao induzir IL-18BP. O aumento da produção de IL-18 é neutralizado pela IL-18BP na infecção crônica pelo HCV e esta neutralização é crucial para a regulação da inflamação e o desenvolvimento de fibrose (KASER et al., 2002; MANOHAR et al., 2009).

3.9 POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 E SUA RELAÇÃO NA INFECÇÃO PELO HCV

Existe um sinal, a partir de diversos estudos genéticos, demonstrando que polimorfismo em genes de citocinas, relaciona-se à suscetibilidade e o curso do câncer (SERUGA et al., 2008). Estudos têm demonstrado que polimorfismos do gene da IL-18 pode estar associado à patogênia na infecção pelo HCV (SHARMA et al., 2008).

Foram encontrados três SNP em genes promotores da IL-18, nas posições -656 G/T, -607 C/A e -137 G/C. Dois destes, -607 C/A e -137 G/C, estão localizados em sítios de ligação para a transcrição de fatores CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc) e ao fator nuclear H4TF-1. Polimorfismos nestes dois sítios podem influenciar a expressão da IL-18 e alterar a expressão de citocinas (KHRIPKO et al., 2008). Outro polimorfismo, na posição -1.297 T/C da IL-18, também foi observado em pacientes com presença de células gigantes durante vasculite de grande e médio porte (MORALES et al., 2010).

Diferenças significantes na distribuição alélica da IL-18 variam de acordo com a população e com a severidade da doença (MONOHAR et al., 2009). Em um estudo realizado por Monohar et. al. (2009) a frequência alélica de A/A na posição -607 foi maior em pacientes com doença hepática leve do que em relação aos pacientes com doença hepática grave (38,6% vs 21%, $p = 0,005$; OR = 0,424, IC = 0,233-0,773; $R^2 = 0,631$) e aqueles com fibrose comprovada (38,7% vs 16,7%, $p = 0,008$; OR = 0.282, IC = 0,134-0,596; $R^2 = 0,434$). Concluindo que polimorfismo na posição -607 da IL-18 com o alelo A/A está associado a doença hepática moderada em pacientes com HCV. Um estudo realizado em populações americanas demonstrou que o alelo A na posição -607 e o alelo C na posição -137, e seus haplótipos, favorecem a depuração do HCV, destacando um papel crítico da IL-18 na resolução da infecção pelo HCV. Estes dois alelos estão associados a uma menor expressão dos níveis da IL-18, evidenciando que níveis elevados de IL-18 promove a persistência da infecção pelo HCV (AN et al., 2008).

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação do polimorfismo na região promotora dos genes da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A, na infecção pelo HCV.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar, através da RT-PCR, a presença do RNA viral nos pacientes infectados pelo HCV.

Comparar as frequências alélicas do polimorfismo na região promotora dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607C/A), entre aqueles que apresentaram PCR positivo e PCR indetectável para a detecção do HCV.

Identificar, através da RFLP-PCR, os diferentes genótipos do HCV nos pacientes com PCR positivo para este vírus.

Relacionar as frequências alélicas do polimorfismo na região promotora dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607C/A), quanto aos diferentes genótipos do HCV encontrados nos pacientes infectados por este vírus.

Identificar as variantes alélicas dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A) nos pacientes infectados pelo HCV e no grupo controle.

Relacionar as frequências alélicas do polimorfismo na região promotora dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607C/A) entre os pacientes e grupo controle.

Avaliar as frequências alélicas do polimorfismo na região promotora dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607C/A) entre os gêneros dos pacientes infectados pelo HCV.

5 METODOLOGIA

5.1 CASUÍSTICA

5.1.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo do tipo transversal analítico, no período de Agosto de 2011 a Fevereiro de 2012.

5.1.2 Caracterização da Amostra

Foram selecionados os pacientes procedentes do Hemocentro do Pará (HEMOPA), atendidos no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará (NMT-UFPA), pelo programa de hepatites virais, encaminhados ao Laboratório de Patologia Clínica do NMT-UFPA, para a realização de exames laboratoriais. Os pacientes com diagnóstico sorológico reagente para a detecção do HCV (anti-HCV), realizado pelo HEMOPA, foram convidados a fazerem parte do projeto e aqueles que aceitaram sua inclusão no estudo receberam orientações e esclarecimentos quanto aos procedimentos e objetivos do projeto, sendo-lhes apresentado o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Foi avaliado o histórico sorológico para a detecção de anti-HCV realizado por técnica de ELISA (Ensaio imuno-adsorvente de ligação à enzima), e selecionados aqueles com valores de corte maior ou igual a 1500.

O estudo incluiu 152 pacientes com sorologia reagente anti-HCV e 188 controles selecionados aleatoriamente no banco de dados dos pacientes do Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais do NMT-UFPA, que estavam de acordo às exigências determinadas nos critérios de inclusão e exclusão.

Dos 152 pacientes portadores do HCV que participaram deste estudo, 70% (106/152) eram do sexo masculino e 30% (46/152) do sexo feminino, com faixa etária entre 18 e 57 anos (média de 37,5 anos). O grupo controle foi constituído de 188 voluntários, não infectados pelo HCV, destes 64% (120/188) eram do sexo masculino e 36% (68/188) feminino, com média de idade de 36 anos.

5.1.3 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram selecionados pacientes da cidade de Belém, de ambos os sexos e maiores de idade com diagnóstico soro-reagente (ELISA) para a detecção de anti-HCV, não portadores de distúrbios neurológicos ou psicológicos.

O grupo controle foi constituído daqueles enquadrados em todas as exigências relatadas anteriormente, com a diferença de que não possuíssem histórico de diagnóstico de infecção pelo HCV.

Foram excluídos do estudo todos aqueles que não se enquadraram nos critérios descritos neste item.

5.1.4 Local do Estudo

O local de escolha para a realização deste estudo foi a cidade de Belém, capital do estado do Pará, localizada ao norte, tendo o título de “Cidade das Mangueiras”, sendo considerada a “Metrópole da Amazônia” por ser a maior concentração populacional do norte brasileiro com uma população de 1.393.399 habitantes (IBGE, 2011).

O NMT é uma unidade de integração da UFPA, localizada na cidade de Belém, destinada ao ensino de pós-graduação, pesquisa e extensão na área de Doenças Tropicais e demais temas de interesse amazônico. Nesta Instituição, desde 2002, é desenvolvido o programa de hepatites virais, para onde doadores de sangue com sorologia reagente na triagem do HEMOPA, são encaminhados. O programa visa atendimento ambulatorial e a realização de exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico e acompanhamento médico.

5.1.5 Aspectos Éticos da Pesquisa

Todos os participantes qualificados para a inclusão no projeto receberam orientações quanto à importância deste estudo, os objetivos, as finalidades e os procedimentos que seriam realizados durante a pesquisa, através de uma linguagem simples e de fácil entendimento, sendo solicitada sua autorização mediante assinatura do TCLE (anexo), de acordo com a Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

Foram tomadas medidas para a preservação e o anonimato da identidade de todos os participantes com a intenção de manter assegurada sua autonomia e integridade moral, para evitar qualquer situação de exposição, discriminação ou estigma que poderiam vir a sofrer. Além disso, nenhum tipo de dano moral ou físico foi causado a nenhum dos participantes, exceto aquele necessário para a obtenção da amostra biológica, realizado através de punção venosa por profissional habilitado.

