DEBORA LUCIA SEGURO DANILOVIC

**Avaliação tireoidiana de pacientes infectados pelo vírus da
hepatite C: correlação com polimorfismos do gene CTLA4**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Endocrinologia
Orientador: Dra. Suemi Marui

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Danilovic, Debora Lucia Seguro

Avaliação tireoidiana de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C : correlação com polimorfismos do gene CTLA4 / Debora Lucia Seguro Danilovic. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Suemi Marui.

Descritores: 1.Hepatite C 2.Doenças auto-imunes 3.Tireóide 4.Globulina ligante de tiroxina 5.Interferon alfa 6.CTLA4

USP/FM/DBD-358/10

Dedico esta tese aos meus pais, Francisco e Teresa Cristina, por sua dedicação, pelas orientações, pelo amor e pelo apoio incondicional aos meus sonhos que me conduziram até esta conquista.

Dedico também ao meu esposo, Alexandre, por seu companheirismo e carinho, pela inspiração, pelo incentivo e pela compreensão pelas horas que me ausentei para realização deste trabalho.

E à minha filha, Ana Carolina, a luz de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Suemi Marui, minha orientadora, por seu entusiasmo, pela dedicação e comprometimento com a pesquisa e o ensino e, certamente, por sua amizade compartilhada nestes anos de realização do projeto.

À Prof. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, sou grata por sua confiança, pelos ensinamentos e pela inspiração em buscar constantemente novos conhecimentos.

Agradeço à Érika Urbano de Lima pela colaboração nos estudos dos polimorfismos do gene CTLA4, à Dra. Maria Cássia Mendes Correa e ao Dr. Heverton Zambrini pela colaboração no recrutamento e atendimento dos pacientes no Ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, à Raffaele Kasprowicz Barros pela colaboração na seleção de voluntários doadores de sangue no Hospital do Servidor Público Estadual, e às Sras. Jacyra Mateus de Lima e Josephina de Primo pela recepção e auxílio aos pacientes .

Ao Dr. Antônio Marcondes Lerário, sou grata por sua amizade e por me guiar na aquisição de conhecimento de técnicas de estudo em Biologia Molecular.

Agradeço ao Prof. Dr. Meyer Knobel pela oportunidade de integrar a Unidade de Tireóide da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Aos membros da banca de qualificação desta tese, Prof. Dr. Geraldo Medeiros Neto, Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira e Dra. Maria Elisabeth Rossi da Silva, sou grata por suas valiosas sugestões a esta tese.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo auxílio à pesquisa concedido a este estudo.

E agradeço aos pacientes, motivo de meu trabalho, como médica e pesquisadora.

Este projeto foi financiado pela FAPESP, processo 2006/06080-2.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Hepatite C	1
1.2. Hepatite C e doenças auto-imunes de tireóide	3
1.2.1. Mecanismos de desenvolvimento de doenças auto-imunes de tireóide na infecção por VHC	4
1.2.2. Tratamento com IFN α e doenças auto-imunes de tireóide	5
1.2.3. Manifestações de doenças tireoidianas induzidas por IFN α	6
1.2.4. Ribavirina	8
1.3. CTLA4 e doenças auto-imunes de tireóide	9
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Seleção de pacientes	16
3.1.1. Tratamento com IFN α	17
3.2. Avaliação clínica	18
3.3. Avaliação tireoidiana	19
3.3.1. Avaliação hormonal	19
3.3.2. Avaliação de auto-imunidade	19
3.3.3. Definição de disfunção tireoidiana e doença auto-imune de tireóide	19
3.3.4. Ultra-sonografia de tireóide	20
3.4. Avaliação de CXCL10	21
3.5. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4	21
3.5.1. Extração de DNA	21
3.5.2. Amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR)	23
3.5.3. PCR-RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism")	25
3.5.4. Análise de fragmento através de eletroforese capilar	26
3.5.5. Sequenciamento automático	26
3.6. Análise estatística	28
4. RESULTADOS	30
4.1. Avaliações clínica e tireoidiana	30
4.1.1. Indivíduos infectados por VHC	30
4.1.1.1. Indivíduos infectados por VHC sem distúrbio tireoidiano	30
4.1.1.2. Indivíduos infectados por VHC com doenças auto-imunes de tireóide	35
4.1.1.3. Indivíduos infectados por VHC com disfunção tireoidiana não auto-imune	37
4.1.2. Indivíduos do grupo controle	39

4.1.2.1. Avaliação pareada para sexo e idade entre controles e indivíduos infectados por VHC	41
4.2. Avaliação de CXCL10	43
4.3. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4	46
4.3.1. Extração de DNA e PCR	47
4.3.2. PCR-RFLP	47
4.3.3. Sequenciamento automático	49
4.3.4. Análise do polimorfismo AT(n)	50
4.3.5. Análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos do gene CTLA4 -318C>T, A49G e CT60	51
4.3.6. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4 nas populações de infectados por VHC e controles	52
4.3.7. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4 nas populações de infectados por VHC com e sem distúrbios tireoidianos	54
4.3.8. Avaliação de polimorfismos do gene CTLA4 e genótipo do VHC	57
4.4. Avaliação de distúrbios tireoidianos relacionados ao tratamento com IFN α	58
4.4.1. Avaliação dos infectados por VHC tratados com IFN α sem distúrbio tireoidiano durante ou após o tratamento	62
4.4.2. Avaliação dos infectados por VHC com tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α	65
4.4.2.1. Hipotireoidismo auto-imune induzido por IFN α	68
4.4.3. Avaliação dos infectados por VHC com tireoidites não auto-imunes induzidas por IFN α	70
4.4.3.1. Hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes induzido por IFN α	73
4.4.3.2. Tireoidites destrutivas induzidas por IFN α	75
5. DISCUSSÃO	79
5.1. Avaliação clínica e tireoidiana	79
5.1.1. Disfunções tireoidianas e doenças auto-imunes de tireóide em indivíduos infectados por VHC	79
5.1.2. Achados de ultra-sonografia de tireóide em indivíduos infectados por VHC	82
5.1.3. Papel do CXCL10	83
5.2. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4	84
5.3. Avaliação de distúrbios tireoidianos relacionados ao tratamento com IFN α	86
5.4. Considerações finais	95
6. CONCLUSÕES	97
7. ANEXOS	98
8.REFERÊNCIAS	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina ou adenosina
A49G	dimorfismo de adenina e guanina na posição 49 do exon 1 do gene CTLA4
AITD	doenças auto-imunes de tireóide
ALT	alanina transaminase
ANOVA	análise de variância
anti-Tg	anticorpo antitireoglobulina
anti-TPO	anticorpo antitireoperoxidase
AST	aspartato transaminase
AT(n)	repetições variáveis micro-satélites de pares de bases adenina e timina na região não traduzida 3' do gene CTLA4
C	citossina
-318C>T	dimorfismo de citossina e timina na posição -318 da região promotora do gene CTLA4
CD40L	ligante de CD40
CT60	dimorfismo de adenina e guanina na posição +1325 a partir do códon de parada TAA do gene CTLA4
CTLA4	proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico, do inglês "cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4"
CXCL10	quimiocina ligante do motivo C-X-C 10, do inglês "chemokine (C-X-C motif) ligand 10"
DAIT	doenças auto-imunes de tireóide
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO	densidade óptica

DP	desvio padrão
EDTA	ácido etileno diaminotetracético
EP	erro padrão
G	guanina ou guanosina
HCV	vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno de histocompatibilidade classe II DR
¹³¹ I	iodo-131
IC 95%	intervalo de confiança de 95%
ICAM	molécula de adesão intercelular
IFN α	interferon alfa
IFN γ	interferon gama
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
IRF5	fator regulador de interferon 5
JAK	quinase Janus, do inglês “Janus kinase”
MHC	complexo de histocompatibilidade
NK	exterminadoras naturais, do inglês “natural killer”
OR	razão de chances, do inglês “odds ratio”
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia pela polimerase

PCR-RFLP	reação em cadeia da polimerase associado com o polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição
r	coeficiente de correlação
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
rT ₃	triiodotironina reversa
RVS	resposta virológica sustentada
SDS	solução de dodecil sulfato de sódio
STAT	tradutores de sinal e ativadores de transcrição, do inglês “signal transducers and activators of transcription”
T	timina ou timidina
T ₄ L	tiroxina livre
T ₃ T	triiodotironina total
T ₄ T	tiroxina total
TAE	solução com Tris, ácido acético e EDTA
TBG	globulina ligante de tiroxina, do inglês “thyroxine-binding globulin”
T CD ₄ ⁺	linfócito T auxiliar
T CD ₈ ⁺	linfócito T citotóxico
TCR	receptor de linfócito T
TE	solução com Tris e EDTA
TEM	tampão com Tris, EDTA e NaCl
Tg	tireoglobulina
TNF	fator de necrose tumoral, do inglês “tumor necrosis factor”
TPO	tireoperoxidase
TRAb	anticorpo anti-receptor de TSH

TSH	hormônio tireoestimulante
US	ultra-sonografia
3'UTR	primeira região não traduzida que se segue a região codificadora do RNAm
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular, do inglês "vascular endothelial growth factor"
VHB	vírus da hepatite B
VHC	vírus da hepatite C

RESUMO

Danilovic DLS. *Avaliação tireoidiana de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C: correlação com polimorfismos do gene CTLA4* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo;2010.

INTRODUÇÃO: Manifestações auto-imunes são frequentes na infecção pelo vírus da hepatite C (VHC). Apesar da associação com doenças auto-imunes de tireóide (DAIT) ser controversa, sabe-se que distúrbios tireoidianos podem surgir ou piorar com tratamento com IFN α e ribavirina. Os objetivos deste estudo foram avaliar a função tireoidiana em pacientes infectados pelo VHC, caracterizar distúrbios tireoidianos antes, durante e após tratamento com IFN α e estudar as frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene CTLA4, correlacionando-os com características clínicas e laboratoriais, presença de disfunção tireoidiana e evolução durante tratamento com IFN α . **MÉTODOS:** Avaliação prospectiva de 112 indivíduos com infecção crônica pelo VHC, 30 tratados com IFN α , e 183 controles. Realizaram-se avaliações clínica, hormonal e de auto-imunidade tireoidiana e ultra-sonografia de tireóide no início e durante tratamento. Avaliações de globulina transportadora de hormônios tireoidianos (TBG), de CXCL10 e de biópsia hepática foram feitas pré-tratamento. Análises dos polimorfismos do gene CTLA4 -318C>T, A49G e CT60 foram realizadas por PCR-RFLP e de AT(n) por análise de fragmento através de eletroforese capilar. **RESULTADOS:** A frequência de DAIT entre infectados por VHC não diferiu dos controles (10,7 vs 13,5%, $p=0,585$). Os limites de distribuição dos níveis de T3 (T3T) e T4 (T4T) totais foram superiores aos de referência (T3T 112-246 ng/dL; T4T 7,8-15,2 $\mu\text{g/dL}$), assim como de TBG (17-47 mg/L). TBG correlacionou-se com T3T ($r=0,654$, $p<0,001$) e T4T ($r=0,741$, $p<0,001$). Heterogeneidade ($p=0,027$) e hipoecogenicidade de parênquima ($p=0,002$) foram mais frequentes nos pacientes com DAIT. Aumento de vascularização esteve presente em 49,2% dos infectados sem distúrbio tireoidiano. CXCL10 esteve aumentada nos infectados ($p=0,006$), mas não se relacionou com disfunção tireoidiana. Sua elevação correspondeu ao grau de atividade necro-inflamatória na biópsia hepática ($p=0,006$) e correlacionou-se com T3T ($r=0,388$, $p=0,003$), T4T ($r=0,444$, $p=0,001$) e TBG ($r=0,551$, $p<0,001$). Dezenove por cento dos pacientes desenvolveram tireoidites auto-imunes por IFN α e 16% não auto-imunes. Em 14 pacientes sem alteração tireoidiana durante o uso de IFN α , T3T diminuiu ao longo de 12 meses ($p=0,038$) concomitante à queda de ALT ($p=0,055$). T4T diminuiu com 3 ($p=0,039$) e 12 meses ($p=0,008$), T4 livre e TSH permaneceram estáveis. Encontrou-se maior frequência de oito repetições AT na região 3'UTR do gene CTLA4 nos infectados por VHC ($p=0,019$). O alelo C do polimorfismo -318C>T esteve relacionado com infecção pelos genótipos 1 ($p=0,020$, OR 0,19) e 3 ($p=0,008$, OR 9,13), assim como o alelo G do polimorfismo A49G ($p=0,002$, OR 0,38 e $p=0,004$, OR 2,49, respectivamente). Não se identificou relação dos polimorfismos do gene CTLA4 com distúrbios tireoidianos, antes ou após tratamento com IFN α . **CONCLUSÕES:** Não foi encontrada associação entre infecção por VHC e doenças tireoidianas. Indivíduos

infectados por VHC têm maiores níveis de T3T e T4T, correlacionados com TBG. Aumento de CXCL10 não se associou com disfunção tireoidiana, mas se correlacionou com TBG, T3T e T4T. IFN α provocou tireoidites auto-imunes e não auto-imunes, além de reduzir T3T e T4T coincidente com melhora de lesão hepática. Não se encontrou relação dos polimorfismos do gene CTLA4 com características clínicas e laboratoriais ou presença de disfunção tireoidiana prévia ou induzida por IFN α .

Descritores: 1.Hepatite C 2.Doenças auto-imunes 3.Tireóide 4.Globulina ligante de tiroxina 5.Interferon alfa 6.CTLA4.

SUMMARY

Danilovic DLS. *Thyroid evaluation of patients infected by hepatitis C virus: correlation with polymorphisms of CTLA4 gene* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010.

INTRODUCTION: Autoimmune disorders are frequent in patients infected by the hepatitis C virus (HCV). Although the association with autoimmune thyroid diseases (AITD) is controversial, thyroid disturbance could occur or worsen with IFN α and ribavirin treatment. The aims of the study were evaluate thyroid function in HCV-infected patients, characterize thyroid disturbance prior and after IFN α treatment and analyze the frequency of the genotypes of the polymorphisms of CTLA4 gene, and their relation to clinical and laboratorial features, presence of thyroid dysfunction and disturbance along IFN α treatment. **METHODS:** Prospective evaluation of 112 chronically HCV-infected subjects, 30 treated with IFN α , and 183 controls. Clinical, hormonal, thyroid autoimmunity and ultrasound exams were performed before and during treatment. Thyroxine-binding globulin (TBG), CXCL10 and hepatic biopsies were also evaluated before treatment. Analysis of polymorphisms of CTLA4 gene -318C>T, A49G and CT60 were made by PCR-RFLP and AT(n) polymorphism analysis by capillary electrophoresis in automatic sequencer. **RESULTS:** The frequency of AITD among HCV-infected subjects was similar to the rate among controls (10.7 vs 13.5%, $p=0.585$). Total T3 (T3T) and T4 (T4T) distributions were right shifted (T3T 112-246 ng/dL; T4T 7.8-15.2 μ g/dL), as was TBG (17-47 mg/L). TBG correlated to both T3T ($r=0.654$, $p<0.001$) and T4T ($r=0.741$, $p<0.001$). Thyroid heterogeneity ($p=0.027$) and hypoechogenicity ($p=0.002$) were associated with AITD and, most notably, increased vascularization was present in 49.2% of HCV-infected patients without thyroid disturbance. CXCL10 was higher in HCV-infected group ($p=0.006$) but was not related to thyroid dysfunction. Increase in CXCL10 levels were consistent with hepatic necroinflammatory activity ($p=0.006$) and correlated to T3T ($r=0.388$, $p=0.003$), T4T ($r=0.444$, $p=0.001$) and TBG ($r=0.551$, $p<0.001$). Nineteen percent of subjects treated with IFN α presented autoimmune thyroiditis and 16% had non-autoimmune thyroiditis. In 14 subjects without IFN α -induced thyroid dysfunction, T3T decreased along 12 months of follow-up ($p=0.038$) concomitant to ALT decrease ($p=0.055$). T4T decreased within 3 ($p=0.039$) and 12 months ($p=0.008$), while both free T4 and TSH remained stable. Eight AT repetitions in 3'UTR site of the CTLA4 gene were more frequent among HCV-infected subjects. The C allele of -318C>T polymorphism was associated with genotype 1 ($p=0.020$, OR 0.19) and 3 infections ($p=0.008$, OR 9.13), similar to allele G of A49G polymorphism ($p=0.002$, OR 0.38 and $p=0.004$, OR 2.49, respectively). No association of the polymorphisms of CTLA4 gene and thyroid disorders, prior or induced by IFN α treatment, was found. **CONCLUSIONS:** No association between HCV-infection and thyroid diseases was found. HCV-infected subjects had higher T3T and T4T which were correlated to TBG. Increased CXCL10 was not associated to thyroid dysfunction, but correlated to TBG, T3T and T4T. IFN α induced autoimmune

and non-autoimmune thyroiditis. IFN α also reduced T3T and T4T levels commensurately with liver improvement. The polymorphisms of CTLA4 gene were not associated with clinical and laboratorial features or presence of thyroid dysfunction, prior or induced by IFN α .

Descriptors: 1.Hepatitis C 2.Autoimmune diseases 3.Thyroid 4.Thyroxine-binding globulin 5.Alpha-interferon 6.CTLA4.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da frequência de diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite por vírus C (VHC) e seu tratamento com interferon-alfa ($\text{IFN}\alpha$) está levando a novos conhecimentos da interação entre a tireóide e a infecção viral.

No Brasil, estima-se que a prevalência da infecção pelo VHC seja de 1 a 2 %, sendo esperado que 70 a 80 % dos infectados evoluam para a doença crônica¹. Como o VHC é um vírus hepato e linfotrófico, as manifestações extra-hepáticas auto-imunes e linfoproliferativas são frequentes, com associações descritas com crioglobulinemia mista, síndrome antifosfolípide, porfiria cutânea tarda, glomerulonefrite membranoproliferativa, hepatite auto-imune, linfoproliferação de linfócitos B benigna e linfoma não-Hodgkin².

1.1. Hepatite C

O VHC é membro da família *Flaviviridae* e apresenta seis genótipos (1 a 6). Os genótipos chegam a apresentar 30 a 50% de diferenças nas suas sequências de RNA, que determinam características próprias de agressividade e resposta ao tratamento. Os genótipos 1 e 4 têm maior resistência ao tratamento com $\text{IFN}\alpha$, que os genótipos 2 e 3^{3, 4}. O vírus codifica um único polipeptídeo de aproximadamente 3 010 aminoácidos. Em sua estrutura genômica, a região altamente conservada na extremidade 5' codifica a proteína do nucleocapsídeo. As regiões variáveis E1 e E2

codificam o invólucro. E, finalmente, existem mais cinco regiões não estruturais, menos conservadas, na direção da extremidade 3' (Figura 1)⁵.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura genômica do vírus da hepatite C (adaptado de Abbas et al.⁵). O vírus codifica um único polipeptídeo de 3 010 aminoácidos. A região 5' codifica o nucleocapsídeo e as regiões E1 e E2 codificam o invólucro.

Após a exposição, o período de incubação do vírus varia de duas a vinte e seis semanas, sendo o seu RNA identificável no sangue por uma a três semanas, concomitante ao aumento das transaminases séricas. A infecção persistente e a hepatite crônica são características da infecção pelo VHC. Apesar de esta infecção ser assintomática na fase aguda, a cirrose pode se manifestar após alguns anos. Um aspecto característico da infecção crônica pelo VHC são episódios de aumento das transaminases séricas, alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), com períodos de normalização subsequente (Figura 2)⁵.

Figura 2. Evolução dos marcadores sorológicos na infecção aguda pelo vírus da hepatite C, com progressão para infecção crônica (adaptado de Abbas et al.⁵). Elevação das transaminases séricas ocorre na fase aguda e na fase crônica de forma recorrente. VHC, vírus da hepatite C, ALT, alanina transaminase, AST, aspartato transaminase.

1.2. Hepatite C e doenças auto-imunes de tireóide

A associação da infecção pelo VHC e as doenças auto-imunes de tireóide é bastante controversa. Estudo de meta-análise recente sugeriu uma discreta associação entre doenças auto-imunes de tireóide e infecção pelo VHC quando infectados pelo VHC foram comparados com infectados pelo vírus da hepatite B e controles normais (16 % vs 10 %, “odds ratio” 1,6; intervalo de confiança 95% 1,4 – 1,9). Entretanto, persiste a divergência de resultados, especialmente considerando populações de origens étnicas diversas².

Os estudos apontam a presença de anticorpos antitireoidianos em associação com VHC em 2 até 48% dos casos², caracterizados por anticorpos inespecíficos, como anticorpos antitireoglobulina (anti-Tg) e

antimicrosomal, anticorpos antitireoperoxidase (anti-TPO) e antireceptor de TSH (TRAb)⁶⁻²⁰. O distúrbio hormonal mais frequentemente associado à infecção pelo VHC é o hipotireoidismo auto-imune¹⁵. Hipotireoidismo subclínico auto-imune e não auto-imune também podem ocorrer (2 a 13 %), assim como hipertireoidismo². Alguns fatores de risco estão associados à manifestação de doença auto-imune de tireóide nos infectados pelo VHC. A presença de anti-TPO é 4,4 vezes mais frequente em pacientes do sexo feminino infectadas por VHC, quando comparadas aos homens infectados¹³. Hipotireoidismo ocorre em 14 % dos pacientes com anti-TPO presente e infecção pelo VHC²¹.

1.2.1. Mecanismos de desenvolvimento de doenças auto-imunes de tireóide na infecção por VHC

Não se conhece os verdadeiros mecanismos que favorecem o desenvolvimento de doenças auto-imunes, especialmente a tireoidiana, em infectados crônicos pelo VHC. A identificação do vírus em tireócitos pode sugerir uma ação direta do vírus na célula tireoidiana^{22, 23}. Entretanto, o VHC é um RNA vírus e, portanto, não se incorpora ao DNA da célula hospedeira. Dessa forma, mecanismos indiretos, não genômicos, podem estar relacionados, como a participação de citocinas inflamatórias e a predisposição genética dos infectados.

Existem evidências de que o aumento da citocina IFN α endógena, induzido por infecções virais, favorece o desenvolvimento de doenças auto-imunes da tireóide em indivíduos predispostos geneticamente²⁴.

Existe aumento da citocina IFN-gama ($\text{IFN}\gamma$) em hepatócitos e linfócitos de infectados por VHC^{25, 26}. O grau de inflamação está relacionado diretamente com aumento dos níveis de $\text{IFN}\gamma$ na circulação. O $\text{IFN}\gamma$ age induzindo secreção da quimiocina CXCL10 em tireócitos e recrutando linfócitos T “helper” 1, auxiliar, que, por sua vez, secretam fator de necrose tumoral (TNF) e $\text{IFN}\gamma$, perpetuando o mecanismo de ativação da reação auto-imune²⁷. É conhecida a capacidade de $\text{IFN}\gamma$ intratireoidiano²⁸ favorecer o desenvolvimento de hipotireoidismo, assim como os altos níveis de CXCL10 podem fazê-lo²⁹. Estas citocinas podem ainda favorecer a expressão de antígenos por complexo de histocompatibilidade tipo II de tireócitos, determinado pelo antígeno de histocompatibilidade HLA-DR. Isto permite que a célula tireoidiana participe dos processos de apresentação de antígenos, favorecendo reações auto-imunes locais^{30, 31}.

A glicoproteína E2 do envelope do VHC também tem capacidade de se ligar a receptores de membrana CD81 expressos em tireócitos e induzir uma cascata de sinalização, com liberação de IL-8, uma citocina pró – inflamatória³².

1.2.2. Tratamento com $\text{IFN}\alpha$ e doenças auto-imunes de tireóide

O $\text{IFN}\alpha$ é um produto protéico de linfócitos B e macrófagos. Ele tem propriedades antiviral, antiproliferativa e imunomoduladora, e leva à exacerbação dos efeitos das células T citotóxicas e da resposta das células “natural killers” (NK). O $\text{IFN}\alpha$ é usado para tratamento de vários tumores, incluindo sarcoma de Kaposi e algumas leucemias³³.

Na hepatite C, o tratamento de escolha é o emprego do IFN α . Seu uso é indicado quando a biópsia hepática mostra atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e/ou presença de fibrose de moderada a intensa. O IFN α pode ser empregado na forma convencional, não peguilada, ou peguilada. Para melhorar a resposta virológica sustentada (RVS), o IFN α é comumente associado a outro antiviral, a ribavirina^{34, 35}. O clareamento natural do vírus e a RVS após tratamento têm sido associados a uma adequada resposta imunológica mediada por linfócitos T CD4+ e T CD8+³⁶.

Efeitos colaterais bem conhecidos do IFN α estão relacionados a sintomas similares a quadros virais, anormalidades hematológicas, distúrbios psiquiátricos e doenças tireoidianas, que podem levar à interrupção do tratamento em até 14 % e redução de dose em até 40% dos pacientes, prejudicando a resposta final ao tratamento³⁷.

Hipotireoidismo como efeito colateral do tratamento crônico com IFN α foi inicialmente descrito em pacientes com câncer de mama³⁸. Atualmente, as disfunções tireoidianas relacionadas ao uso de IFN α são mais observadas em pacientes infectados pelo VHC.

1.2.3. Manifestações de doença tireoidiana induzida pelo IFN α

As tireoidites induzidas por IFN α podem ser classificadas em auto-imunes ou não auto-imunes³⁹. As formas auto-imunes podem ser representadas por:

1. Tireoidite de Hashimoto,
2. Doença de Graves.

As formas não auto-imunes podem se manifestar como:

1. Tireoidite destrutiva,
2. Hipotireoidismo clínico ou hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos ausentes.

Em relação à tireoidite de Hashimoto, o aparecimento de anticorpos antitireoidianos, sem disfunção glandular, pode ocorrer em 1,9 até 40%. Pode ocorrer também elevação dos níveis dos anticorpos presentes previamente^{7, 40-50}.

As apresentações clínicas das disfunções tireoidianas induzidas pelo tratamento com IFN α podem ser hipotireoidismo ou hipertireoidismo. A doença tireoidiana clínica ocorre em 3,4 até 31,4% dos indivíduos com VHC tratados com IFN α . A frequência de remissão do distúrbio é bastante variável^{7, 40-50}.

O hipotireoidismo é a apresentação mais comum, diagnosticada pela elevação de TSH, com níveis de hormônios tireoidianos normais (hipotireoidismo subclínico) ou diminuídos (hipotireoidismo clínico). A manifestação clínica do hipotireoidismo pode ser confundida com os efeitos colaterais do próprio IFN α , como cansaço, astenia e depressão.

A etiologia do hipertireoidismo é mais difícil de diferenciar entre a fase inicial de uma tireoidite destrutiva da doença de Graves. A doença de Graves pode ser diagnosticada pela elevação dos hormônios tireoidianos e supressão do TSH, com aumento da captação de iodo radiomarcado na cintilografia de tireóide e detecção de TRAb. A doença de Graves necessita de tratamento com droga antitireoidiana e, muitas vezes, existe a

necessidade de suspensão do tratamento com IFN α . O acompanhamento é necessário, pois pode não haver remissão da doença de Graves com a interrupção do IFN α ^{51, 52}. Já a tireoidite destrutiva é caracterizada por um quadro de hipertireoidismo autolimitado e costuma ter evolução semelhante à tireoidite subaguda trifásica clássica. Na fase de hipertireoidismo, o diagnóstico é baseado na ausência de TRAb e baixa captação de iodo radiomarcado na cintilografia de tireóide. Segue-se, então, uma fase de hipotireoidismo e, posteriormente, ocorre a resolução com a normalização da função tireoidiana em semanas até meses. O hipotireoidismo pode eventualmente persistir, especialmente em casos associados ao desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos. A tireoidite destrutiva pode ainda recorrer no retratamento com IFN α ^{41, 44, 46, 47, 53, 54}.

A ultra-sonografia (US) da tireóide com Doppler colorido poderia auxiliar no diagnóstico diferencial entre a doença de Graves e a fase tóxica da tireoidite destrutiva. Como em casos de hipertireoidismo induzidos por amiodarona, a vascularização ausente da glândula tireóide poderia ser sugestiva de tireoidite destrutiva, refletindo um processo inflamatório agudo. Em oposição, a vascularização aumentada poderia indicar doença auto-imune⁵⁵.

1.2.4. Ribavirina

A ribavirina é um análogo nucleosídico sintético de adenosina ou guanosina. O emprego da droga não aumenta o risco de desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos em comparação à terapia isolada com IFN α .

Entretanto, a sua associação aumenta o risco de hipotireoidismo, possivelmente por induzir citocinas de resposta T “helper” 1, contribuindo para a citotoxicidade celular induzida pelo IFN α ⁵⁰.

1.3. CTLA4 e doenças auto-imunes de tireóide

O CTLA4, fator 4 associado ao linfócito T citotóxico, é uma glicoproteína de membrana expressa no linfócito T em resposta à ativação de seu receptor durante o processo de apresentação de antígeno.

A resposta imune tireoidiana se inicia a partir do processamento de antígenos protéicos captados por células apresentadoras de antígenos (macrófagos ou células dendríticas). Os peptídeos processados são apresentados aos linfócitos T a partir do complexo de histocompatibilidade (MHC) tipo I, correspondente aos HLA-A, B e C, ou tipo II, correspondente aos HLA-DR, DP e DQ, e reconhecidos pelos receptores de linfócito T (TCR). Células apresentadoras de antígeno não convencionais podem ser linfócitos B e T ativados, e outras células, como fibroblastos e tireócitos, quando se alteram e passam a expressar MHC tipo II. Estas células, entretanto, não apresentam moléculas co-estimuladoras necessárias para iniciar a resposta imune⁵⁶. Linfócitos T CD4+ (T “helper”) reconhecem MHC tipo II e linfócitos T CD8+ (T citotóxico) o MHC tipo I.

A ativação dos linfócitos depende de moléculas co-estimuladoras. As células apresentadoras de antígeno expressam na membrana celular MHC e CD40, enquanto linfócitos T nativos expressam TCR e CD28. A interação da célula apresentadora de antígeno, pelo MHC, com o linfócito T, pelo TCR,

aumenta a expressão pelo linfócito do ligante do CD40 (CD40L ou CD154). Por sua vez, a ligação do CD40 ao CD40L aumenta a expressão pela célula apresentadora de antígeno do receptor de membrana B7 (B7-1/B7-2). Esta molécula interage com CD28 do linfócito T ativando-o. A molécula B7 pode ainda se ligar ao CTLA4 do linfócito que, ao contrário, bloqueia a ativação linfocitária, atuando, portanto, como um regulador imune negativo (Figura 3)⁵⁷⁻⁵⁹. O linfócito T ativado secreta citocinas, como INF_γ , IL-2 e TNF, associadas à resposta imune celular (T “helper” 1), e também IL-4 e IL-5, associadas à resposta imune humoral, por estimular linfócitos B a secretar anticorpos (T “helper” 2)⁶⁰.