O estudo teve como finalidade proporcionar um melhor entendimento a respeito da relação entre o polimorfismo na região promotora do gene da IL-18 e as conseqüências que este evento poderá causar nos pacientes infectados pelo HCV, já que pouco se sabe a respeito. Dessa forma, oferecer novos conhecimentos à comunidade científica e biomédica especializada sobre medidas preventivas, tratamentos e outras características associadas à infecção, tais como relação vírus-hospedeiro, resultados e acompanhamento clínico. Sem causar danos aos participantes ou qualquer tipo de situação nociva, seja ela física, psicológica ou moral.

Esse projeto possui parecer aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do NMT-UFPA (Nº 042/2011 CEP-NMT/UFPA) (Anexo).

5.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

5.2.1 Obtenção das Amostras Biológicas

Para a obtenção das amostras biológicas foram coletados aproximadamente 10 ml de sangue total, sem adição de anticoagulante, mediante punção venosa, para a realização das provas sorológicas, e aproximadamente 5 ml de sangue total armazenado em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para a realização da extração do material genético e procedimentos moleculares.

As amostras biológicas foram coletadas por profissional técnico habilitado.

5.2.2 Testes Sorológicos

As amostras dos pacientes com resultados soro-reagentes para a detecção do anti-HCV, diagnosticados a mais de seis meses, foram submetidas à nova avaliação por ELISA, utilizando-se o Kit ETI-AB-HCVK-4 – Diasorin, Itália (a seguir).

Em uma placa foi realizada a distribuição do diluente da amostra em todos os poços contendo amostras e controles. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, a placa foi submetida a cinco ciclos de lavagens para a retirada de anticorpos não adsorvidos e adicionado o conjugado enzimático diluído, sendo conduzida à nova incubação em estufa a 37°C, por mais 1 hora. A placa foi lavada novamente por mais cinco ciclos e em seguida, ao abrigo da luz, foi adicionado o cromógeno/substrato. Nova incubação foi realizada em temperatura ambiente por 30 minutos e após, acrescentada à reação a solução de paragem, para o término da reação. A leitura da placa, por absorbância, foi realizada logo em seguida e amostras com valores de absorbância acima do valor de corte foram consideradas reagentes enquanto que aquelas abaixo do valor de corte, como não reagentes (o valor de corte foi determinado pela adição de 0,500 à média das absorbâncias do controle negativo).

5.2.3 Extração do RNA do HCV para a Realização da RT-PCR

A etapa para a extração do material genético do HCV, em cada amostra, foi realizada de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (kit QIAmp viral RNA Quiagen – Alemanha).

Os produtos da extração foram devidamente identificados e acondicionados em freezer a uma temperatura de -20°C, sendo descongelados apenas para a realização da técnica da RT-PCR.

5.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Após extração do material genético do HCV, as amostras dos pacientes foram submetidas à detecção da presença do HCV-RNA, pela reação em cadeia da polimerase – RT.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através da técnica de RT-PCR qualitativa, adaptada pelo Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais do NMT-UFPA.

Para a 1ª PCR a reação utilizou a sequência 5'-GGCGACACTCCACCATRR-3', para o iniciador K10, e a sequência específica 5'-GGTGCACGGTCTACGAGACC-3', para o iniciador K11.

Para cada amostra foi utilizado 12µl do tampão, 1µl de cada iniciador (K10 e K11), 5µl de água ultrapura e 1µl da enzima *Taq*-polimerase (Invitrogen). O volume da solução de trabalho para cada amostra foi de 20µl, adicionado de 5µl do volume da amostra (produto da extração), obtendo-se um volume final de 25µl. Conforme demonstrado na tabela 1, abaixo.

Tabela 1: Protocolo da RT-PCR para a detecção do HCV.

Tampão	12µl
K10	1µl
K11	1µl
<i>Taq</i> -polimerase 5U/µl	1µl
Água pura	5µl
TOTAL	25µl (20µl + 5µl de RNA)

Após, todas as amostras foram conduzidas ao termociclador à temperatura inicial de desnaturação de 42°C por 45 minutos, seguida de 94°C por 2 minutos. Foram realizadas três etapas de 35 ciclos onde a temperatura inicial de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos, a de anelamento foi de 54°C por 30 segundos e a temperatura para a extensão foi de 72°C por 45 segundos, seguidas de uma etapa final a 72°C por 7 minutos e outra de 4°C por 10 minutos. De acordo com a tabela 2, abaixo.

Tabela 2: Protocolo de amplificação em termociclador da RT-PCR para o HCV.

42°C	45 minutos	
94°C	2 minutos	
94°C	30 segundos	
54°C	30 segundos	35 ciclos
72°C	45 segundos	
72°C	7 minutos	
4°C	10 minutos	

A visualização do produto da 1ª PCR ocorreu em gel de eletroforese a 1,5% de agarose (1,5g de agarose) contendo 100ml de tampão TBE diluído (1X) e 1,5µl de brometo de etídio, que migrou em cuba de eletroforese (100 de voltagem e 500 de amperagem) por uma hora.

As amostras positivas foram submetidas à 2ª PCR para a amplificação do cDNA (produto da 1ª PCR). As sequências específicas de cada iniciador foi 5'-ACCATRRATCACTCCCCTGT-3', para K15, e 5'-CAAGCACCCCTATCAGGCAGT-3', para K16. Para cada amostra foi utilizado 2,5µl do Tampão 10X, 4µl de dNTP, 1,5µl de MgCl₂ 50nM, 1µl para os iniciadores K15 e K16, 12,5µl de água ultrapura e 0,5µl da enzima *Taq-platinum* (Invitrogen). O volume da solução de trabalho por amostra foi de 23µl adicionado de 2µl do volume da amostra (produto da 1ª PCR). Obtendo-se um volume final de 25µl. Conforme a tabela abaixo (tabela 3).

Tabela 3: Protocolo da PCR para a detecção do HCV.

Tampão 10X	2,5µl
dNTP	4µl
MgCl ₂	1,5µl
K15	1µl
K16	1µl
<i>Taq-platino</i> 5U/µl	0,5µl
Água pura	12,5µl
TOTAL	25µl (23µl + 2µl do produto da 1ª PCR)

As amostras foram submetidas ao termociclador a 94°C por 4 minutos, seguida por três etapas de 35 ciclos, com temperatura de 94°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Seguida por uma etapa final a 72°C por 7 minutos e outra de 4°C por 10 minutos. Conforme tabela abaixo (tabela 4).

Tabela 4: Protocolo de amplificação em termociclador da PCR para o HCV.

94°C	4 minutos	
94°C	30 segundos	
55°C	45 segundos	35 ciclos
72°C	60 segundos	
72°C	7 minutos	
4°C	10 minutos	

O produto da 2ª PCR foi observado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (1,5g de agarose) para 100 mL de tampão TBE 1X e 1,5µl de brometo de etídio, que migrou em cuba de eletroforese, configurada em 100V e 500A, por uma hora.

5.2.5 Identificação dos genótipos do HCV por RFLP-PCR

Amostras positivas para a detecção do HCV por RT-PCR foram submetidas à identificação do genótipo viral por técnica de RFLP-PCR.