Figura 3. Mecanismo regulador de resposta imune pelo CTLA4. A apresentação de antígeno processado pela célula apresentadora ao linfócito T ocorre pela interação de MHC e TCR, o que promove aumento da expressão pelo linfócito T do ligante do CD40 (CD40L). A ligação do CD40 da célula apresentadora de antígeno ao CD40L aumenta a expressão do receptor B7 na célula apresentadora. Em A, a ligação de B7 da célula apresentadora de antígeno ao CD28 do linfócito T ativa a resposta imune. Em B, a ligação de B7 da célula apresentadora de antígeno ao CTLA4 do linfócito T bloqueia a ativação linfocitária. MHC, complexo de histocompatibilidade, TCR, receptor de linfócito T, CD40L, ligante de CD40.

O bloqueio da ativação linfocitária pelo CTLA4 pode ocorrer por 2 possíveis mecanismos. Um mecanismo é a sinalização negativa em resposta a ativação do receptor da célula T⁶¹. Esse mecanismo ocorre nos estágios iniciais da resposta imune, quando a expressão de CTLA4 e de B7 estão limitadas⁶². O outro mecanismo é através da competição na superfície celular do linfócito T entre CTLA4 e CD28, pela ligação com o receptor da célula apresentadora de antígeno B7. A ligação de B7 ao CTLA4 leva ao término da resposta imune através da limitação da sinalização mediada pelo CD28, anergia e apoptose da célula T^{63, 64}. A interação entre CTLA4 e B7 tem um papel importante na manutenção da tolerância imune periférica e, portanto, na auto-imunidade⁶⁵.

Alterações na molécula do CTLA4 poderiam diminuir sua capacidade de suprimir e controlar a proliferação de linfócitos T, deixando de ocorrer o bloqueio da resposta imune e favorecendo o aparecimento de doenças auto-imunes de tireóide. Existem evidências que camundongos deficientes de CTLA4 apresentam doença auto-imune linfoproliferativa extensa^{65, 66}.

O gene CTLA4 possui diversos marcadores polimórficos. Os mais frequentemente estudados em doenças auto-imunes da tireóide são quatro. O primeiro é a substituição de citosina (C) por timina (T) na posição -318 da região promotora (-318C>T). Esta alteração diminui a atividade promotora e consequente expressão do gene⁶⁷. O segundo é um dimorfismo de guanina (G) por adenina (A) na posição 49 do exon 1 (A49G), levando a substituição do aminoácido alanina por treonina no códon 17. Estudo *in vitro* mostrou que esta alteração diminuiu a glicosilação e a expressão do CTLA4 em superfície

celular⁶⁸. O terceiro é conhecido por CT60, em que há um dimorfismo de guanina (G) por adenina (A) na posição +6230. Esta troca diminui a expressão de RNA mensageiro do CTLA4⁶⁹. O quarto polimorfismo são repetições variáveis de dois pares de bases, adenina e timina, da região 3' não traduzida, conhecido como AT(n). Esta repetição AT(n) começa no nucleotídeo 642 do exon 4⁷⁰. Este marcador é altamente polimórfico, com pelo menos 23 alelos diferentes descritos, contendo de 7 a 30 repetições AT. O número aumentado de repetições AT diminui a estabilidade do RNA mensageiro do CTLA4, reduzindo sua expressão protéica⁷¹.

A associação dos polimorfismos do CTLA4 com as doenças auto-imunes de tireóide é controversa e variável conforme a população étnica analisada. A presença do alelo C na região promotora -318 confere maior risco de doença de Graves em alguns estudos^{72, 73}, apesar de não estar associado à doença em outros estudos, inclusive em pacientes do Brasil⁷⁴⁻⁷⁶. Sua relação com tireoidite de Hashimoto é ainda menos consistente^{73, 75}. O genótipo GG na posição 49 do exon 1 do gene do CTLA4 favoreceria o desenvolvimento de doença de Graves^{72, 77-86}, tireoidite de Hashimoto^{87, 88} ou mesmo o aparecimento de anticorpos antitireoidianos, sem disfunção hormonal⁸⁹. Porém estudos, como os de Namu Cury et al.⁹⁰, que avaliou indivíduos com doença de Graves no Brasil, não confirmaram estas associações^{72, 91}. O alelo G na região CT60 parece ser mais frequente em indivíduos acometidos pela doença de Graves e tireoidite de Hashimoto^{77, 92-94}. Finalmente, um maior número de repetições nucleotídicas AT na região 3'UTR do gene do CTLA4 é observada com maior frequência em pacientes

com doença de Graves e tireoidite de Hashimoto^{74, 77, 78, 95, 96}. Diante da diversidade de resultados, estudo de meta-análise identificou associação consistente de doença de Graves e tireoidite de Hashimoto apenas com o polimorfismo CT60⁹⁷.

Em indivíduos infectados pelo VHC, Schott et al. não encontraram diferença nas frequências dos polimorfismos -318C>T ou A49G no grupo de indivíduos infectados com VHC em relação aos controles⁹⁸. Outros estudos procuraram relacionar os polimorfismos do gene CTLA4 com a resposta ao tratamento com IFN α , o haplótipo -318C+49G favorece melhor resposta³⁶ e o haplótipo -318C+49A em homens confere maior risco de falha terapêutica⁹⁹.

Não existem grandes estudos que procuraram relacionar os polimorfismos do gene CTLA4 com risco de desenvolvimento de doenças auto-imunes de tireóide em indivíduos infectados pelo VHC, antes ou após o tratamento com IFN α . Até o momento, apenas um pequeno estudo, apresentado em anais de congresso¹⁰⁰, identificou a associação de tireoidite induzida por IFN α com o polimorfismo A49G do gene CTLA4.

Dessa forma, as presenças de disfunção tireoidiana e de anticorpos antitireoidianos podem estar relacionadas à infecção pelo VHC, surgindo ou piorando com o tratamento com IFN α . O conhecimento da função e auto-imunidade tireoidiana antes, durante e mesmo após o tratamento da VHC torna-se imprescindível para o seguimento dos pacientes portadores de VHC. Consequentemente, um melhor tratamento e seguimento destes

doentes poderiam ser proporcionados. Os polimorfismos do gene CTLA4 são importantes marcadores genéticos de suscetibilidade para desenvolvimento de disfunção tireoidiana e, se estudados em pacientes com VHC, poderiam ampliar o conhecimento da interação tireóide-VHC.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do nosso estudo foram:

1. Avaliar a função tireoidiana em pacientes infectados cronicamente pelo vírus de hepatite C,
2. Caracterizar as manifestações de doença tireoidiana antes, durante e após tratamento com IFN α ,
3. Estudar as frequências dos genótipos dos polimorfismos do gene CTLA4 em pacientes infectados cronicamente pelo vírus de hepatite C e suas associações com:
 - a. Características clínicas e laboratoriais,
 - b. Presença de disfunção tireoidiana,
 - c. Evolução durante o tratamento da hepatite C com IFN α e ribavirina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de pacientes

Este estudo foi aprovado e registrado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todos os pacientes e voluntários concordaram em participar deste estudo (Anexos A e B).

De janeiro de 2007 a julho de 2009, foram incluídos prospectivamente neste estudo, pacientes com diagnóstico de infecção crônica pelo vírus da hepatite C provenientes do Ambulatório de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). O diagnóstico de infecção crônica pelo VHC foi feito através de sorologia, com detecção de anticorpos anti-VHC, e confirmação através da detecção do RNA do VHC (Amplicor VHC, Roche Diagnostics Systems, EUA). Foram excluídos do estudo pacientes com infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) ou outras causas de doença hepática, gestantes, usuários de amiodarona e lítio, e pacientes com tratamento prévio com IFN α .

O grupo controle compreendeu voluntários normais do HC-FMUSP e doadores de sangue, provenientes do Hospital do Servidor Público Estadual, com função tireoidiana normal e ausência de anticorpos antitireoidianos e sorologia negativa para VHC, VHB e HIV. Foram excluídos do grupo controle, usuários de levotiroxina, lítio, amiodarona, drogas antitireoidianas e fórmulas para emagrecer.

A análise da frequência de doenças auto-imunes da tireóide levou em consideração apenas o grupo de doadores de sangue. O subgrupo destes doadores com disfunção hormonal ou presença de auto-imunidade tireoidiana não foi considerado para análise da frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 e do perfil hormonal.

3.1.1. Tratamento com IFN α

Foram submetidos ao tratamento com IFN α pacientes com critérios de indicação de acordo com os consensos de tratamento atuais e estabelecidos por Portaria vigente da Secretaria de Vigilância em Saúde número 24 de 16 de junho de 2005. Os critérios de indicação são:

1. portador do VHC identificado por detecção do RNA por técnicas moleculares de amplificação,
2. biópsia hepática, realizada nos últimos 24 meses, com evidências de atividade necro-inflamatória de moderada a intensa e presença de fibrose de moderada a intensa,
3. idade superior a 12 anos,
4. contagem de plaquetas superior a 50 000/mm³ e de neutrófilos superior a 1 500/mm³.

O esquema terapêutico empregado foi:

1. IFN α convencional (não-peguilado) associado à ribavirina em pacientes portadores de genótipos viral 2 ou 3 não cirrótico, por 24 semanas,
2. IFN α peguilado associado à ribavirina em pacientes portadores de genótipos viral 1 ou 4, genótipos 2 ou 3 cirrótico e co-infectados pelo HIV,

independente do genótipo viral. Todos por 48 semanas, desde que, após 12 semanas de tratamento, não ocorra detecção de RNA do VHC por teste quantitativo ou que exista uma redução maior ou igual a 100 vezes (2 logs) no número de cópias virais em relação à carga viral prévia ao tratamento.

3.2. Avaliação clínica

Os pacientes foram avaliados clinicamente no início do estudo e, aqueles submetidos ao tratamento com IFN α , a cada 12 semanas durante o tratamento.

Alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases foram medidas por método cinético automatizado. Os coeficientes de enzimas hepáticas, qALT and qAST, foram estabelecidos pela razão dos níveis séricos das aminotransferases por seus respectivos valores de referência. O genótipo viral foi determinado por ensaio de hibridização reversa, Line Probe Assay (INNO-LiPA HCV / VersantTM HCV Genotype Assay - Bayer Corporation, Tarrytown, NY, EUA).

A análise histológica hepática foi realizada pelo Departamento de Patologia do *Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo* utilizando critérios da Sociedade Brasileira de Hepatologia e Patologia¹⁰¹. O estadiamento da agressão hepática seguiu o estadiamento de atividade necro-inflamatória, variando de A0 a A4, e o estadiamento de alteração arquitetural, relacionado à fibrose, também variando de F0 a F4.

3.3. Avaliação tireoidiana

3.3.1. Avaliação hormonal

Foram dosados os níveis séricos de T3 total (T3T), T4 total (T4T), T4 livre (T4L) e TSH usando “kits” comerciais de fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) no início do estudo e a cada 12 semanas durante o tratamento com IFN α .

A globulina transportadora de hormônios tireoidianos (TBG) foi avaliada por ensaio comercial de quimioluminescência (DPC Biermann, Bad Nauheim, Alemanha).

Os níveis séricos de tireoglobulina foram dosados usando “kit” comercial de fluoroimunoensaio (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia).

3.3.2. Avaliação de auto-imunidade

Foram dosados anticorpos anti-Tg e anti-TPO através de “kit” comercial de fluoroimunoensaio indireto (AutoDELFIA®, Upsala, Turku, Finlândia) e anticorpo TRAb através de radioimunoensaio (RSR, Cardiff, Inglaterra) no início do estudo e a cada 12 semanas durante o tratamento com IFN α .

3.3.3. Definição de disfunção tireoidiana e doença auto-imune de tireóide

Foram diagnosticados hipotireoidismo clínico quando o nível sérico de TSH encontrava-se acima de 4,5 mUI/L e o de T4L inferior a 0,7 ng/dL; hipotireoidismo subclínico quando o nível de TSH estava acima de 4,5 mUI/L mas T4L dentro dos limites da normalidade; hipertireoidismo quando o nível

sérico de TSH encontrava-se suprimido (inferior a 0,03 mUI/L) e o de T4L acima de 1,5 ng/dL; e hipertireoidismo subclínico quando o nível de TSH encontrava-se inferior a 0,4 mUI/L e o de T4L dentro dos limites da normalidade.

A tireoidite de Hashimoto foi diagnosticada quando os níveis séricos de anticorpos anti-Tg ou anti-TPO encontravam-se acima de 35 mUI/L, e a doença de Graves quando o hipertireoidismo estava associado à presença de TRAb.

Todos os pacientes que apresentaram hipotireoidismo clínico foram tratados com levotiroxina sódica, após confirmação laboratorial. Os pacientes com hipotireoidismo subclínico, confirmados em novas avaliações, na presença de anti-TPO ou de nódulo de tireóide, também receberam tratamento com levotiroxina sódica.

3.3.4. Ultra-sonografia da tireóide

A avaliação por US da tireóide com Doppler colorido foi realizada imediatamente no início do estudo e após 12 meses do início do tratamento com IFN α . Os exames foram realizados sob a supervisão de um radiologista experiente (Dra. Maria Cristina Chammas) do Departamento de Radiologia – INRAD – HC-FMUSP, utilizando aparelho Phillips, com transdutor 7,5 a 12 mHz. As imagens ultra-sonográficas foram obtidas em modo-B, Doppler colorido de amplitude e Doppler pulsado e a documentação feita em meio digital. Foram avaliadas textura (homogênea ou heterogênea) e

ecogenicidade do parênquima, presença de nódulos, volume total e vascularização da glândula tireóide.

A vascularização glandular foi avaliada conforme classificação de Bogazzi et al. em: padrão 0, vascularização intraparenquimatosa ausente ou mínimos pontos; padrão I, presença de fluxo sanguíneo no parênquima com distribuição irregular ou heterogênea; padrão II, leve aumento no sinal do fluxo sanguíneo com distribuição irregular; e padrão III, aumento importante do fluxo sanguíneo com distribuição difusa e homogênea, incluindo o chamado inferno tireoidiano⁵⁵.

3.4. Avaliação de CXCL10

Os níveis séricos de CXCL10 foram avaliados por imunoensaio quantitativo para pesquisa, Invitrogen Human IP-10 ELISA (Invitrogen Corporation, Camarillo, EUA).

3.5. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4

3.5.1. Extração de DNA

Todas as amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico.

Quinze mL de sangue venoso foram colhidos em tubo contendo ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e o DNA extraído conforme previamente descrito¹⁰². Após a hemólise, o conteúdo do tubo foi transferido para tubo do tipo falcon, em que se adicionaram 30 mL de tampão de lise de hemácias (0,079 g de NH_4HCO_3 1 mM; 1 g de NH_4Cl 114 mM),

homogeneizou-se a solução por inversão e ela foi incubada em gelo por trinta minutos. O material foi, então, centrifugado a 3 000 rpm por quinze minutos a 4 °C e o procedimento repetido. O sobrenadante foi desprezado e 6 mL de tampão TEN (0,5 mL de Tris 10 mM, pH 8,0; 2 mL de EDTA 10 mM; 3,75 mL de NaCl 150 mM), 120 µL de SDS 10% e 80 µL de proteinase K (100 µg/mL) foram adicionados. Após homogeneização, a solução foi incubada por 16 horas a 37 °C. Adicionou-se, então, 2,4 mL de NaCl 6 M para nova centrifugação a 3 000 rpm, por quinze minutos, a 25 °C. O sobrenadante, contendo DNA desproteinizado, foi transferido para um tubo do tipo falcon e 40 mL de álcool etílico absoluto a 4 °C foram adicionados para precipitação. O DNA precipitado foi removido e submetido a três lavagens repetidas com 200 µL de álcool etílico a 70% e uma com álcool etílico a 100% para remover o excesso de sal. Após secar o material, o DNA foi ressuspendido em 800 µL de solução TE (50 µL de Tris-HCl 2 M, pH 7,5; 20 µL de EDTA 0,5 M, pH 8) e incubado a 37 °C por duas horas. Até a sua utilização, o DNA foi mantido a 4 °C.