Para a genotipagem do HCV por RFLP-PCR foram utilizadas as enzimas de restrição AVA II e RSA I, através de técnica adaptada pelo Laboratório de Patologia Clínica das Doenças Tropicais do NMT-UFPA.

Cada amostra foi submetida às duas enzimas de restrição (AVA II e RSA I), sendo para a enzima AVA II, preparada uma solução de trabalho contendo 2µl do tampão C X30, 12,5µl de água ultrapura e 0,5µl da enzima de restrição AVA II. Para a enzima de restrição RSA I foi preparada uma solução de trabalho contendo 2µl de tampão *React 1 10X*, 11µl de água ultrapura e 2µl da enzima RSA I. O volume da solução de trabalho para cada amostra foi de 15µl adicionado de 5µl do volume da amostra (produto da 2ª PCR). De acordo com a tabela 5, abaixo.

Tabela 5: Protocolo da RFLP-PCR para a identificação dos genótipos do HCV.

AVA II	
Tampão C X30	2µl
Água pura	12,5µl
Enzima AVA II	0,5µl
RSA I	
Tampão <i>React 1</i>	2µl
Água pura	11,0µl
Enzima RSA I	2µl
TOTAL	20µl (15µl + 5µl do DNA)

As amostras foram submetidas à etapa de digestão em banho Maria a 37°C por quatro horas e em seguida preparado um gel de agarose a 3% (3g de agarose) para 100mL de tampão TBE 1X e 3µL de brometo de etídio. Todas as amostras foram conduzidas à migração em cuba de eletroforese (100V e 500A) por duas horas, para a identificação dos fragmentos de bandas apresentados à cada genótipo do HCV.

5.2.6 Extração do DNA para a detecção do Polimorfismo da IL-18

Todas as amostras de sangue total, colhida com anticoagulante (EDTA), dos pacientes e do grupo controle, foram submetidas à extração do material genético (DNA) conforme instruções descritas pelo fabricante (kit PureLink™ Genomic DNA Kits; Version A, 13 feb. 2007 – Invitrogen™), como a seguir.

Em 200µL de sangue foi adicionada 20µL de Proteinase K e 20µL de RNase A, sendo incubadas por dois minutos a temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 200µL do tampão e incubado a 55°C por 10 minutos, para a etapa de digestão. Após incubação, foi adicionado 200µL de álcool (96-100%) e 640µL do material lisado em tubos contendo colunas, e centrifugados a 10.000 RPM por um minuto. Após o descarte da coluna, foi adicionado 500µL do tampão de lavagem 1 e centrifugado a 10.000 RPM por um minuto. Após novo descarte da coluna, adicionou-se 500µL do tampão de lavagem 2 e centrifugou-se a amostra por mais três minutos a 14.000 RPM. Por fim, foi adicionado 100µL de tampão para eluição em cada microtubo e após repousar por um minuto a temperatura ambiente, foi centrifugado a 14.000 RPM por um minuto. Obtendo-se o material de extração.

Após a extração do material genético humano, uma alíquota foi submetida à PCR para análise do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18.

5.2.7 Identificação do Polimorfismo do gene da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A)

Após a etapa de extração conduzida para cada amostra dos pacientes e grupo controle, foi realizada a PCR para detecção do polimorfismo do gene da IL-18.

As amostras foram submetidas à biologia molecular pela técnica de PCR (adaptado de AN et al., 2008.), para a avaliação da SNP envolvendo a região promotora dos genes da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A), conforme descrição a seguir.

Para a posição -137 G/C, foi utilizada uma sequência específica do iniciador (direto e inverso) 5'-TGCTTCTAATGGACTAAGGAGGTG-3' e 5'-CTTCTTTTAATGTAATATCACTATTTTCATGAGA-3', sendo adicionada a uma solução de trabalho contendo um volume final de 23µl, consistindo de 2,2µl de tampão 10x (10x-PCR), 1µl de MgCl₂ 50nM, 0,6µl de dNTP, 0,36µl de cada iniciador, 0,18µl de *Taq*-polimerase (5U/µl), 13,8µl de água pura e 4,5µl de DNA. Como demonstrado na tabela 6 (abaixo).

Tabela 6: Protocolo da PCR para a posição -137 G/C. Adaptado de AN et al., 2008.

-137 (G/C)	
Tampão 10x (10xPCR – MgCl)	2,2µl
MgCl ₂ 50Nm	1µl
dNTP	0,6µl
Iniciadores (direto e inverso)	0,36µl
<i>Taq</i> -polimerase 5U/µl	0,18µl
Água pura	13,8µl
TOTAL	23µl (18,5µl + 4,5µl DNA)

As reações foram submetidas ao termociclador para a etapa de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 5 ciclos de 94°C por 20 segundos e 58°C por 1 minuto, e 30 ciclos de 94°C por 20 segundos e 58°C por 20 segundos. Por fim, foi realizada mais uma etapa de 72°C por 40 segundos. Conforme apresentado na tabela 7 (abaixo).

Tabela 7: Protocolo utilizado para amplificação em termociclador do SNP -137 G/C, na região promotora do gene da IL-18. Adaptado de AN et al., 2008.

-137 (G/C)		
94°C	2 minutos	
94°C	20 segundos	5 ciclos
58°C	1 minuto	
94°C	20 segundos	30 ciclos
58°C	20 segundos	
72°C	40 segundos	

Para a posição -607 C/A, foi utilizada uma sequência específica do iniciador (direto e inverso) 5'-TTCTGTTGCAGAAAGTGTA AAAATTTT-3' e 5'-AAAGGATAGTTGATACAGGCCATT-3', em uma solução de trabalho contendo 2,5µl de tampão 10x (10x-PCR), 1µl de MgCl₂ 50nM, 0,8µl de dNTP, 0,4µl de cada iniciador, 0,4µl de *Taq*-polimerase (5U/µl), 16µl de água pura e 4µl de DNA. Obtendo-se um volume final de pouco mais de 25µl. De acordo como está representado na tabela abaixo (tabela 8).

Tabela 8: Protocolo da PCR para a posição -607 C/A. Adaptado de AN et al., 2008.

-607 (C/A)	
Tampão 10x (10xPCR – MgCl)	2,5µl
MgCl ₂ 50nM	1µl
dNTP	0,8µl
Iniciadores (direto e inverso)	0,4µl
<i>Taq</i> -polimerase 5U/µl	0,4µl
Água pura	16µl
TOTAL	25,5µl (21,5µl + 4,0µl de DNA)

As reações foram conduzidas ao termociclador para a etapa de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 57°C por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Por fim, uma etapa de 72°C por 3 minutos. Conforme representado na tabela abaixo (tabela 9).

Tabela 9: Protocolo utilizado para amplificação em termociclador da SNP -607 C/A, da região promotora do gene da IL-8. Adaptado de AN et al., 2008.

-607 (C/A)		
94°C	3 minutos	
94°C	20 segundos	
57°C	40 segundos	35 ciclos
72°C	20 segundos	
72°C	3 minutos	

5.2.8 Identificação do Polimorfismo do gene da IL-18 por RFLP-PCR

A genotipagem do nucleotídeo único das posições -137 G/C e -607 C/A do gene da IL-18 foram determinadas pela RFLP-PCR utilizando-se as enzimas de restrição Bgl II e Dra I, para as posições -137 e -607, respectivamente.

Nesta etapa todas as amostras foram submetidas ao banho-maria a 37°C por quatro horas para o processo de digestão, e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 3% por duas horas e meia.

Para a determinação do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18 na posição -137, o produto da digestão obtido através da utilização da enzima de restrição Bgl II apresentou uma única banda de 141 pares de base (pb) para o alelo C e duas bandas, uma de 105pb e outra de 36pb para o alelo G, de acordo como demonstrado na figura acima (figura 5).

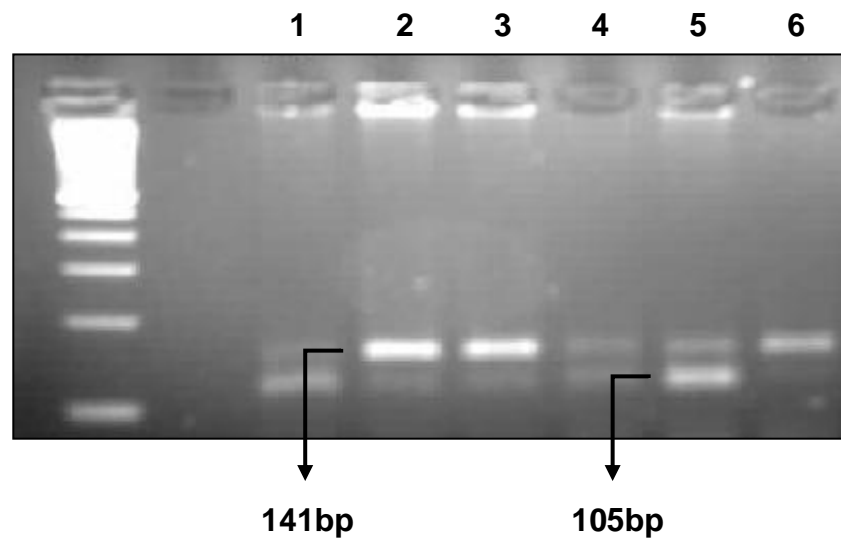


Figura 5: Imagem ilustrando o SNP na posição -137 em gel de eletroforese a 3% representando amostras tratadas com a enzima de restrição Bgl II (RFLP-PCR). Pode-se observar o perfil das bandas de 141pb, para o alelo C e 105pb, para o alelo G. As amostras dos poços 1, 2, 3, 4 e 5, apresentaram cortes de 141pb e 105pb, sugerindo perfil heterozigoto (C/G) à estes pacientes, enquanto que a amostra 6 apresentou corte único de 141pb, sugerindo se tratar de um caso homozigoto (C/C).

Para a determinação do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18 na posição -607, o produto da digestão obtido através da enzima de restrição Dra I, apresentou uma banda de 154pb para o alelo C e duas bandas para o alelo A, sendo uma de 125pb e outra de 28pb. De acordo com a figura abaixo (figura 6).

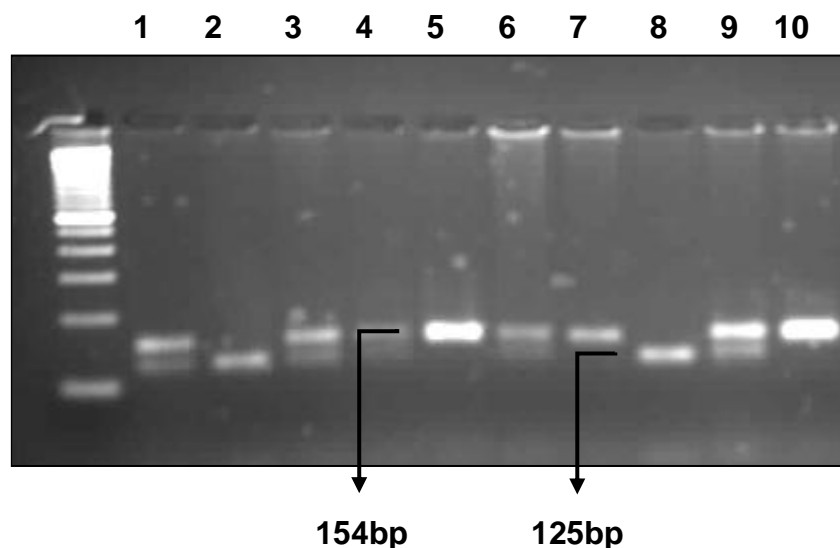


Figura 6: Foto de eletroforese em gel de agarose 3% representando o SNP na posição -607, em amostras tratadas com a enzima de restrição Dra I (RFLP-PCR). Pode-se observar os tamanhos das bandas, sendo de 154pb, para o alelo C, e 125pb, para o alelo A. Resultados obtendo o perfil heterozigoto (C/A) foram encontrados nas amostras 1, 3, 4, 6 e 9. As amostras 5, 7 e 10 apresentaram o perfil homozigoto com alelos C/C (154pb), e as amostras 2 e 8, também homozigotos, mas com alelos A/A (125pb).

5.2.10 Análise Estatística

Os dados da pesquisa foram desenvolvidos e armazenados em planilhas do Excel (Microsoft Office, 2010) e as análises estatísticas realizadas pelo software Biostat 5.0 (AYRES, 2005). Foi considerado um $p \leq 0.05$ para todos os testes realizados.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DA IL-18 EM COMPARAÇÃO À PCR DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HCV

Para avaliar a influência do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A) no curso da infecção pelo HCV, o grupo de pacientes foi dividido entre aqueles que apresentaram sorologia reagente para o HCV e PCR positivo, ou seja, pacientes cuja infecção é persistente, e aqueles que alcançaram o clareamento viral (pacientes com sorologia reagente para o HCV, mas com PCR indetectável).

Entre os pacientes com infecção persistente (87/152) em comparação àqueles que apresentaram o clareamento viral (65/152), avaliados para o polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, apenas os alelos C/C (35,6%) na posição -137, e C/A (55,2%) e A/A (12,6%), na posição -607, foram maiores nos pacientes com infecção persistente, enquanto que os demais alelos foram mais frequentes nos pacientes do grupo do clareamento viral.

Na comparação entre os dois grupos de pacientes, aqueles com infecção persistente e os que apresentaram o clareamento viral, não foi observada qualquer relação significativa entre eles (tabela 10).

Tabela 10: Polimorfismo da IL-18, relacionada entre os pacientes e os resultados apresentados na PCR.

Polimorfismo da IL-18	Pacientes N (%)	PCR		OR	95% IC	P
		Positivo	Indetectável			
-137 G/C	n = 152	n = 87	n = 65			
G/G	42 (27,6)	24 (27,6)	18 (27,7)	-	-	-
C/C	50 (32,9)	31 (35,6)	19 (29,2)	0.81	0.35 - 1.88	0.79
G/C	60 (39,5)	32 (36,8)	28 (43,1)	1.16	0.52 - 2.58	0.85
-607 C/A						
A/A	18 (11,8)	11 (12,6)	7 (10,8)	-	-	-
C/C	56 (36,8)	28 (32,2)	28 (43,1)	1.57	0.53 - 4.64	0.58
C/A	78 (51,4)	48 (55,2)	30 (46,1)	0.98	0.34 - 2.81	0.81

Legenda: **N** tamanho amostral; % percentagem; **OR** Odds Ratio; **IC** intervalo de correção; **p** p-valor.