As avaliações quantitativas e qualitativas das amostras de DNA foram realizadas através de leitura em espectrofotômetro Nano Drop 1000 Overview (Thermo Fisher Scientific, EUA). A qualidade de DNA ideal estabelecida foi de 1,75 entre as leituras nos comprimentos de onda 260 e 280 nm ($1,0 \text{ unidade DO } 260 = 50 \text{ µg/mL}$)¹⁰³. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) a 1% em TAE 1X concentrado (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0) contendo brometo de etídio (Sigma, St. Louis, MO,

EUA) na concentração de 0,5 µg/mL de gel. Um µl de cada amostra foi utilizado com 1 µL de “stop mix” (0,25 % de azul de bromofenol; 0,25 % de xilenocianol; 30 % de glicerol) e ØX174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, EUA) como padrão de tamanho molecular. O gel foi posteriormente visualizado em um transiluminador com luz ultravioleta para verificar a integridade do DNA.

3.5.2. Amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Todos os fragmentos foram amplificados por PCR em uma reação com volume final de 20 µL, onde aproximadamente 100 ng de DNA genômico de cada paciente foram adicionados a uma mistura contendo 10 pmol de cada iniciador, “primer”, 50 µM de dNTP, tampão específico da enzima, 0,01 mM de MgCl₂ e 0,25 U de Taq DNA polimerase (Promega Corporation, EUA) (Tabela 1). Para a amplificação, foi feita uma desnaturação inicial a 95 °C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, temperatura de anelamento, “annealing”, específica para cada polimorfismo estudado por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e, finalmente, uma extensão a 72 °C por 7 minutos (Tabela 1). Os protocolos foram modificados a partir de estudos existentes na literatura para análise dos polimorfismos -318C>T¹⁰⁴, A49G^{77, 89, 105}, CT60^{93, 94} e AT(n)^{106, 107}. Na amplificação para avaliação de AT(n), foi utilizado o “primer” reverso, “antisense”, marcado com fluorescência, FAM, para utilização em sequenciador automático.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na reação em cadeia de polimerase (PCR) e suas respectivas temperaturas de “annealing” dos iniciadores e tamanho dos fragmentos obtidos após amplificação.

Polimorfismo	Iniciadores (“sense” e “antisense”)	T °C	Tamanho esperado do fragmento
-318C>T	5'AAATGAATTGGACTGGATGGT3' 5'TTACGAGAAAGGAAGCCGTG3'	60 °C	247 pb
A49G	5'GCTCTACTTCCTGAAGACCT3' 5'AACCCAGGTAGGAGAAACAC3'	53 °C	207 pb
CT60	5'ATAATGCTTCATGAGTCAGCTT3' 5'GAGGTGAAGAACCTGTGTTAAA3'	56 °C	187 pb
AT(n)	5'GCCAGTGATGCTAAAGGTTG3' 5'AACATACGTGGCTCTATGCA3'*	57 °C	88 a 134 pb

T °C: temperatura de “annealing”, pb: pares de base, * marcado com fluorescência.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA) e Mastercycler Gradiente (Eppendorf, Alemanha).

Os produtos da amplificação foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1X concentrado (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0), contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL. Para a análise no gel de agarose, foram utilizados 2 µL de cada amostra e ØX174 RF DNA/Hae III Fragments (Invitrogen, Carlsbad, EUA) ou 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, EUA) como padrão de tamanho molecular.

3.5.3. PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”)

Para o polimorfismo -318C>T, 5 µL do produto amplificado foram incubados a 37° C com 0,6 U da enzima de restrição Mse I (New England Biolabs, EUA) por 16 horas. O produto digerido foi visualizado em gel de agarose a 1,5%. Os dois alelos foram identificados usando o seguinte método: o alelo C correspondia ao produto não digerido, ou seja, de 247 pares de base (pb); o alelo T aos produtos, digeridos, de 128 e 100 pb.

Para o polimorfismo A49G, foi usado 0,6 U da enzima Fnu4HI (New England Biolabs, EUA) com 5 µL do produto amplificado, incubados a 37° C por 16 horas. O produto digerido foi visualizado em gel de agarose a 1,5%. Os dois alelos foram identificados usando o seguinte método: o alelo A correspondia aos produtos, digeridos, de 143 e 63 pb; o alelo G correspondia aos produtos, digeridos, de 115 e 63 pb.

Para o polimorfismo CT60, foi utilizado 0,2 U da enzima de restrição HpyCH4IV (New England Biolabs, EUA) em 5 µL do produto amplificado, incubados a 40° C por 16 h. O produto digerido foi visualizado em gel de agarose a 1,5%. Os dois alelos foram identificados usando o seguinte método: o alelo A correspondia ao produto não digerido de 178 pb; o alelo G aos produtos, digeridos, de 107 e 71 pb.

Os sítios de reconhecimento das enzimas para cada polimorfismo estudado e as respectivas temperaturas utilizadas estão citados na Tabela 2.

Tabela 2 - Sítios de reconhecimento das enzimas Mse I, Fnu4HI e HpyCH4IV, temperatura utilizada e tempo de incubação de cada enzima para cada polimorfismo.

Polimorfismo	Enzima de Restrição	Sítio de reconhecimento	Temperatura e tempo de incubação
-318C>T	Mse I	5'... T [▼] T A A ... 3' 3'... A A T [▲] T ... 5'	37 °C por 16 horas
A49G	Fnu4HI	5'... G C [▼] N G C ... 3' 3'... C G N [▲] C G ... 5'	37 °C por 16 horas
CT60	HpyCH4IV	5'... A [▼] C G T ... 3' 3'... T G C [▲] A ... 5'	40 °C por 16 horas

3.5.4. Análise de fragmento através de eletroforese capilar

Para análise do polimorfismo AT(n), os produtos de PCR foram submetidos à análise de fragmento através de eletroforese capilar em sequenciador automático (ABI Prism 3130 xl Genetic Analyser, Applied Biosystems, EUA) e análise pelo software GeneScan Analysis (Applied Biosystems, EUA) para determinação do número de repetições AT. A identificação do número de repetições AT foi feita comparando-se os resultados com amostras de número já conhecido de repetições, identificadas por sequenciamento automático.

3.5.5. Sequenciamento automático

Para a confirmação dos polimorfismos, foi realizado o sequenciamento de algumas amostras, usadas como controles na PCR-RFLP para cada polimorfismo.

O equipamento utilizado para o sequenciamento foi ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, EUA), empregando o estojo comercial *Big Dye*

Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, EUA), e os mesmos iniciadores empregados na amplificação por PCR de cada polimorfismo.

Para a purificação do produto de PCR colocou-se 5 µL de amostra e 2 µL da enzima ExoSAP-IT em um termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA), por 15 minutos a 37 °C, seguido por 15 minutos a 80 °C. Na amostra purificada, foram adicionados 1,5 µL do tampão *Save Money*, 1 µL de reagente *Big Dye* e 0,5 pmol do iniciador específico para cada polimorfismo (“sense” ou “antisense”). A reação constituiu-se de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos em termociclador VERETI (Applied Biosystems, EUA). Posteriormente, a reação foi precipitada, adicionando-se 25 µL de álcool etílico absoluto, 1 µL de acetato de sódio 3 M e 1 µL de EDTA 125 mM. A reação foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente protegida da luz. A amostra foi centrifugada a 2 000 g por 45 minutos a 4 °C. Depois se descartou o sobrenadante, invertendo o tubo cuidadosamente sobre um papel absorvente. Para a precipitação da amostra, acrescentou-se 35 µL de álcool etílico a 70 % e, então, centrifugou-se a 1 650 g por 15 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida e sequenciadas diretamente.

Para análise das sequências foi utilizado o programa *Sequence Scanner v1.0* (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram comparadas com a sequência do gene CTLA4 disponível em banco de dados (www.ensembl.org - Ensemble Genome Browser).

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *SPSS13.0 for Windows* sob orientação de um estatístico. Todos os testes empregados foram bi-caudais e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

As variáveis categóricas foram apresentadas por valores absolutos e relativos (frequências). Comparações entre estas variáveis categóricas foram realizadas por teste chi-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher, com cálculo de risco relativo por “odds ratio” (OR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%).

As variáveis contínuas foram apresentadas por média $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP), com discriminação de valores mínimos e máximos, quando indicado. Os testes de normalidade empregados foram Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk, quando menos de 50 casos eram analisados. Quando apresentavam distribuição normal, as comparações entre as variáveis numéricas foram realizadas por teste “T-student” e “one-way” ANOVA, e quando apresentavam distribuição não normal, foram realizadas com testes Mann-Whitney U, Wilcoxon e Kruskal-Wallis.

A correlação entre as variáveis foi feita pelo cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (r).

Realizou-se transformação logarítmica para modelos de regressão linear, quando a distribuição não era normal. Empregou-se o modelo de regressão linear para estabelecer a relação entre níveis de TBG e hormônios

tireoidianos e de TBG e CXCL10. O modelo de regressão linear multivariada foi empregado para determinar a influência nos níveis de CXCL10 (variável dependente) de qALT, qAST, níveis de T3T, T4T e TBG e estadiamento de atividade inflamatória em biópsia hepática.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliações clínica e tireoidiana

4.1.1. *Indivíduos infectados por VHC*

No total, foram selecionados 112 pacientes com infecção crônica por VHC, sendo nove deles co-infectados por HIV, com idade média de $46,2 \pm 12,4$ anos (19,8 a 76,9). O grupo foi constituído de 47 indivíduos do sexo masculino e 65 do sexo feminino, sendo 94 caucasóides e 18 não-caucasóides.

Entre os pacientes infectados por VHC, 12 pacientes apresentaram doenças auto-imunes da tireóide (10,7%), sendo 10 casos de tireoidite de Hashimoto com presença de anticorpos antitireoidianos (anti-Tg ou anti-TPO) sem alterações hormonais, um caso de hipotireoidismo clínico e um caso de doença de Graves. Foram observados também sete casos de hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes (6,3%) e dois casos de hipertireoidismo subclínico com TRAb negativo (1,8%).

4.1.1.1. *Indivíduos infectados por VHC sem distúrbio tireoidiano*

Analisamos o perfil hormonal dos 91 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos, sejam alterações hormonais ou a presença de anticorpos antitireoidianos. Trinta e seis eram do sexo masculino, sendo 75 caucasóides e 16 não-caucasóides, e cinco co-infectados por HIV. A idade média foi de $46,4 \pm 12,3$ anos (19,8 a 76,9). Cinquenta e um deles estavam

infectados pelo genótipo viral 1, quatro pelo genótipo 2 e 27 pelo genótipo 3. Nove indivíduos não tiveram genótipo viral avaliado.

Os níveis séricos de T3T foram de 165 ± 37 ng/dL (73 a 274), com IC 95% de 112 a 246 ng/dL. Os níveis de T4T foram de $11,3 \pm 2,5$ µg/dL (5,5 a 20,4), com IC 95% de 7,8 a 15,2 µg/dL. Ambos, T3T e T4T, apresentaram distribuição normal ($p=0,087$ e $p=0,200$, respectivamente). Os limites de distribuição dos valores foram superiores aos limites da normalidade para o ensaio empregado (Figura 4). Os níveis séricos de T4L foram de $0,9 \pm 0,1$ ng/dL (0,6 a 1,4), com IC 95% de 0,7 a 1,2 ng/dL, e de TSH $1,7 \pm 0,8$ mUI/L (0,5 a 4,0), com IC 95% de 0,8 a 3,3 mUI/L. Nenhum, T4L ou TSH, apresentou distribuição normal ($p=0,031$ e $p<0,001$, respectivamente), mas ambos tinham limites de normalidade dentro dos limites do método (Figura 4).

Figura 4. Distribuição hormonal dos 91 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos. Nota-se a distribuição normal para os níveis de T3T e T4T, com os limites de distribuição superiores aos limites da normalidade. Não houve distribuição normal para os valores de T4L ou TSH.

- - - curva de normalidade sugerida para a população infectada por VHC

Valores de referência: T3T 40 a 180 ng/dL, T4T 4,5 a 12 µg/dL, T4L 0,7 a 1,5 ng/dL e TSH 0,4 a 4,5 mUI/L (fluoroimunoensaio).

Os níveis séricos de globulina transportadora de hormônios tireoidianos (TBG) foram de 31 ± 9 mg/L (7 a 65), sem distribuição normal, mas com valores de distribuição superiores aos limites da normalidade para o ensaio empregado (IC 95% 17 - 47 vs 14 - 31 mg/L) (Figura 5). Identificamos

correlação entre os níveis de TBG e de T3T (coeficiente de correlação de Spearman, $r=0,654$, $p<0,001$) e T4T ($r=0,741$, $p<0,001$). Por modelo de regressão linear após transformação logarítmica, foram atribuídos à variação de TBG 28,4% da variação de T3T e 41,7% da variação de T4T (Figura 6). Não identificamos correlação entre os níveis de TBG e T4L ($r=-0,116$, $p=0,330$).

Na avaliação ultra-sonográfica dos indivíduos infectados pelo VHC sem distúrbios tireoidianos, 85 indivíduos realizaram o exame de US, sendo que 65,9% apresentaram heterogeneidade e 11,8% hipoecogenicidade do parênquima. O volume glandular médio foi de $10,7 \pm 4,9$ gramas e 30,6% tinham nódulos tireoidianos. Sessenta e cinco pacientes realizaram a avaliação com Doppler, sendo que 26,2% apresentaram vascularização padrão I, 24,6% padrão II e 49,2% padrão III (Figura 7).

Figura 5. Distribuição dos níveis séricos de TBG dos 91 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos. Os valores de TBG foram superiores aos limites de normalidade do ensaio empregado.

- - - curva de normalidade sugerida para a população infectada por VHC
Valores de referência: TBG 14 a 31 mg/L (quimioluminescência).

Figura 6. A, Modelo de regressão linear da relação entre TBG e T3T após transformação logarítmica. B, Modelo de regressão linear da relação entre TBG e T4T após transformação logarítmica. São atribuídos à variação de TBG, 28,4% da variação de T3T e 41,7% da variação de T4T ($p<0,001$). Valores de referência: TBG 14 a 31 mg/L (quimioluminescência), T3T 40 a 180 ng/dL e T4T 4,5 a 12 µg/dL (fluoroimunoensaio).

Figura 7. Vascularização de parênquima tireoidiano em pacientes com infecção crônica por VHC no exame de ultra-sonografia de tireóide com Doppler colorido. A, Padrão I, representa fluxo sanguíneo no parênquima com distribuição irregular ou heterogênea. B, Padrão II, representa leve aumento no sinal do fluxo sanguíneo com distribuição irregular. C, Padrão III, representa aumento importante do fluxo sanguíneo com distribuição difusa e homogênea.

4.1.1.2. Indivíduos infectados por VHC com doenças auto-imunes de tireóide

Identificamos 12 indivíduos infectados pelo VHC com doenças auto-imunes de tireóide (10,7%), sendo sete do sexo feminino e 10 caucasóides. Apenas um era co-infectado por HIV. A idade média foi de $41,2 \pm 14,8$ anos (25,2 a 63,3). Oito deles estavam infectados pelo genótipo viral 1 e quatro pelo genótipo 3 (Tabela 3).

Dez indivíduos realizaram o exame de US. A heterogeneidade do parênquima foi descrita em 100% e hipoecogenicidade em 50%. O volume

glandular médio foi de $14,1 \pm 7,1$ gramas e 60% dos casos tinham nódulos. Onze por cento apresentaram vascularização padrão I, 22% padrão II e 67% padrão III em nove exames realizados (Tabela 3).

Tabela 3 – Características dos indivíduos infectados por VHC com doenças auto-imunes de tireóide (DAIT) e sem distúrbio tireoidiano.