6.2 AVALIAÇÃO DA INFLUENCIA DOS DIFERENTES GENÓTIPOS DO HCV AO POLIMORFISMO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18

Os genótipos do HCV foram determinados em todos os pacientes que apresentaram a PCR positiva, sendo comparados quanto ao polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A.

Dos 87 pacientes que apresentaram a PCR positiva para avaliação do RNA viral do HCV, o genótipo 1 foi predominantemente o mais encontrado, com 75,9% do total (66/87), seguido pelo genótipo 3 (14/87) e o genótipo 2 (7/87).

Quando comparada a frequência dos diferentes alelos dos polimorfismos da IL-18 e os genótipos encontrados do HCV, não foi observada relação significativa entre elas (tabela 11).

Tabela 11: Polimorfismo da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A), relacionada entre os pacientes e os genótipos encontrados do HCV.

Polimorfismo da IL-18	PCR + N (%)	RFLP – PCR			OR	95% IC	p
		G1	G2	G3			
-137 G/C	n = 87	n = 66	n = 7	n = 14			
G/G	24 (27,6)	20 (30,3)	3 (42,8)	1 (7,1)	-	-	-
C/C	31 (35,6)	21 (31,8)	2 (28,6)	8 (57,1)	2.38	0.64 - 8.83	0.31
G/C	32 (36,8)	25 (37,9)	2 (28,6)	5 (35,8)	1.40	0.35 - 5.46	0.88
-607 C/A							
A/A	11 (12,6)	11 (16,7)	0	0	-	-	-
C/C	28 (32,2)	16 (24,2)	4 (57,2)	8 (57,1)	8.25	0.93-72.95	0.07
C/A	48 (55,2)	39 (59,1)	3 (42,8)	6 (42,9)	2.53	0.28-22.26	0.66

Legenda: **G** genótipo.

6.3 DISTRIBUIÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 (-137 G/C e -607 C/A) NOS PACIENTES E GRUPO CONTROLE

Na análise do polimorfismo na posição -137 do gene da IL-18 nos pacientes portadores do HCV foi observado que 27,6% apresentaram os alelos G/G, 32,9% os alelos C/C e 39,5% foram heterozigotos – C/G. Já na análise do polimorfismo na posição -607, 36,9% dos pacientes apresentaram os alelos C/C, 11,8% A/A e 51,3% foram heterozigotos C/A.

No grupo controle os alelos observados na posição -137 foram de 30,9% para G/G, 34% para C/C e 35,1% para os alelos C/G. Já na posição -607 foram observados os alelos C/C em 30,8%, A/A em 18,1% e C/A em 51,1% dos voluntários.

Na comparação entre o grupo controle e os pacientes foi observado que o alelo C, na posição -607, foi mais frequente nos pacientes (62,5%), do que no grupo controle (56,4%). Em contrapartida, o alelo A, nesta mesma posição, foi mais presente no grupo controle (43,6%), do que entre os pacientes (37,5%).

A comparação da frequência dos alelos em relação ao polimorfismo da IL-18 entre pacientes e o grupo controle não demonstrou diferença significativa (tabela 12).

Tabela 12: Polimorfismo da IL-18 nos pacientes e grupo controle.

Polimorfismo da IL-18	Pacientes (152) N (%)	Controle (188) N (%)	OR	95% IC	P
-137 G/C					
G/G	42 (27,6)	58 (30,9)	-	-	-
C/C	50 (32,9)	64 (34)	0.92	0.53 - 1.59	0.89
G/C	60 (39,5)	66 (35,1)	0.79	0.46 - 1.35	0.47
G	144 (47,4)	182 (48,4)	-	-	-
C	160 (52,6)	194 (51,6)	0.95	0.70 - 1.29	0.84
-607 C/A					
A/A	18 (11,8)	34 (18,1)	-	-	-
C/C	56 (36,9)	58 (30,8)	0.54	0.11 - 0.27	1.08
C/A	78 (51,3)	96 (51,1)	0.65	0.25 - 0.34	1.24
A	114 (37,5)	164 (43,6)	-	-	-
C	190 (62,5)	212 (56,4)	0.77	0.56 - 1.05	0.12

6.4 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE DA IL-18 (-137 G/C e -607 C/A), ENTRE OS GÊNEROS

A distribuição dos polimorfismos na região promotora do gene da IL-18 (-137 G/C e -607 C/A) nos pacientes infectados pelo HCV, segundo o sexo, pode ser observada na tabela 13.

Tabela 13: Relação entre os gêneros e a frequência dos genótipos no SNP da IL-18.

Polimorfismo da IL-18	Sexo		OR	95% IC	p
	♂ (%)	♀ (%)			
-137 (G/C)	n = 106	n = 46			
G/G	24 (22,6)	18 (39,1)	-	-	-
C/C	34 (32,1)	16 (34,8)	1.59	0.67 - 3.73	0.39
G/C	48 (45,3)	12 (26,1)	3.00	1.24 - 7.22	0.02
-607 (C/A)					
A/A	8 (7,6)	10 (21,7)	-	-	-
C/C	40 (37,7)	16 (34,8)	3.12	1.04 - 9.34	0.07
C/A	58 (54,7)	20 (43,5)	3.62	1.25 - 10.45	0.03

Legenda: ♂ sexo masculino; ♀ sexo feminino.

Quando comparada a frequência dos alelos dos polimorfismos na região promotora do gene da IL-18 entre os sexos dos pacientes infectados pelo HCV, foi observada diferença significativa na frequência em ambas as posições estudadas.

A presença do genótipo homozigoto G/G, na posição -137 se mostrou significativamente maior nas mulheres, de modo que o perfil heterozigoto G/C, nesta mesma posição, foi significativamente maior entre os homens (OR 3.00 – IC 95% 1.24 - 7.22 – $p = 0.02$).

Na posição -607, mulheres infectadas pelo HCV apresentaram presença significativa dos alelos A/A, enquanto que o genótipo C/A foi significativamente maior entre os homens (OR 3.62 – IC 95% 1.25 - 10.45 – $p = 0.03$).

7 DISCUSSÃO

Diversas variantes polimórficas talvez induzam altos ou baixos níveis na produção de citocinas. Polimorfismo de nucleotídeos simples no gene promotor da IL-18 nas posições -137 G/C e -607 C/A afeta a atividade funcional de parte deste promotor (KHRIPKO et al., 2008). Polimorfismos nestes dois sítios podem influenciar a expressão da IL-18 e alterar sua produção, podendo comprometer seu papel na indução da expressão de quimiocinas, principalmente do IFN- γ (KHRIPKO et al., 2008; MANOHAR et al., 2009). A produção de INF- γ e os conseqüentes efeitos na ativação de células T são particularmente importantes para a proteção contra patógenos intracelulares, incluindo os vírus (SHARMA et al., 2009).

Apesar da posição funcional da IL-18 na hierarquia das citocinas pró-inflamatórias durante a inflamação crônica ainda não estar completamente esclarecida, há um consenso sobre o seu papel crítico no desempenho na infecção aguda e em relação à infecção pelo HCV, determinado em torno da resposta imunológica do hospedeiro (GRACIE et al., 2003; AN et al., 2008). Dentro deste contexto, o presente estudo relacionou os polimorfismos na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A, na infecção pelo HCV.