	DAIT	Sem distúrbio tireoidiano	p
Número de indivíduos avaliados	12	91	
Idade (anos) média $\pm$ DP	$41,2 \pm 14,8$	$46,4 \pm 12,3$	0,241 ^a
Sexo (masculino / feminino)	5 / 7	36 / 55	0,889 ^b
Raça (caucasóides/não caucasóides)	10 / 2	75 / 16	1,0 ^c
HIV	1	5	0,534 ^c
Genótipo VHC			
1	8	51	-
2	0	4	-
3	4	27	-
1 e 2 vs 3	8 vs 4	55 vs 27	1,0 ^c
não avaliado	0	9	-
US tireóide*:			
Heterogeneidade (%)	10 (100)	56 (65,9)	0,027 ^b
Hipoecogenicidade (%)	5 (50,0)	10 (11,8)	0,002 ^b
Volume glandular em gramas	$14,1 \pm 7,1$	$10,7 \pm 4,9$	0,146 ^a
Presença de nódulos (%)	6 (60,0)	26 (30,6)	0,063 ^b
Vascularização (%)			
I	1 (11,1)	17 (26,2)	-
II	2 (22,2)	16 (24,6)	-
III	6 (66,7)	32 (49,2)	-
I e II vs III	3 vs 6	33 vs 32	0,481 ^c

^a teste Mann-Whitney.

^b teste Chi-quadrado de Pearson.

^c teste exato de Fisher.

* Frequência referente ao número de indivíduos que realizaram a avaliação do parâmetro.

Na comparação entre indivíduos com doenças auto-imunes de tireóide e aqueles sem distúrbios tireoidianos, não identificamos diferenças em relação a idade, sexo, raça, co-infecção por HIV ou genótipo do VHC (Tabela 3). As frequências de heterogeneidade e hipoecogenicidade do parênquima tireoidiano a US foram significativamente superiores naqueles

com doenças auto-imunes de tireóide ($p=0,027$ e $p=0,002$, respectivamente, OR para hipoecogenicidade do parênquima 7,5, IC 95% 1,8 - 30,5). Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à vascularização do parênquima tireoidiano. Entretanto, observamos elevada frequência de vascularização padrão III em ambos os grupos.

4.1.1.3. Indivíduos infectados por VHC com disfunção tireoidiana não auto-imune

Sete indivíduos infectados pelo VHC apresentaram hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos ausentes, sendo cinco do sexo masculino, todos caucasóides e três co-infectados por HIV. A idade média foi de $47,4 \pm 8,9$ anos (37,5 a 64,4). Três deles estavam infectados pelo genótipo viral 1, um pelo genótipo 2 e dois pelo genótipo 3, sendo que um caso não teve seu genótipo viral avaliado. Seis indivíduos realizaram exames de US que mostraram 100% de heterogeneidade de parênquima e 16,7% de hipoecogenicidade. O volume glandular médio foi de $11,3 \pm 4,1$ gramas e 33,3% dos casos tinham nódulos tireoidianos. Análise de vascularização com Doppler revelou, em cinco pacientes, 20% de vascularização padrão II e 80% padrão III (Tabela 4).

A única característica que diferenciou significativamente os indivíduos com hipotireoidismo subclínico com anticorpos negativos daqueles sem distúrbio tireoidiano foi a maior frequência de co-infectados por HIV ($p=0,011$, OR 12,9, IC 95% 2,2 – 74,05) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características dos indivíduos infectados por VHC com hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos negativos e sem distúrbio tireoidiano.

	Hipotireoidismo subclínico	Sem distúrbio tireoidiano	p
Número de indivíduos avaliados	7	91	
Idade (anos) média ± DP	47,4 ± 8,9	46,4 ± 12,3	0,983 ^a
Sexo (masculino / feminino)	5 / 2	36 / 55	0,126 ^b
Raça (caucasóides/não caucasóides)	7 / 0	75 / 16	0,595 ^b
HIV	3	5	0,011^b
Genótipo VHC			
1	3	51	-
2	1	4	-
3	2	27	-
1 e 2 vs 3	4 vs 2	55 vs 27	1,0 ^b
não avaliado	1	9	-
US tireóide*:			
Heterogeneidade (%)	6 (100)	56 (65,9)	0,171 ^b
Hipoecogenicidade (%)	1 (16,7)	10 (11,8)	0,549 ^b
Volume glandular em gramas	11,3 ± 4,1	10,7 ± 4,9	0,614 ^a
Presença de nódulos (%)	2 (33,3)	26 (30,6)	1,0 ^b
Vascularização (%)			
I	0 (0)	17 (26,2)	-
II	1 (20,0)	16 (24,6)	-
III	4 (80,0)	32 (49,2)	-
I e II vs III	1 vs 4	33 vs 32	0,358 ^b

^a teste Mann-Whitney.

^b teste exato de Fisher.

* Frequência referente ao número de indivíduos que realizaram a avaliação do parâmetro.

Apenas dois indivíduos infectados pelo VHC apresentaram hipertireoidismo subclínico com TRAb negativo, sendo um do sexo masculino, ambos caucasóides e nenhum co-infectado por HIV. A idade média foi de 58,2 ± 1,9 anos (56,9 e 59,6). Os dois casos estavam infectados pelo genótipo viral 1. As características de US foram de heterogeneidade de parênquima e ecogenicidade normal em 100%. O volume glandular médio foi de 9,0 ± 6,1 gramas e um caso tinha nódulo tireoidiano. O único caso com avaliação de vascularização com Doppler mostrou padrão III.

Não encontramos diferenças em características de indivíduos infectados com hipertireoidismo subclínico e anticorpos ausentes em relação aos indivíduos infectados sem distúrbios tireoidianos.

Todos os seis indivíduos co-infectados por HIV que realizaram US de tireóide com Doppler apresentaram aumento de vascularização glandular (padrão III) ($p=0,028$, padrão I e II vs padrão III), independente da presença ou não de distúrbio tireoidiano.

4.1.2. Indivíduos do grupo controle

Foram estudados para avaliação tireoidiana e de auto-imunidade 96 voluntários doadores de sangue. A idade média foi de $35,6 \pm 10,3$ anos (19 a 56), sendo 44 indivíduos do sexo masculino. Treze indivíduos apresentaram doenças auto-imunes de tireóide (13,5%), com 11 casos de anticorpos antitireoidianos presentes sem alterações hormonais, um caso de hipotireoidismo subclínico e um caso de doença de Graves. Identificamos também quatro casos de hipotireodismo subclínico com anticorpos negativos (4,2%) e um caso de hipertireoidismo subclínico com TRAb negativo (1,0%) (Tabela 5).

Apesar dos indivíduos infectados por VHC terem maior idade (média de idade $46,2 \pm 12,4$ anos vs $35,6 \pm 10,3$ anos, $p < 0,001$), não encontramos diferença estatística na frequência de distúrbios tireoidianos, auto-imunes ou não auto-imunes, entre os grupos.

Tabela 5 – Frequência de distúrbios tireoidianos em indivíduos infectados por VHC e doadores de sangue.

	VHC	Doadores	p
Número de indivíduos avaliados	112	96	-
Idade (anos)	46,2 ± 12,4	35,6 ± 10,3	< 0,001^a
Sexo (masculino / feminino)^b	47 / 65	44 / 52	0,575 ^b
Diagnósticos (%)			
1. Sem distúrbio tireoidiano	91 (81,2)	78 (81,3)	-
2. Doenças auto-imunes de tireóide	12 (10,7)	13 (13,5)	0,585 ^b
Anti-Tg e / ou anti-TPO +	10 (8,9)	11 (11,5)	0,590 ^b
Hipotireoidismo subclínico	0 (0)	1 (1,0)	0,465 ^c
Hipotireoidismo	1 (0,9)	0 (0)	1,0 ^c
Doença de Graves	1 (0,9)	1 (1,0)	1,0 ^c
3. Hipotireoidismo subclínico Ac-	7 (6,3)	4 (4,2)	0,756 ^c
4. Hipertireoidismo subclínico Ac-	2 (1,8)	1 (1,0)	1,0 ^c

+ presentes, Ac- anticorpos ausentes

^a teste Mann-Whitney

^b teste Chi-quadrado de Pearson

^c teste exato de Fisher

Os níveis hormonais dos 78 doadores de sangue sem distúrbios tireoidianos revelaram T4L $1,0 \pm 0,1$ ng/dL (0,7 a 1,5) e TSH de $1,8 \pm 0,9$ mUI/L (0,5 a 4,0). Os níveis séricos de T4L foram estatisticamente inferiores nos pacientes infectados por VHC quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Não observamos diferença nos níveis de TSH entre os grupos ($p = 0,450$) (Figura 8).

Figura 8. Representação da média e quartis dos níveis séricos de T4L e TSH de 78 doadores de sangue sem distúrbios tireoidianos e 91 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos (teste Mann-Whitney).

4.1.2.1. Avaliação pareada para sexo e idade entre controles e indivíduos infectados por VHC

Na tentativa de corrigir erros referentes à diferença de idade entre os grupos de infectados pelo VHC e de controles, as duas populações foram pareadas em relação a sexo e idade. Dessa forma, selecionou-se um subgrupo de indivíduos com idade variando de 30 a 55 anos. A idade média dos 73 indivíduos infectados pelo VHC selecionados (38 do sexo masculino) foi de $43,4 \pm 7,9$ anos. A idade média dos 60 doadores de sangue (29 do sexo masculino) foi de $41,5 \pm 7,1$ anos. Neste subgrupo, foram identificados cinco casos de doenças auto-imunes de tireóide entre os infectados pelo VHC (6,9%), sendo quatro casos de anticorpos antitireoidianos (anti-Tg ou anti-TPO) presentes sem alterações hormonais e um caso de doença de Graves. Além disso, encontramos seis casos de hipotireoidismo subclínico com anticorpos negativos (8,2%). Entre os doadores de sangue, nove casos tinham doenças auto-imunes de tireóide (15%), todos estes apenas com anticorpos antitireoidianos presentes sem alterações hormonais. Identificou-se quatro casos com hipotireoidismo subclínico e anticorpos ausentes (6,7%) e um caso com hipertireoidismo subclínico e TRAb ausente (1,7%) (Tabela 6).

Não houve diferença nas frequências dos distúrbios tireoidianos nos subgrupos pareados para sexo e idade ($p=0,125$).

Tabela 6 – Frequência de distúrbios tireoidianos em indivíduos infectados por VHC e doadores de sangue na faixa etária de 30 a 55 anos.

	VHC	Doadores	p
Número de indivíduos avaliados	73	60	-
Idade (anos) média ± DP	43,4 ± 7,9	41,5 ± 7,1	0,158 ^a
Sexo (masculino / feminino)^b	35 / 38	29 / 31	0,964 ^a
Diagnósticos (%):			
1. Sem distúrbio tireoidiano	62 (84,9)	46 (76,6)	-
2. Doenças auto-imunes de tireóide	5 (6,9)	9 (15,0)	0,125 ^b
<i>Anti-Tg e / ou anti-TPO +</i>	4 (5,5)	9 (15,0)	0,082 ^c
<i>Doença de Graves</i>	1 (1,4)	0 (0)	1,0 ^c
3. Hipotireoidismo subclínico Ac-	6 (8,2)	4 (6,7)	1,0 ^c
4. Hipertireoidismo subclínico Ac-	0 (0)	1 (1,7)	0,431 ^c

+ presentes, Ac- anticorpos ausentes.

^a teste Mann-Whitney.

^b teste Chi-quadrado de Pearson.

^c teste exato de Fisher.

Nos pacientes sem distúrbios tireoidianos, os valores hormonais foram de T4L $0,9 \pm 0,1$ ng/dL (0,6 a 1,4) nos 62 infectados pelo VHC e $1,0 \pm 0,2$ ng/dL (0,7 a 1,5) nos 42 controles. Os valores médios de TSH foram de $1,8 \pm 0,8$ mUI/L (0,5 a 4,0) nos infectados pelo VHC e $1,8 \pm 0,9$ mUI/L (0,5 a 4,0) nos controles. Os níveis séricos de T4L foram inferiores na população infectada por VHC em relação aos indivíduos controles ($p=0,002$). Não houve diferença nos níveis de TSH ($p=0,906$) (Figura 9).

Figura 9. Representação da média e quartis dos níveis séricos de T4L e TSH de 46 doadores de sangue sem distúrbios tireoidianos e 62 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos na faixa etária de 30 a 55 anos (teste Mann-Whitney).

4.2. Avaliação de CXCL10

Os níveis séricos de CXCL10 foram avaliados em 55 indivíduos infectados pelo VHC e 11 controles normais. Os níveis de CXCL10 foram significativamente superiores nos infectados, 406 ± 299 pg/mL (131 a 2 000), em relação aos normais, 222 ± 181 pg/mL (69 a 560) ($p=0,006$).

Nos pacientes infectados pelo VHC, avaliou-se a distribuição dos níveis de CXCL10 de acordo com características clínicas da infecção viral. Os níveis séricos de CXCL10 foram significativamente maiores em 32 infectados pelo genótipo viral 1, 424 ± 226 pg/mL (192 a 1 086), comparados com 14 infectados pelo genótipo 3, 273 ± 96 pg/mL (131 a 431) ($p=0,028$). Na comparação dos diferentes estádios de atividade necro-inflamatória na biópsia hepática, observou-se aumento progressivo dos níveis de CXCL10. Em 12 pacientes com estágio A1, os níveis de CXCL10 foram de 293 ± 179 pg/mL (131 a 836), em 26 pacientes com estágio A2, 328 ± 120 pg/mL (151 a 463), e em 16 pacientes com estágio A3, 519 ± 266 pg/mL (192 a 1 086) ($p=0,006$) (Figura 10). Não houve diferença significativa nos níveis de CXCL10 nos diferentes estádios de alteração arquitetural (fibrose). Em 11 pacientes com estágio F0, os níveis de CXCL10 foram 279 ± 86 pg/mL (131 a 431), em 22 pacientes com estágio F1, 331 ± 177 pg/mL (151 a 929), em seis pacientes com estágio F2, 477 ± 260 pg/mL (192 a 1 086), em quatro pacientes com estágio F3, 388 ± 217 pg/mL (234 a 541) e em nove pacientes com estágio F4, 508 ± 226 pg/mL (258 a 829) ($p=0,075$). As correlações dos níveis séricos de CXCL10 com enzimas hepáticas, ALT e AST, e seus respectivos coeficientes, qALT e qAST, foram estabelecidas.

Ocorreu correlação positiva de CXCL10 com ALT ($r=0,287$, $p=0,035$), qALT ($r=0,278$, $p=0,042$), AST ($r=0,426$, $p=0,001$) e qAST ($r=0,432$, $p=0,001$).

Figura 10. Representação da média e quartis dos níveis séricos de CXCL10 de 54 pacientes infectados por VHC agrupados conforme estágio de atividade necro-inflamatória em biópsia hepática (teste Kruskal-Wallis).

As correlações entre os níveis séricos de CXCL10 e níveis hormonais foram analisadas. Ocorreu correlação positiva com níveis de T3T ($r=0,388$, $p=0,003$), T4T ($r=0,444$, $p=0,001$) e TBG ($r=0,551$, $p<0,001$). Modelo de regressão linear, após transformação logarítmica, atribuiu à variação de TBG 26,6% da variação de CXCL10 (Figura 11). Não se identificou correlação entre os níveis de CXCL10 e T4L ($r=-0,129$, $p=0,349$) ou TSH ($r=0,062$, $p=0,652$).

Figura 11. Modelo de regressão linear da relação entre TBG e CXCL10 após transformação logarítmica. Atribui-se à variação de TBG, 26,6% da variação de CXCL10 ($p < 0,001$).

Os níveis séricos de CXCL10 não diferiram significativamente em pacientes infectados por VHC sem distúrbio tireoidiano (404 ± 305 pg/mL, variando de 131 a 2 000 pg/mL) em relação àqueles com DAIT (410 ± 334 pg/mL, variando de 234 a 1 086 pg/mL, $p=0,795$) ou com hipotireodismo subclínico com anticorpos ausentes (454 ± 56 pg/mL, variando de 414 a 494 pg/mL, $p=0,287$).

Da mesma forma, pacientes com diferentes achados ultra-sonográficos não tiveram diferenças significativas nos níveis séricos de CXCL10. Pacientes com parênquima homogêneo a US tinham níveis de CXCL10 de 505 ± 519 pg/mL e aqueles com parênquima heterogêneo, 379 ± 202 pg/mL ($p=0,984$). Os níveis séricos de CXCL10 dos indivíduos infectados pelo VHC com parênquima isoecóico foram de 396 ± 298 pg/mL e daqueles com parênquima hipoecóico, 490 ± 326 pg/mL ($p=0,451$). Pacientes com nódulos tireoidianos tinham níveis de CXCL10 de 374 ± 198 pg/mL e aqueles sem doença nodular 423 ± 342 pg/mL ($p=0,986$). Não houve correlação entre

níveis séricos de CXCL10 e volume glandular tireoidiano ($r=-0,095$, $p=0,488$).

O aumento progressivo de vascularização não foi acompanhado de aumento significativo dos níveis de CXCL10. Pacientes com padrão I apresentaram níveis de CXCL10 de 352 ± 160 pg/mL (192 a 836), aqueles com padrão II, 352 ± 208 pg/mL (131 a 928) e aqueles com padrão III, 467 ± 386 pg/mL (151 a 2 000) ($p=0,643$).

Em análise de regressão linear multivariada, foram identificados dois fatores com maior associação com os níveis séricos de CXCL10, após transformação logarítmica: TBG e qAST. O modelo de regressão atribuiu 38,9% da variação de CXCL10 a variações de TBG e qAST (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise multivariada de variáveis significativamente associadas a níveis séricos de CXCL10, após transformação logarítmica, de 51 pacientes infectados com infecção crônica por VHC.

Variáveis independentes	Coefficiente β padronizado	Efeito	p	r^2 do modelo múltiplo
Log TBG (mg/L)	0,464	Positivo	<0,001	0,389
Log qAST	0,342	Positivo	0,005	

Log TBG representa valores dos níveis séricos de globulina transportadora de hormônios tireoidianos após transformação logarítmica.

Log qAST representa valores dos coeficientes de aspartato aminotransferase após transformação logarítmica.

Coefficiente β padronizado se refere à relação entre as variáveis independentes e a variável dependente (CXCL10 após transformação logarítmica).

4.3. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4

Para avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4, estudou-se todos os 112 pacientes infectados por VHC e 183 controles normais, sem alterações hormonais e sem anticorpos antitireoidianos. A idade média dos controles

utilizados para a avaliação dos genótipos do CTLA4 foi de $35,5 \pm 10,2$ anos (18 a 61), sendo 115 do sexo feminino e 163 caucasóides.

4.3.1. Extração de DNA e PCR

Após a extração de DNA, realizamos PCR e todos os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e apresentaram o tamanho do fragmento esperado (Figura 12).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos amplificados dos polimorfismos do gene CTLA4. A coluna 1 indica o controle negativo da reação (reação exceto DNA). A coluna 2 indica o marcador de peso molecular (ØX). As colunas 3 a 9 indicam as amostras de cada paciente com os produtos amplificados de 247 bp (A), 207bp (B) e 178bp (C). Os painéis correspondem, respectivamente, aos polimorfismos -318C>T (A), A49G (B) e CT60 (C).

4.3.2. PCR-RFLP

As amostras foram então submetidas à técnica de PCR-RFLP. Os produtos digeridos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%.

Para o polimorfismo -318C>T, a presença do alelo C originou um produto não digerido, ou seja, de 247 pb. A presença do alelo T originou produtos, digeridos, de 128 bp e 100pb (Figura 13).

Polimorfismo -318C>T

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos digeridos pela enzima Mse I. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular (100 pb), a coluna 2 mostra a presença do alelo T em homozigose, as colunas 3 e 7 mostram a presença dos dois alelos C e T, indicando heterozigose e as colunas 4 a 6 e 8 a 11 mostram a presença do alelo C em homozigose.

Para o polimorfismo A49G, a presença do alelo A originou produtos, digeridos, de 141 pb e 63 pb. O alelo T originou produtos, digeridos, de 115 pb e 63 pb (Figura 14).

Polimorfismo A49G

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos digeridos pela enzima Fnu4HI. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular (100 pb), as colunas 2, 8 e 10 mostram a presença dos dois alelos A e G, indicando heterozigose, as colunas 3, 6 e 9 mostram a presença do alelo G em homozigose e as colunas 4, 5, 7, 11 e 12 mostram a presença do alelo A em homozigose.

Para o polimorfismo CT60, o alelo A originou um produto não digerido de 178 pb e o alelo G produtos, digeridos, de 107 pb e 71 pb (Figura 15).

Polimorfismo CT60

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% com os produtos digeridos pela enzima HpyCH4IV. A primeira coluna indica o marcador de peso molecular (100 pb). As colunas 2, 4, 10 e 11 mostram a presença dos dois alelos A e G, indicando heterozigose, as colunas 3, 5, 6, 7 e 9 mostram a presença do alelo G em homozigose e a coluna 8 mostra a presença do alelo A em homozigose.

4.3.3. Sequenciamento automático

Realizou-se o sequenciamento automático de algumas amostras para serem usadas como controles positivos e negativos da PCR-RFLP.

Também se realizou o sequenciamento automático de 10% das amostras, selecionadas aleatoriamente, a fim de confirmar a presença dos alelos obtidos pela técnica PCR-RFLP para cada polimorfismo (Figuras 16 a 18).

Polimorfismo -318C>T

Figura 16. Eletroesferogramas de partes do gene CTLA4 para análise do polimorfismo -318C>T. No painel A, a seta indica a presença do nucleotídeo C em homozigose. No painel B, a seta indica a presença do nucleotídeo T em homozigose. No painel C, a seta indica a presença dos nucleotídeos C e T indicando heterozigose.

Polimorfismo A49G

Figura 17. Eletroesferogramas de partes do gene CTLA4 para a análise do polimorfismo A49G. No painel A, a seta indica a presença do nucleotídeo A em homozigose. No painel B, a seta indica a presença do nucleotídeo G em homozigose. No painel C, a terceira seta indica a presença dos nucleotídeos A e G, indicando heterozigose.

Polimorfismo CT60

Figura 18. Eletroesferogramas de partes do gene CTLA4 para análise do polimorfismo CT60. No painel A, a seta indica a presença do nucleotídeo A em homozigose. No painel B, a seta indica a presença do nucleotídeo G em homozigose. No painel C, a seta indica a presença dos nucleotídeos A e G, indicando heterozigose.

4.3.4. Análise do polimorfismo AT(n)

Após o sequenciamento automático determinar o número de repetições AT, as mesmas amostras foram submetidas à eletroforese capilar, estabelecendo-se os seus tamanhos. O número de repetições AT de cada paciente ou controle foi determinado comparando-se os seus respectivos tamanhos na eletroforese capilar com os destas amostras previamente estudadas, através do programa *Genescan Analysis* (Figura 19).

Figura 19. A, Eletroesferograma mostrando o número de repetições AT da região 3'UTR do gene CTLA4. As setas delimitam a presença de 6 repetições AT. B, Resultado de análise de fragmento por eletroforese capilar pelo programa *Genescan Analysis* da mesma amostra AT(6). C, Resultado de análise de fragmento por eletroforese capilar correspondendo à amostra com 9 repetições AT. O número de repetições AT foi determinado por comparação do tamanho do fragmento obtido com o tamanho do fragmento da amostra anterior (B).

4.3.5. Análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os polimorfismos do gene CTLA4 -318C>T, A49G e CT60

Avaliamos a frequência dos alelos nas populações de infectados pelo VHC e controles, em conjunto e separadamente, para determinação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observamos que os polimorfismos -318C>T e CT60 estão em equilíbrio em nossa população estudada ($p=0,350$ e $p=0,530$, respectivamente), porém ainda não se atingiu equilíbrio referente

ao polimorfismo A49G ($p < 0,001$), tanto agrupando pacientes infectados pelo VHC e controles (Tabela 8), quanto cada grupo separadamente.

Tabela 8 – Avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos do gene CTLA4 pela frequência dos genótipos nas populações de infectados pelo VHC e controles.

VHC e normais (%)		p
Polimorfismo -318C>T		0,350
CC	244 (82,7)	-
CT	50 (17,0)	-
TT	1 (0,3)	-
Polimorfismo A49G		<0,001
AA	140 (47,5)	-
AG	101 (34,2)	-
GG	54 (18,3)	-
Polimorfismo CT60		0,530
AA	47 (15,9)	-
AG	148 (50,2)	-
GG	100 (33,9)	-

Teste Chi-quadrado de Pearson.

4.3.6. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4 nas populações de infectados por VHC e controles

O genótipo CC do polimorfismo -318C>T foi predominante nas duas populações estudadas (82,1% e 83,1%, nos infectados por VHC e controles, respectivamente). Para o polimorfismo A49G, houve predomínio do genótipo AA nas duas populações (52,7% e 44,3%, respectivamente). Para o polimorfismo CT60, o genótipo AG foi o mais frequente também nas duas populações (47,3% e 51,9%, respectivamente). As repetições AT(6) e (7) na região 3'UTR foram as mais frequentes nos dois grupos. A distribuição de cada genótipo estudado está na Tabela 9.

Tabela 9 – Características e frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em 112 indivíduos com infecção crônica por VHC e 183 controles normais.

	VHC	controles	p
Número de indivíduos avaliados	112	183	-
Sexo (masculino / feminino)	47 / 65	68 / 115	0,411 ^a
Raça (caucasóides / não caucasóides)	94 / 18	163 / 20	0,201 ^a
Polimorfismo -318C>T (%)			0,969 ^{a#}
CC	92 (82,1)	152 (83,1)	-
CT	19 (17,0)	31 (16,9)	-
TT	1 (0,9)	0 (0)	-
Alelo C	203	335	0,707 ^a
T	21	31	-
Polimorfismo A49G (%)			0,366 ^a
AA	59 (52,7)	81 (44,3)	-
AG	34 (30,3)	67 (36,6)	-
GG	19 (17,0)	35 (19,1)	-
Alelo A	152	229	0,192 ^a
G	72	137	-
Polimorfismo CT60 (%)			0,551 ^a
AA	21 (18,8)	26 (14,2)	-
AG	53 (47,3)	95 (51,9)	-
GG	38 (33,9)	62 (33,9)	-
Alelo A	95	147	0,590 ^a
G	129	219	-
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	2 (1,8)	2 (1,1)	0,636 ^b
6	45 (40,2)	74 (40,4)	0,965 ^a
7	42 (37,5)	83 (45,4)	0,185 ^a
8	10 (8,9)	5 (2,7)	0,019^a
9 a 15	2 (1,8)	5 (2,7)	0,713 ^b
16	2 (1,8)	8 (4,4)	0,328 ^b
17 a 32	9 (8,0)	6 (3,3)	0,071 ^a

[#] p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste Chi-quadrado de Pearson.

^b teste exato de Fisher.

Não encontramos diferenças nas frequências dos polimorfismos, exceto em relação ao número de repetições AT na região 3'UTR. A repetição AT(8) foi a mais frequente na população infectada pelo VHC (p=0,019, OR 3,49, IC 95% 1,2 - 10,5). Ocorreu uma tendência a maior frequência de

maior número de repetições AT (17 a 32) na população infectada por VHC ($p=0,071$, OR 0,89, IC 95% 0,9 - 7,4).

4.3.7. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4 nas populações de infectados por VHC com e sem distúrbios tireoidianos

Entre os 91 indivíduos infectados pelo VHC sem distúrbios tireoidianos, o genótipo CC do polimorfismo -318C>T foi mais frequente (81,3%). O genótipo AA do polimorfismo A49G predominou (53,8%), assim como o genótipo AG do polimorfismo CT60 (45,1%). Seis e sete repetições AT na região 3'UTR foram mais frequentes (40,7% e 39,5%, respectivamente) (Tabela 10).

Os genótipos mais frequentes nos 12 indivíduos infectados pelo VHC com doenças auto-imunes de tireóide foram CC do polimorfismo -318C>T (91,7%), AA do polimorfismo A49G (50%) e GG do polimorfismo CT60 (50%). As repetições AT(n) mais frequentes foram AT(6) e AT(7) (ambas 33,3%) (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em indivíduos infectados por VHC com doenças auto-imunes de tireóide (DAIT) e sem distúrbio tireoidiano.

	DAIT	Sem distúrbio tireoidiano	p
Número de indivíduos estudados	12	91	
Polimorfismo -318C>T (%)			0,664 ^{a#}
CC	11 (91,7)	74 (81,3)	-
CT	1 (8,3)	16 (17,6)	-
TT	0 (0)	1 (1,1)	-
Alelo C	23	164	0,705 ^a
T	1	18	-
Polimorfismo A49G (%)			
AA	6 (50,0)	49 (53,8)	-
AG	4 (33,3)	27 (29,7)	-
GG	2 (16,7)	15 (16,5)	-
Alelo A	16	125	0,842 ^b
G	8	57	-
Polimorfismo CT60 (%)			
AA	1 (8,3)	19 (20,8)	-
AG	5 (41,7)	41 (45,1)	-
GG	6 (50,0)	31 (34,1)	-
Alelo A	7	79	0,184 ^b
G	17	103	-
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
6	4 (33,3)	37 (40,7)	0,759 ^a
7	4 (33,3)	36 (39,5)	0,762 ^a
8	2 (16,7)	7 (7,7)	0,281 ^a
9 a 15	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
16	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
17 a 32	2 (16,7)	5 (5,5)	0,188 ^a

[#] p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste exato de Fisher.

^b teste Chi-quadrado de Pearson.

Entre os sete indivíduos infectados pelo VHC com hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos ausentes, predominaram os genótipos CC do polimorfismo -318C>T (85,7%), AA do polimorfismo A49G (42,8%) e AG do polimorfismo CT60 (71,4%). Seis, sete e o agrupamento de 17 a 32 repetições AT(n) tiveram a mesma frequência (28,6%) (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em indivíduos infectados por VHC com hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos negativos e sem distúrbio tireoidiano.

	Hipotireoidismo subclínico	Sem distúrbio tireoidiano	p
Número de indivíduos estudados	7	91	
Polimorfismo -318C>T (%)			1,0 ^{a#}
CC	6 (85,7)	74 (81,3)	-
CT	1 (14,3)	16 (17,6)	-
TT	0 (0)	1 (1,1)	-
Alelo C	13	164	1,0 ^a
T	1	18	-
Polimorfismo A49G (%)			
AA	3 (42,8)	49 (53,8)	-
AG	2 (28,6)	27 (29,7)	-
GG	2 (28,6)	15 (16,5)	-
Alelo A	8	125	0,373 ^b
G	6	57	-
Polimorfismo CT60 (%)			
AA	1 (14,3)	19 (20,8)	-
AG	5 (71,4)	41 (45,1)	-
GG	1 (14,3)	31 (34,1)	-
Alelo A	7	79	0,632 ^b
G	7	103	-
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
6	2 (28,6)	37 (40,7)	0,699 ^a
7	2 (28,6)	36 (39,5)	0,703 ^a
8	1 (14,2)	7 (7,7)	0,460 ^a
9 a 15	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
16	0 (0)	2 (2,2)	1,0 ^a
17 a 32	2 (28,6)	5 (5,5)	0,078 ^a

[#] p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste exato de Fisher.

^b teste Chi-quadrado de Pearson.

Os genótipos dos dois indivíduos com hipertireoidismo subclínico com TRAb negativo foram CC e CT do polimorfismo -318C>T, AA e AG do polimorfismo A49G. Ambos tinham o genótipo AG do polimorfismo CT60 e AT(6) na região 3'UTR.