Para avaliar a influencia do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A, entre os pacientes infectados pelo HCV, nós qualificamos dois grupos, aqueles com ELISA reagente e PCR positiva (87/152), classificados como pacientes com infecção persistente, e os que foram reagentes para o ELISA, porém, indetectáveis para o PCR (65/152), considerados pacientes que obtiveram o clareamento viral. Entretanto, não houve diferença significativa para a análise dos polimorfismos da IL-18 em relação aos dois grupos de pacientes avaliados.

O presente estudo também avaliou a relação entre os diferentes genótipos do HCV encontrados nos pacientes infectados, aos polimorfismos na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A. Entre os genótipos encontrados, o genótipo 1 foi o mais prevalente, estando presente em 75.9% dos casos (66/87), seguido pelo genótipo 3, com 16.1% (14/87) e pelo genótipo 2, em 8% (7/87) dos infectados. Não foram encontrados o genótipo 4 e 5 do HCV. Este perfil, quanto à distribuição dos genótipos do HCV encontrados, condiz com diversos estudos que demonstram uma prevalência do genótipo 1 na maior parte da

população mundial infectada pelo HCV. No Brasil, estudo realizado por Sant et al., 2006, relatou que 64.9% das infecções crônicas causadas pelo HCV pertenciam ao genótipo 1, 4.6% ao genótipo 2, 30.2% ao genótipo 3 e apenas 0.2% e 0.1% pertenciam aos genótipos 4 e 5, respectivamente. Concluindo que o genótipo 1 é o mais freqüente, principalmente na região norte, enquanto que os genótipos 4 e 5 raramente são encontrados. Além deste, Perone et al., 2008, também demonstraram que em 788 amostras estudadas, o genótipo 1 esteve presente em 78.4% da população, seguido pelo genótipo 3, com 17.9%, e pelo genótipo 2, com 3.1% dos casos. Bezerra et al., 2007, também observou que o genótipo 1 esteve presente em 46.9% da população estudada, 34.4% pertencia ao genótipo 3 e somente 8.3% ao genótipo 2.

O nosso estudo, não encontrou diferença significativa na freqüência dos diferentes genótipos do HCV quando comparados em relação aos polimorfismos da IL-18. Sendo semelhante ao que foi descrito por Manohar et al., 2009, que também não revelou diferença significativa ao comparar os genótipos do HCV em relação ao polimorfismo da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A.

Para determinar se existe associação entre o polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e 607 C/A, com a infecção pelo HCV, nós investigamos um total de 152 pacientes infectados por este vírus comparando-os a 188 amostras controle. Entre os resultados encontrados, destacamos a freqüência dos alelos A/A, na posição -607, que esteve presente em apenas 11,8% dos pacientes infectados pelo HCV, sendo mais freqüente no grupo controle, encontrado em 18,1% dos casos sadios. Da mesma forma, o alelo A também foi mais prevalente no grupo sadio (43,6%) em relação aos infectados pelo HCV (37,5%). Entretanto, a comparação para os polimorfismos da IL-18 entre os pacientes infectados pelo HCV e o grupo controle, não revelou diferença significativa para nenhum dos alelos na posição -137 (G/G, C/C e G/C), assim como também para os alelos A/A, C/C e C/A, na posição -607.

O resultado encontrado neste estudo foi condizente ao apresentado por Manohar et al., em 2009, que também relatou não haver diferença significativa na distribuição de todos os alelos, nas posições -137 G/C e -607 C/A, na análise do polimorfismo na região promotora do gene da IL-18 em 204 pacientes infectados pelo HCV, comparados a 350 amostras controle.

Para a avaliação entre o polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, nas posições -137 G/C e -607 C/A, entre os gêneros dos pacientes infectados pelo HCV, foram analisadas 106 amostras masculinas e 46 femininas, de um total de 152 pacientes, demonstrando uma prevalência da infecção na população masculina (69.7%) em relação às mulheres (30.3%). Esta relação de maior prevalência da infecção pelo HCV na população masculina vem sendo confirmada por diversos estudos já realizados, incluindo o de Ahamad et al., em 2011, que revelou uma freqüência de 114 homens para 43 mulheres, quando comparou os níveis de fibrose em 157 paquistaneses infectados pelo HCV, Manohar et al., 2009, também relatou maior prevalência da infecção pelo HCV nos homens em relação às mulheres (126/78), assim como Sharma et al., 2008 (39/11) e Elasier et al., 2010 (785/455).

O presente estudo observou uma diferença significativa entre os gêneros dos pacientes infectados pelo HCV quando comparados em relação aos polimorfismos na região promotora do gene da IL-18. Foi observado que homens infectados pelo HCV foram mais heterozigotos para os alelos G/C (45,3%) e C/A (54,7%), nas posições -137 e -607, respectivamente, em relação às mulheres (26,1% e 43,5%). Em contrapartida, mulheres apresentaram maior perfil homozigoto para os alelos G/G (39,1%), na posição -137, e A/A (21,7%), na posição -607, em comparação aos homens (22,6% e 7,6%). Em estudo semelhante, Manohar et al., 2009, ao estratificar suas amostras em pacientes com atividade inflamatória hepática leve (grupo A) e crônica ou severa (grupo B), demonstrou que a presença do genótipo A/A, na posição -607, esteve significativamente presente nos pacientes do grupo A, em relação ao grupo B (38.6% vs. 21%, $p = 0.005$; OR = 0.424, IC = 0.233 – 0.773; $R^2 = 0.631$). Sugerindo que os alelos A/A, na posição -607, seja um potencial marcador de proteção na infecção pelo HCV, pois está associado à doença hepática leve. AN et al., 2008, também revelou que a presença do alelo A, na posição -607, esteve fortemente associado á depuração do HCV (OR = 2.92, IC, 1.59 – 5.36; $p = 0.0005$). Estes dois relatos nos levam a crer que a presença dos alelos A/A, na posição -607, detectado neste estudo em maior freqüência entre as mulheres, seja um fator diferencial na proteção contra a infecção pelo HCV e na depuração deste vírus, dando indícios sobre o seu papel protetor na infecção pelo HCV. Além disso, a presença do alelo A/A encontrado em maior freqüência no grupo controle (18,1%), em comparação aos pacientes infectados pelo HCV (11,8%), também reforça a provável ação protetora deste polimorfismo à infecção causada pelo HCV.