4.3.8. Avaliação de polimorfismos do gene CTLA4 e genótipo do VHC

Avaliamos a relação dos polimorfismos do gene CTLA4 com a infecção por diferentes genótipos virais em 102 indivíduos com genótipo viral conhecido. Nos indivíduos infectados pelo genótipo 1, o genótipo CC do polimorfismo -318C>T foi mais frequente (76,5%), enquanto os genótipos AA do polimorfismo A49G (67,2%) e AG do polimorfismo CT60 (45,3%) foram predominantes. AT(6) foi mais frequente e esteve presente em 40,6% dos infectados. Em relação aos cinco pacientes infectados pelo genótipo 2 predominaram os genótipos do CTLA4 CC do polimorfismo -318C>T (80%), AA e AG do polimorfismo A49G (ambos 40%), AG do polimorfismo CT60 (60%) e 6 repetições AT na região 3'UTR (60%). Nos indivíduos infectados pelo genótipo viral 3, o genótipo CC do polimorfismo -318C>T foi mais frequente (97%), assim como AG do polimorfismo A49G (39,4%), AG do polimorfismo CT60 (48,5%) e AT(7) (45,4%).

Os polimorfismos -318C>T e A49G estiveram relacionados com infecção crônica pelos genótipos 1 e 3. A presença do alelo C na posição -318 apresentou associação negativa com a infecção pelo genótipo 1 ($p=0,020$, OR 0,19, IC 95% 0,04 - 0,85) e positiva com o genótipo 3 ($p=0,008$, OR 9,13, IC 95% 1,19 - 70,18). Da mesma forma, a presença do alelo G na posição 49 apresentou associação negativa com a infecção pelo genótipo 1 ($p=0,002$, OR 0,38, IC 95% 0,21 - 0,70) e positiva com a infecção pelo genótipo 3 ($p=0,004$, OR 2,49, IC 1,34 - 4,65) (Tabela 12).

Tabela 12 – Frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em 102 indivíduos infectados por VHC conforme genótipo viral conhecido.

	Genótipo 1	Genótipo 2	Genótipo 3
Número de indivíduos estudados	64	5	33
Polimorfismo -318C>T (%)			
CC	49 (76,5)	4 (80,0)	32 (97,0)
CT	14 (21,9)	1 (20,0)	1 (3,0)
TT	1 (1,6)	0 (0)	0 (0)
p*	0,026^a	0,586 ^a	0,018^a
Alelo C	112	9	65
T	16	1	1
p	0,020^a	1,0 ^a	0,008^a
Polimorfismo A49G (%)			
AA	43 (67,2)	2 (40,0)	12 (36,4)
AG	13 (20,3)	2 (40,0)	13 (39,4)
GG	8 (12,5)	1 (20,0)	8 (24,2)
p	0,012^b	-	0,023^b
Alelo A	99	6	37
G	29	4	29
p	0,002^b	0,496 ^a	0,004^b
Polimorfismo CT60 (%)			
AA	16 (25,0)	0 (0)	4 (12,1)
AG	29 (45,3)	3 (60,0)	16 (48,5)
GG	19 (29,7)	2 (40,0)	13 (39,4)
p	0,188 ^b	-	0,377 ^b
Alelo A	61	3	24
G	67	7	42
p	0,091 ^b	0,520 ^a	0,177 ^b
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	1 (1,6)	0 (0)	1 (3,0)
6	26 (40,6)	3 (60,0)	12 (36,4)
7	25 (39,0)	1 (20,0)	15 (45,4)
8	6 (9,4)	0 (0)	2 (6,1)
9 a 15	1 (1,6)	0 (0)	0 (0)
16	1 (1,6)	0 (0)	0 (0)
17 a 32	4 (6,2)	1 (20,0)	3 (9,1)

* p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste exato de Fisher.

^b teste Chi-quadrado de Pearson.

4.4. Avaliação de distúrbios tireoidianos relacionados ao tratamento com IFN α

Um grupo de 30 indivíduos, 13 homens e 17 mulheres, com infecção crônica por VHC foi submetido a tratamento com IFN α associado à ribavirina. A idade média foi de $43,8 \pm 11,4$ anos. Deste grupo, 23 indivíduos

não apresentavam alterações hormonais ou presença de anticorpos antitireoidianos e quatro eram eutireoidianos com presença de anticorpos antitireoidianos (somente anti-Tg em três e anti-Tg e anti-TPO em um). Além disso, um tinha diagnóstico de hipotireoidismo auto-imune e dois hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes prévios ao tratamento.

Os três últimos indivíduos, já com alterações hormonais prévias ao tratamento, foram excluídos das análises posteriores (Figura 20). A paciente com hipotireoidismo auto-imune apresentou necessidade crescente de reposição de levotiroxina e elevação dos títulos de anticorpos antitireoidianos durante o uso do IFN α . Entretanto, houve uso irregular da levotiroxina por indisposição gastrointestinal causada pelo IFN α . Os dois pacientes com hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes antes do tratamento permaneceram desta forma durante o tratamento com IFN α .

Como estudos prévios não avaliaram ou não consideraram a presença de TRAb como doença auto-imune induzida por IFN α , preferimos também excluir o único caso que desenvolveu TRAb (TRAb 78%), sem alterações hormonais, com posterior negatificação do achado.

Durante e após o tratamento com IFN α , 14 pacientes permaneceram sem alterações hormonais e sem desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos (54%). Três indivíduos eutireoidianos com anticorpos antitireoidianos antes do tratamento (somente anti-Tg com títulos inferiores a 100 UI/L) permaneceram sem distúrbio hormonal (11%). Não foram avaliados os títulos dos anticorpos ao longo do uso de IFN α .

As tireoidites induzidas por IFN α ocorreram da seguinte forma:

1. Manifestações auto-imunes em cinco casos (19%): três desenvolveram anticorpos antitireoidianos *de novo* sem alterações hormonais (dois somente anti-Tg e um anti-Tg e anti-TPO) e dois hipotireoidismo (TSH elevado com anti-Tg e anti-TPO presentes).
2. Manifestações não auto-imunes em quatro casos (16%): duas tireoidites destrutivas e dois casos de hipotireoidismo subclínico com anticorpos antitireoidianos ausentes.

O tempo médio para início de distúrbios tireoidianos foi de $6,2 \pm 3,3$ meses.

Figura 20. Pacientes com infecção crônica por VHC submetidos a tratamento com IFN α associado à ribavirina. Para análise da frequência dos distúrbios tireoidianos induzidos por IFN α , avaliamos 26 indivíduos sem distúrbio hormonal prévio. Excluimos das análises casos de hipotireoidismo clínico ou subclínico prévios e um caso de eutireoidismo com TRAb presente após o tratamento. n corresponde ao número de pacientes, Ac anticorpo antitireoidiano (anti-Tg ou anti-TPO), + presente, - ausente, * frequência dos indivíduos analisados. - - - agrupa tireoidite induzida por IFN α , auto-imune (superior) e não auto-imune (inferior).

4.4.1. Avaliação dos infectados por VHC tratados com IFN α sem distúrbio tireoidiano durante ou após o tratamento

Quatorze pacientes (oito do sexo masculino) receberam IFN α associado à ribavirina, sendo cinco IFN α convencional por 24 semanas e nove IFN α peguilado por $39 \pm 15,4$ semanas (12 a 59) ($p=0,112$). A idade média no início do tratamento foi de $44,9 \pm 12,7$ anos (25 a 68), todos eram caucasóides e dois co-infectados por HIV. Oito deles estavam infectados pelo genótipo viral 1 e seis pelo genótipo viral 3.

Os níveis séricos hormonais médios, antes do tratamento com IFN α , foram de T3T 185 ± 36 ng/dL (131 a 274), T4T $11,9 \pm 2,0$ μ g/dL (8,9 a 15,8), T4L $0,9 \pm 0,1$ ng/dL (0,76 a 1,14) e TSH $1,8 \pm 0,7$ mUI/L (0,98 a 3,15). Os níveis séricos de T3T apresentaram redução significativa ao longo do período de seguimento ($p=0,038$). Os níveis de T4T apresentaram redução significativa com 3 ($p=0,039$) e 12 meses ($p=0,008$) em relação ao início do tratamento. Os níveis séricos de TSH e T4L permaneceram estáveis. Ocorreu redução de lesão hepatocelular precocemente, evidenciada por diminuição dos níveis séricos de ALT ($p=0,055$) (Tabela 13 e Figura 21).

Doze dos pacientes sem distúrbio tireoidiano antes ou após o tratamento realizaram US de tireóide antes do início do IFN α e ribavirina. Apresentaram heterogeneidade de parênquima 92% e 17% hipoecogenicidade. O volume glandular médio foi de $12,6 \pm 6,8$ gramas e 41,7% tinham nódulos tireoidianos. A avaliação da vascularização glandular apresentou padrão I em 25% dos exames, padrão II em 17% e padrão III em 58%. Após o tratamento, 11 indivíduos realizaram novos exames de US de

tireóide, em média após $10,2 \pm 3,6$ meses do início. Heterogeneidade de parênquima foi identificada em 82% e hipoecogenicidade em 18%. O volume glandular médio foi de $12,7 \pm 5,7$ gramas e 36,4% tiveram nódulos identificados nos exames, todos estes já observados no exame inicial. A análise da vascularização glandular, avaliada em nove casos, apresentou padrão I em 11%, padrão II em 67% e padrão III em 22%. Todas as características avaliadas tiveram correlação antes e após tratamento, com exceção da hipoecogenicidade e vascularização, que diminuiu de maneira não significativa após o tratamento (padrão I e II vs III, $p=0,167$) (Tabela 14).

Tabela 13 – Evolução de hormônios tireoidianos, TSH, tireoglobulina e transaminases durante e após tratamento com IFN α em 14 indivíduos infectados por VHC que permaneceram sem distúrbio tireoidiano com o tratamento com IFN α .

	Início (n)	3 meses (n)	6 meses (n)	9 meses (n)	12 meses (n)	p
T3T ng/dL	185 ± 36 (14)	153 ± 25 (6)	156 ± 17 (11)	151 ± 34 (4)	147 ± 30 (8)	0,038
T4T μg/dl	$11,9 \pm 2,0$ (14)	$11,7 \pm 2,4$ (6)	$11,5 \pm 2,1$ (11)	$11,1 \pm 3,6$ (4)	$10,0 \pm 2,5$ (7)	0,446
T4L ng/dL	$0,9 \pm 0,1$ (14)	$0,9 \pm 0,1$ (7)	$0,8 \pm 0,1$ (11)	$0,9 \pm 0,1$ (4)	$0,9 \pm 0,2$ (8)	0,891
TSH mUI/L	$1,8 \pm 0,7$ (14)	$2,2 \pm 0,7$ (6)	$1,6 \pm 0,8$ (11)	$2,0 \pm 0,6$ (4)	$2,0 \pm 0,9$ (8)	0,621
Tg ng/dL	$41,6 \pm 53,8$ (13)	$49,1 \pm 75,1$ (6)	$50,2 \pm 74,3$ (10)	$118,0 \pm 113,6$ (4)	$15,7 \pm 14,9$ (7)	0,325
AST UI/L	73 ± 62 (13)	42 ± 25 (7)	34 ± 23 (11)	36 ± 29 (3)	36 ± 28 (8)	0,221
ALT UI/L	71 ± 54 (13)	36 ± 30 (7)	28 ± 21 (11)	33 ± 37 (3)	32 ± 30 (8)	0,055

n número de pacientes avaliados. Valores de referência: T3T 40 a 180 ng/dL, T4T 4,5 a 12 μg/dL, T4L 0,7 a 1,5 ng/dL, TSH 0,4 a 4,5 mUI/L, Tg (tireoglobulina) < 55 ng/dL, AST < 37 e < 31 UI/L (sexo masculino e feminino, respectivamente) e ALT < 41 e < 31 UI/L (sexo masculino e feminino, respectivamente). Teste Kruskal-Wallis.

Figura 21. Evolução durante e após tratamento com IFN α de hormônios tireoidianos, TSH, tireoglobulina e transaminases de 14 indivíduos infectados por VHC que permaneceram sem distúrbios tireoidianos após o tratamento. Níveis séricos de T3T reduziram ao longo do tratamento, concomitante a redução de ALT (teste Kruskal-Wallis). Níveis séricos de T4T reduziram significativamente com 3 e 12 meses de tratamento (teste Mann-Whitney).

* $p=0,039$ em 3 meses do início do tratamento, # $p=0,008$ em 12 meses do início do tratamento. Valores de referência: T3T 40 a 180 ng/dL, T4T 4,5 a 12 μ g/dL, T4L 0,7 a 1,5 ng/dL, TSH 0,4 a 4,5 mUI/L, Tg < 55 ng/dL, AST < 37 e < 31 UI/L (sexo masculino e feminino, respectivamente) e ALT < 41 e < 31 UI/L (sexo masculino e feminino, respectivamente).

Tabela 14 – Características ultra-sonográficas durante e após tratamento com IFN α e ribavirina em 14 indivíduos infectados por VHC que permaneceram sem distúrbio tireoidiano durante e após o tratamento.

	Início	Após	Coefficiente de correlação (p)
US tireóide*:			
Heterogeneidade	11 (92%)	9 (82%)	0,671 (0,024)
Hipoecogenicidade	2 (17%)	2 (18%)	0,389 (0,237)
Volume glandular em gramas	12,6 $\pm$ 6,8	12,7 $\pm$ 5,7	0,882 (<0,001)
Presença de nódulos	5 (42%)	4 (36,4%)	1,0 (<0,001)
Vascularização			0,650 (0,058)
I	3 (25%)	1 (11%)	-
II	2 (17%)	6 (67%)	-
III	7 (58%)	2 (22%)	-
I e II vs III	5 vs 7	7 vs 2	0,598 (0,089)

* Frequência referente ao número de indivíduos que realizaram a análise do parâmetro avaliado.

p refere ao coeficiente de correlação de Spearman.

Na avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4 nestes 14 indivíduos, identificamos que o genótipo CC do polimorfismo -318C>T foi mais frequente (71,4%). Além disso, predominaram os genótipos AA do polimorfismo A49G (42,9%), GG do polimorfismo CT60 (42,9%) e 6 e 7 repetições AT na região 3'UTR (42,9% cada).

4.4.2. Avaliação dos infectados por VHC com tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α

Cinco indivíduos desenvolveram doenças auto-imunes induzidas pelo tratamento com IFN α , todos do sexo feminino e caucasóides, sendo apenas um co-infectado por HIV (Figura 20). A idade média no início do tratamento foi de 35,6 $\pm$ 10,3 anos (24 a 46). Quatro deles estavam infectados pelo

genótipo viral 1 e um pelo genótipo viral 3. Todos os cinco indivíduos receberam IFN α peguilado associado à ribavirina (Tabela 15).

Os níveis séricos hormonais médios, antes do tratamento com IFN α , foram T3T $191,8 \pm 27,7$ ng/dL (154 a 226), T4T $13,2 \pm 2,5$ μ g/dL (10,3 a 17,2), T4L $0,9 \pm 0,1$ ng/dL (0,83 a 0,99) e TSH $1,8 \pm 1,4$ mUI/L (0,95 a 4,24) (Tabela 15).

Todos realizaram US de tireóide antes do início do IFN α . Foram observados 100% de heterogeneidade e 20% de hipoeogenicidade do parênquima. O volume glandular médio foi de $9,3 \pm 2,8$ gramas e 20% tinham nódulos tireoidianos. Em quatro avaliações de vascularização glandular, identificou-se 25% de padrão II e 75% de padrão III. Após o tratamento, apenas dois indivíduos realizaram US de tireóide, em média $12,0 \pm 1,6$ meses após o início do tratamento. As características observadas foram 100% de heterogeneidade e 50% de hipoeogenicidade de parênquima. O volume glandular médio foi de $12,3 \pm 0,7$ gramas e nenhum deles desenvolveu nódulos. A vascularização glandular foi padrão II em um caso e padrão III no outro (Tabela 15).