8 CONCLUSÃO

- A determinação da RT-PCR em todos os pacientes estudados demonstrou que 57% (87/152) apresentaram PCR positiva, enquanto que 43% (65/152) foram indetectáveis para a PCR.
- Não houve diferença significativa quando comparados os polimorfismos da IL-18 ao curso da infecção pelo HCV nos pacientes com PCR positivo (persistentes) e indetectável (clareamento viral).
- A identificação dos genótipos do HCV nos pacientes infectados demonstrou maior prevalência do genótipo 1 (75,9%), seguido pelo genótipo 3 (16,1%) e genótipo 2 (8%).
- A avaliação entre os diferentes genótipos do HCV e sua relação com os polimorfismos na região promotora do gene da IL-18 não demonstrou significância quando comparados.
- A determinação das frequências alélicas para o polimorfismo na região promotora do gene da IL-18, quando comparadas entre os pacientes e o grupo controle, demonstrou, dentre outros, que o alelo A/A (-607) foi mais frequente no grupo sadio (controle), com 18,1%, em relação ao grupo dos pacientes infectados pelo HCV (11,8%). Contudo, não foi observada significância entre os grupos.
- A determinação da infecção pelo HCV entre os sexos demonstrou que foi maior entre os homens (69,7%) do que nas mulheres (30,3%).
- Na comparação entre os gêneros para as frequências dos polimorfismos da IL-18 em ambas as posições (-137 G/C e -607 C/A), observou-se que homens foram significativamente mais frequentes para os alelos heterozigotos G/C (45,3%) e C/A (54,7%), nas posições -137 e -607, respectivamente, enquanto que mulheres foram significativamente mais homozigotas G/G (39,1%) e A/A (21,7%), para as mesmas posições.

REFERÊNCIAS

ANZOLA M; BURGOS J.J. Hepatocellular carcinoma: molecular interactions between hepatitis C virus and p53 in hepatocarcinogenesis. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, p.1-16, nov. 2003.

AHMAD W; IJAZ B; JAVED F.T; GULL S; KAUSAR H; SARWAR M.T; ASAD S; SHAHID I; SUMRIN A; KHALIQ S; JAHAN S; PERVAIZ A; HASSAN S. A comparison of four fibrosis indexes in chronic HCV: Development of new fibrosis-cirrhosis index (FCI). **BMC Gastroenterology**, v.11, n.44, p.1471-230x. 2011.

AN, P; THIO, C.L; KIRK, G.D; DONFIELD, S; GOEDERT, J.J; WINKLER, C.A. Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance. **Journal of Infectious Diseases**, v.198, n.8, p.1159-1165, oct. 2008.

ASAKAWA, M; KONO, H; AMEMIYA, H; MATSUDA, M; SUZUKI, T; MAKI, A; FUJII, H. Role of interleukin-18 and its receptor in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection. **International Journal of Cancer**, v.18, n.3, p.564-570, feb. 2006.

ASSELAH, T.; ESTRABAUD, E.; BIECHE, I.; LAPALUS, M.; MUYNCK, S.D.; VIDAUD, M.; SAADOUN, D.; SOUMELIS, V.; MARCELLIN, P. Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin. **Liver International**, v.30, n.9, p.1259-1269, oct. 2010.

BALDICK, C.J; WICHROSKI, M. J;PENDRI, A; WALSH, A.W;FANG, J; MAZZUCCO, C.E; POKORNOWSKI, K.A; ROSE, R.E; EGGERS, B.J; HSU, M; ZHAI, W; ZHAI, G; GERRITZ, S.W; POSS, M. A; MEANWELL, N.A; COCKETT, M.I; TENNEY, D.J. A novel small molecule inhibitor of hepatitis C virus entry. **Plos Pathogenes**, v.6, nº 9, p.1-14, set. 2010.

BALSANO, C.; ALISI, A. Hepatitis C virus (HCV): an RNA virus with a pro-oncogenic potencial. **Digestive and Liver Disease**, v.39, supplement.1, p.S46-S51, set. 2007.

BEZERRA, C.S.; LIMA, J.M.C.; VILAR, J.L.; MOREIRA, J.L.B.; FROTA, C.C. Viral hepatitis C in a leading brazilian hospital: epidemiological factors and genotyping. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.4, p.656-661, sep. 2007.

BRADLEY, D.W. Virology, Molecular biology, and serology of hepatitis C vírus. **Transfusion Medicine Reviews**, v.6, p.93-102. 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: O Brasil está atento**. Brasília, MS, 2008.

BURLONE, M.E; BUDKOWSKA, A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. **Journal of General Virology**, v.90, n.5, p.1055-1070, mar. 2009.

BUSHLEY, A.W. FERRELL, R. MCDUFFIE, K. et al., Polymorphisms of interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian câncer. **Gynecologic Oncology**, v.95, n. 3, pp. 672–679, set. 2004.

ELASIFER H.A; AGNNYIA Y.M; AL-ALAGI B.A; DAW M.A. Epidemiological manifestations of hepatitis C virus genotypes and its association with potential risk factors among Libyan patients. **Virology Journal**. V.7, n.1, p. 377. 2010.

FERREIRA C.T; SILVEIRA T.R da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v.7, n.4, p.473-487, dez. 2004.

GONÇALVES, S.; DAMINELLI, E.N.; SPADA, C.; HAAS, P. Panorama da hepatite C no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p.57-60, 2008.

GRACIE, J.A.; ROBERTSON, S.E.; MCINNES, I.B. Interleukin-18. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n.2, p.213-224, feb. 2003.

IMBODEN, M. NIETERS, A. BIRCHER, A. J. Cytokine gene polymorphisms and atopic disease in two European cohorts. **Clinical and Molecular Allergy**, v. 4, n. 1, article 9, p. 1–9, jun. 2006.

IOANNOU, S; HATZIS, G; VLAHADAMI, I; VOULGARELIS, M. Aplasia anemia associated with interferon alpha 2a in a patient with chronic hepatitis C virus infection: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v.4. n.268, p.1-5, aug. 2010.

KASER, A. NOVICK, D. RUBINSTEIN, M. SIEGMUND, B. ENRICH, B. KOCH, R. O. VOGEL, W. KIM, S. H. DINARELLO, C. A. TILG, H. Interferon- α induces interleukin-18 binding protein in chronic hepatitis C patients. **Clinical & Experimental Immunology**. v.129. p. 332-338, apr. 2002.

KHRIPKO, O. P.; SENNIKOVA, N. S.; LOPATNIKOVA, J. A.; KHRIPKO, J. I.; FILIPENKO, M. L.; KHRAPOV, E. A.; GELFGAT, E. L.; YAKUSHENKO, E. V.; KOZLOV, V. A.; SENNIKOV, S. V. Association of Single Nucleotide Polymorphisms in the IL-18 Gene with production of IL-18 Protein by Mononuclear Cells from healthy Donors. **Mediators of Inflammation**, v.2008, p.1-6, sep. 2008.

KOPF M; BACHMANN M.F; MARSLAND B.J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. **Nature Reviews**, v.9, p.703-718, sep. 2010.

KWUN, H.J.; JUNG, E.Y.; AHN, J.Y.; LEE, M.N.; JANG, K.L. p53-dependent transcriptional repression of p21(waf1) by hepatitis C virus NS3. **Journal of General Virology**, v.82, n.9, p.2235-2241, set. 2001.

LAUER, G.M; WALKER, B.D. Medical Progress: Hepatitis C virus infection. **New England Journal Medicine**, v.345, n.1, p.41-52, jul. 2001.

LOPES, E.P.A; SILVA, A.E; SETTE JUNIOR, H; GUIMARÃES, R.X; FERRAZ, M.L. Autoantibodies before, during, after administration of recombinant interferon- α for chronic viral hepatitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.37, n.5, p.455-460, set-nov. 1995.

LUDWICZEK, O.; KASER, A.; NOVICK, D.; DINARELLO, C.A.; RUBINSTEIN, M.; VOGEL, W.; TILG, H. Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease. **Journal of Clinical Immunology**, v.22, n.6, p.331-337, nov. 2002.

MANOHAR, K; SUNEETHA, P.V; SUKRITI; PATI, N.T; GUPTA, A.C; HISSAR, S; SAKHUJA, P; SARIN, S.K. Association of IL-18 promoter polymorphism with liver disease severity in HCV-infected patients. **Hepatology International**, v.3, n.2, p.371–377, mar. 2009.

MCGUINNESS, P.H.; PAINTER, D.; DAVIES, S.; MCCAUGHAN, G.W. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. **GUT**, v.46, n.2, p.260-269, feb. 2000.

MORALES, R.J.P.; RODRIGUEZ, T.R.V.; TORRES, O.; MORADO, I.C.; CASTAÑEDA, S.; FILLOY, J.A.M.; RUBIO, J.L.C.; GUTIERREZ, B.F.; GAY, M.A.G.; MARTIN, J. Association between IL-18 gene polymorphisms and biopsy-proven giant cell arteritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.12, n.2, p.1-7, mar. 2010.

MUMMADI R.R; PETERSEN J.R; , XIAO S.Y; SNYDER N. Role of simple biomarkers in predicting fibrosis progression in HCV infection. **World Journal Gastroenterology**, v.16, n. 45, p.5710-5715, dec. 2010.

PENIN, F.; REY, F.A.; DUBUISSON, J.; MORADUPOUR, D.; PAWLITSKY, J.M. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v.39, n.1, p.5-19, jan. 2004.

PERONE, C.; DEL CASTILLO, D.M.; PEREIRA, G.L.; CARVALHO, N.O.; JANUÁRIO, J.N.; TEIXEIRA, R. Alta prevalência do genótipo 1 em portadores de hepatite C crônica em Belo Horizonte, MG. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.3, p.238-242, mai-jun. 2008.

RYCHLOWSKA, M.; SZEWCZYK, K.B. Hepatitis C – new developments in the studies of the viral life cycle. **Acta Biochimica Polonia**. v. 54, n.4, p. 703-715, sep. 2007.

SANT M.A.; ZARIFE A.; OLIVEIRA E.C.P.; ROMEU J.M.S.L.; REIS M.G. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.6, p.567-569, nov-dez, 2006.

SCHVOERER, E.; NAVAS, M.C.; THUMANN, C. Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy. **Journal Medical Virology**, v.70, n.4, p.588-593, aug. 2003.

SERUGA, B.; ZHANG, H.; BERNSTEIN, L.J.; TANNOCK, I.F. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.8, n.11, p.887-899, nov. 2008.

SHARMA, A.; CHAKRABORTI, A.; DAS, A.; DHIMAN, R.K.; CHAWLA, Y. Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis. **Immunology**, v.128, n.1pt2, p.e514-e522, set. 2008.

SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER, M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, n.9, p.558-567, set. 2005.

SIMS, J.E.; SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.2, p.89-102, feb. 2010.

STRAUSS, Edna. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34. nº1, p. 69-82, jan-fev 2001.

SUZUKI, T.; ISHII, K.; AIZAKI, H.; WAKITA, T. Hepatitis C viral life cycle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n.12, p.1200-1212, out. 2007.

TELLINGHUISEN, T.T.; EVANS, M.J.; HAHN, T.V.; YOU, S.; RICE, C.M. Studying hepatitis C virus: Making the best of a bad virus. **Journal of Virology**, v.81, n.17, p.8853-8867, set. 2007.

THIRUMALA, D.K. Central roles of NLRs and inflammasomes in viral infection. **Nature Reviews Immunology**, v.10, n.10, p.688-698, oct. 2010.

TOMANOVIC, N.R.; BORICIC, I.V.; BRASANAC, D.C.; STOJSIC, Z.M.; DELIC, D.S.; BRMBOLIC, B.J. Activated liver stellate cells in chronic viral C hepatitis: histopathological and immunohistochemical study. **Journal Gastrointestinal Liver Diseases**, v.18, n.2, p.163-167, jun. 2009.

VASCONCELOS, R. R.; TENGAN, F. M.; CAVALHEIRO, N. P.; IBRAHIM, K.; PEREIRA, H.; BARONE, A. A. Fatores associados às formas evolutivas graves da infecção crônica pelo vírus da hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.5, p.433-438, set-out. 2006.

VISO, A.T.R.; BARBOSA, T.C; YAMAMOTO, L.; PAGLIARI, C.; FERNANDES, E.R.; BRASIL, R.A.; ANDRADE JUNIOR, H.F de; DUARTE, M.I.S.; BARONE, A.A. Portal CD4+ and CD8+ T lymphocyte correlate to intensity of interface hepatitis in chronic hepatitis C. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.6, p.371-378, nov-dez, 2007.

WANG, P.; ARJONA, A.; ZHANG, Y.; SULTANA, H.; DAÍ, J.; YANG, L.; LEBLANC, P. M.; DOIRON, K.; SALEH, M.; FIKRIG E. Caspase-12 controls West Nile virus infection via the viral RNA receptor RIG-I. **Nature Immunology**, v.11, n.10, p.912-919, oct. 2010.

ZARIFE, M.A.S.A.; OLIVEIRA, E.C.P.; ROMEU, J.M.S.L.; REIS, M.G. Detecção do genótipo 4 do vírus da hepatite C em Salvador, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.6, p.567-569, nov-dez. 2006.

ZHANG, P.A. WU, J.M. LI, Y. YANG, X.S. Association of polymorphisms of interleukin-18 gene promoter region with chronic hepatitis B in Chinese Han population. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n 11, p.1594–1598, mar. 2005.

Anexo: TCLE



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO**

PROJETO: Análise de Polimorfismo da Região Promotora do Gene da Interleucina-18 (-137 G/C e -607 C/A) em Pacientes Portadores do Vírus da Hepatite C de Belém-PA.

Esta pesquisa tem como principal objetivo investigar a presença de alterações genéticas que poderão influenciar no desenvolvimento clínico dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C. Para tanto será necessária coleta de sangue. Com essa finalidade prestamos os seguintes esclarecimentos:

- 1- Serão realizados exames de sangue para pesquisar a infecção pelo vírus da hepatite C.
- 2- A pesquisa oferece riscos mínimos para o participante, referente principalmente ao procedimento de coleta de sangue que será realizada por profissional treinado.
- 3- O benefício para quem participa da pesquisa é a realização dos exames que auxiliam no diagnóstico e tratamento da doença pelo vírus da hepatite C.
- 4- Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do participante para sua realização.
- 5- Os resultados dos exames realizados pela pesquisa serão usados como dados da pesquisa, omitindo-se a identidade do participante.
- 6- Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como poderá se retirar dela no momento que desejar, sem qualquer prejuízo pessoal.

Solicitamos assim, a sua autorização para efetuarmos o referido exame e realizarmos uma entrevista, sendo que a mesma é confidencial; para o desenvolvimento do estudo em questão.

CONSENTIMENTO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo do mesmo, assim como seus benefícios. Declaro ainda que por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para os exames.

Belém, ____ / ____ / ____

ASSINATURA DO PACIENTE

Pesquisador responsável: Kemper Nunes dos Santos.
End. Profissional: Laboratório de Patologia Clínica do NMT/UFGPA.
Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Bairro: Umarizal, CEP: 66000-000.
Fone: 3236-197