Todos os cinco pacientes apresentavam genótipo CC do polimorfismo - 318C>T. Os genótipos predominantes foram AG tanto do polimorfismo A49G quanto do CT60 (ambos 60%) e identificou-se seis repetições AT na região 3'UTR em 60% (Tabela 16).

Tabela 15 - Características dos 5 casos de tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α e 14 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos após o tratamento com IFN α e ribavirina.

	Tireoidite auto-imune	Sem distúrbio tireoidiano	P
Número de indivíduos avaliados	5	14	-
Tempo para diagnóstico (meses)	6,7 $\pm$ 3,5	-	-
Idade (anos) média $\pm$ DP	35,6 $\pm$ 10,3	44,9 $\pm$ 12,7	0,156 ^a
Sexo (masculino / feminino)	0 / 5	8 / 6	0,045^b
Raça (caucasóides/não caucasóides)	5 / 0	14 / 0	-
HIV	1	2	1,0 ^b
Genótipo VHC			
1	4	8	-
2	0	0	-
3	1	6	-
1 vs 3	4 vs 1	8 vs 6	0,363 ^b
IFN α			0,257 ^b
Convencional	0	5	-
Peguilado	5	9	-
Tempo de tratamento (semanas)	39,6 $\pm$ 9,8	33,6 $\pm$ 14,2	0,391 ^b
Antes IFN α :			
T3T ng/dL	191,8 $\pm$ 27,7	184,7 $\pm$ 35,8	0,622 ^a
T4T μ g/dL	13,2 $\pm$ 2,5	11,9 $\pm$ 2,0	0,298 ^a
T4L ng/dL	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,754 ^a
TSH mUI/L	1,8 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 0,7	0,343 ^a
US tireóide antes*			
Heterogeneidade (%)	5 (100)	11 (91,7)	1,0 ^b
Hipoecogenicidade (%)	1 (20,0)	2 (16,7)	1,0 ^b
Volume glandular em gramas	9,3 $\pm$ 2,8	12,6 $\pm$ 6,8	0,506 ^a
Presença de nódulos (%)	1 (20,0)	5 (41,7)	0,600 ^b
Vascularização (%)			
I	0	3 (25,0)	-
II	1 (25,0)	2 (16,7)	-
III	3 (75,0)	7 (58,3)	-
I e II vs III	1 vs 3	5 vs 7	1,0 ^b
US tireóide após*			
Tempo após início IFN α (meses)	12 $\pm$ 1,6	10,2 $\pm$ 3,5	0,641 ^a
Heterogeneidade (%)	2 (100)	9 (81,8)	1,0 ^b
Hipoecogenicidade (%)	1 (50,0)	2 (18,2)	0,423 ^b
Volume glandular em gramas	12,3 $\pm$ 0,7	12,7 $\pm$ 5,7	0,923 ^a
Presença de nódulos (%)	0 (0)	4 (36,4)	1,0 ^b
Vascularização (%)			
I	0 (0)	1 (11,1)	-
II	1 (50,0)	6 (66,7)	-
III	1 (50,0)	2 (22,2)	-
I e II vs III	1 vs 1	7 vs 2	0,491 ^b

^a teste Mann-Whitney.

^b teste exato de Fisher.

* Frequência referente ao número de indivíduos que realizaram a avaliação do parâmetro.

Tabela 16 – Frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em 5 casos de tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α e 14 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos após o tratamento com IFN α e ribavirina.

	Tireoidite auto-imune	Sem distúrbio tireoidiano	p
Polimorfismo -318C>T (%)			0,522 ^{a#}
CC	5 (100)	10 (71,4)	-
CT	0 (0)	3 (21,5)	-
TT	0 (0)	1 (7,1)	-
Alelo C	10	23	0,298 ^a
T	0	5	-
Polimorfismo A49G (%)			
AA	0 (0)	6 (42,9)	-
AG	3 (60,0)	5 (35,7)	-
GG	2 (40,0)	3 (21,4)	-
Alelo A	3	17	0,144 ^a
G	7	11	-
Polimorfismo CT60 (%)			
AA	0 (0)	3 (21,4)	-
AG	3 (60,0)	5 (35,7)	-
GG	2 (40,0)	6 (42,9)	-
Alelo A	3	11	0,715 ^a
G	7	17	-
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	0 (0)	1 (7,1)	1,0 ^a
6	3 (60,0)	6 (42,9)	0,628 ^a
7	2 (40,0)	6 (42,9)	1,0 ^a
8	0 (0)	1 (7,1)	1,0 ^a

[#] p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste exato de Fisher.

4.4.2.1. Hipotireoidismo auto-imune induzido por IFN α

Dois casos desenvolveram tireoidite de Hashimoto com hipotireoidismo. O primeiro caso foi uma mulher de 26 anos submetida a tratamento com IFN α peguilado por apresentar genótipo viral 1. Apresentava anti-Tg de 152 UI/L e anti-TPO 89 UI/L antes do tratamento. O exame de US de tireóide prévio ao tratamento evidenciou heterogeneidade, hipoecogenicidade e aumento de vascularização do parênquima (padrão III),

volume glandular de 11,7 gramas e sem nódulos. O diagnóstico de hipotireoidismo foi feito com 6,2 meses do tratamento, por apresentar nível de TSH de 123,04 mUI/L, sem queixas específicas. Foi, então, iniciado tratamento com levotiroxina. A paciente não realizou US de tireóide após o tratamento.

O segundo caso foi de uma mulher de 24 anos, também submetida a tratamento com IFN α peguilado por apresentar genótipo viral 1. Seus anticorpos antitireoidianos prévios eram negativos. O exame de US de tireóide prévio ao tratamento apresentou heterogeneidade e ecogenicidade normal de parênquima, volume glandular de 5,9 gramas, sem nódulos. A vascularização glandular não foi avaliada. O diagnóstico de hipotireoidismo foi feito com 8,4 meses do tratamento, apresentando níveis de TSH de 128,4 mUI/L e de anticorpos anti-Tg de 245 UI/L e anti-TPO de 755 UI/L. A US de tireóide realizada após 10,9 meses de tratamento apresentou heterogeneidade, com aparecimento de hipoecogenicidade do parênquima e aumento de vascularização (padrão III). O volume glandular foi de 12,8 gramas, com aumento de 117% em relação ao início, permanecendo sem nódulos.

Ao compararmos as características do grupo de infectados por VHC com tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α e do grupo de 14 indivíduos sem distúrbios tireoidianos, pudemos verificar que o sexo feminino apresentou-se como fator de risco para o desenvolvimento de tireoidites auto-imunes ($p=0,045$) (Tabela 15). Além disso, os dois casos de

hipotireoidismo auto-imune após o tratamento foram significativamente mais jovens ($25 \pm 1,4$ anos) em relação aos sem distúrbios tireoidianos ($p=0,050$).

Não conseguimos identificar qualquer diferença significativa entre os dois pacientes que desenvolveram hipotireoidismo auto-imune e os três que permaneceram eutireoidianos, apesar do desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos com o tratamento.

4.4.3. Avaliação dos infectados por VHC com tireoidites não auto-imunes induzidas por IFN α

Quatro pacientes apresentaram tireoidites não auto-imunes induzidas pelo tratamento com IFN α , dois do sexo feminino, todos caucasóides e apenas um co-infectado por HIV (Figura 20). A idade média no início do tratamento foi de $48,5 \pm 5,7$ anos (41 a 53). Dois deles estavam infectados pelo genótipo viral 1, um pelo genótipo 2 e um pelo genótipo viral 3. Três receberam IFN α peguilado associado à ribavirina e um IFN α convencional (Tabela 17).

Os níveis séricos hormonais médios, antes do tratamento com IFN α , foram T3T $141,8 \pm 17,7$ ng/dL (124 a 165), T4T $8,8 \pm 0,7$ μ g/dL (8,2 a 9,7), T4L $0,8 \pm 0,1$ ng/dL (0,8 a 1,0) e TSH $3,1 \pm 1,2$ mUI/L (1,3 a 4,0) (Tabela 17).

Todos realizaram US de tireóide antes do início do IFN α . Havia 75% de heterogeneidade e a ecogenicidade foi normal em todos os exames. O volume glandular médio foi de $10,6 \pm 5,1$ gramas e 25% tinham nódulos tireoidianos. A análise da vascularização glandular, avaliada em apenas três pacientes, identificou 33,3% de padrão II e 66,7% de padrão III. Após o

tratamento, todos realizaram a US de tireóide, em média com $15,4 \pm 3,2$ meses do início do IFN α . Cem por cento apresentou heterogeneidade e 50% hipoecogenicidade do parênquima. O volume glandular médio foi de $9,8 \pm 4,9$ gramas e 50% apresentaram nódulos tireoidianos. A análise da vascularização glandular observou padrão II em 25% e padrão III em 75% (Tabela 17).

Todos os quatro pacientes apresentavam genótipo CC do polimorfismo -318C>T. Os genótipos AA e AG do polimorfismo A49G foram igualmente distribuídos (50% cada). Predominaram os genótipos AG do polimorfismo CT60 (50%) e AT(6) (75%) (Tabela 18).

Tabela 17 – Características dos 4 casos de tireoidites não auto-imunes induzidas por IFN α e 14 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos após tratamento com IFN α e ribavirina.

	Tireoidite não auto-imune	Sem distúrbio tireoidiano	p
Número de indivíduos avaliados	4	14	-
Tempo para diagnóstico (meses)	9,9 $\pm$ 2,2	-	-
Idade (anos) média $\pm$ DP	48,5 $\pm$ 5,7	44,9 $\pm$ 12,7	0,599 ^a
Sexo (masculino / feminino)	2 / 2	8 / 6	1,0 ^b
Raça (caucasóides/não caucasóides)	4 / 0	14 / 0	-
HIV	1	2	1,0 ^b
Genótipo VHC			
1	2	8	-
2	1	0	-
3	1	6	-
1 vs 3	2 vs 1	8 vs 6	1,0 ^b
IFN α			1,0 ^b
Convencional	1	5	-
Peguilado	3	9	-
Tempo de tratamento (semanas)	42,0 $\pm$ 12,0	33,6 $\pm$ 14,2	0,327 ^a
Antes IFN α :			
T3T ng/dL	141,8 $\pm$ 17,7	184,7 $\pm$ 35,8	0,018^a
T4T μ g/dL	8,8 $\pm$ 0,7	11,9 $\pm$ 2,0	0,005^a
T4L ng/dL	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,798 ^a
TSH mUI/L	3,1 $\pm$ 1,2	1,8 $\pm$ 0,7	0,079^a
US tireóide antes*			
Heterogeneidade (%)	3 (75,0)	11 (91,7)	0,450 ^b
Hipoecogenicidade (%)	0 (0)	2 (16,7)	1,0 ^b
Volume glandular em gramas	10,6 $\pm$ 5,1	12,6 $\pm$ 6,8	0,446 ^a
Presença de nódulos (%)	1 (25,0)	5 (41,7)	1,0 ^b
Vascularização (%)			
I	0	3 (25,0)	-
II	1 (33,3)	2 (16,7)	-
III	2 (66,7)	7 (58,3)	-
I e II vs III	1 vs 2	5 vs 7	1,0 ^b
US tireóide após*			
Tempo após início IFN α (meses)	15,4 $\pm$ 3,2	10,2 $\pm$ 3,5	0,056 ^a
Heterogeneidade (%)	4 (100)	9 (81,8)	1,0 ^b
Hipoecogenicidade (%)	2 (50,0)	2 (18,2)	0,516 ^b
Volume glandular em gramas	9,8 $\pm$ 4,9	12,7 $\pm$ 5,7	0,412 ^a
Presença de nódulos (%)	2 (50,0)	4 (36,4)	1,0 ^b
Vascularização (%)			
I	0 (0)	1 (11,1)	-
II	1 (25,0)	6 (66,7)	-
III	3 (75,0)	2 (22,2)	-
I e II vs III	1 vs 3	7 vs 2	0,217 ^b

^a teste Mann-Whitney.

^b teste exato de Fisher.

* Frequência referente ao número de indivíduos que realizaram a avaliação do parâmetro.

Tabela 18 – Frequência dos polimorfismos do gene CTLA4 em 4 casos de tireoidites não auto-imunes induzidas por IFN α e 14 indivíduos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos após o tratamento com IFN α e ribavirina.

	Tireoidite não auto-imune	Sem distúrbio tireoidiano	p
Polimorfismo -318C>T (%)			0,541 ^{a#}
CC	4 (100)	10 (71,4)	-
CT	0 (0)	3 (21,5)	-
TT	0 (0)	1 (7,1)	-
Alelo C	8	23	0,566 ^a
T	0	5	-
Polimorfismo A49G (%)			
AA	2 (50,0)	6 (42,9)	-
AG	2 (50,0)	5 (35,7)	-
GG	0 (0)	3 (21,4)	-
Alelo A	6	17	0,682 ^a
G	2	11	-
Polimorfismo CT60 (%)			
AA	1 (25,0)	3 (21,4)	-
AG	2 (50,0)	5 (35,7)	-
GG	1 (25,0)	6 (42,9)	-
Alelo A	4	11	0,694 ^a
G	4	17	-
Polimorfismo AT(n) – n (%):			
4 a 5	0 (0)	1 (7,1)	1,0 ^a
6	3 (75,0)	6 (42,9)	0,576 ^a
7	1 (25,0)	6 (42,9)	1,0 ^a
8	0 (0)	1 (7,1)	1,0 ^a

p refere à diferença na frequência do genótipo CC em relação a CT no polimorfismo -318C>T.

^a teste exato de Fisher.

4.4.3.1. Hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes induzido por IFN α

Dois casos desenvolveram hipotireoidismo subclínico com ausência de anticorpos antitireoidianos. O primeiro caso foi um homem de 53 anos, co-infectado por HIV, com genótipo viral 1, submetido a tratamento com IFN α peguilado. Não apresentava anticorpos antitireoidianos antes do tratamento. A US de tireóide prévia ao tratamento apresentou homogeneidade e

ecogenicidade normal do parênquima, com volume glandular de 9,8 gramas e ausência de nódulos. A vascularização glandular não foi avaliada. O diagnóstico de hipotireoidismo subclínico foi feito com 5,4 meses do tratamento, com nível de TSH de 5,79 mUI/L. O tratamento com levotiroxina não foi introduzido. Realizou US de tireóide com 7,2 meses de tratamento, que manteve a heterogeneidade e ecogenicidade normal de parênquima, com vascularização glandular pouco aumentada (padrão II). O volume glandular foi de 11,5 gramas (17,3% de aumento de volume glandular inicial) e foram identificados três nódulos, hiper e isoecogênicos, sendo o maior de 0,9 cm no maior diâmetro. Ao longo do tratamento, ocorreu normalização do nível sérico de TSH. Novo exame de US de tireóide, após 13,3 meses de tratamento, manteve-se com heterogeneidade e ecogenicidade normal de parênquima. Porém ocorreu aumento de vascularização para padrão III e do volume glandular para 12,4 gramas (26,5% de aumento de volume glandular do inicial). Os três nódulos permaneceram com as mesmas características prévias.

O segundo caso foi de uma mulher de 53 anos também submetida a tratamento com IFN α peguilado por apresentar genótipo viral 2. Seus anticorpos antitireoidianos eram negativos. O exame de US de tireóide prévio ao tratamento apresentou heterogeneidade e hipoecogenicidade do parênquima, com vascularização glandular aumentada (padrão III). O volume glandular foi de 6,3 gramas e existia um nódulo hipoecogênico de 0,3 cm no seu maior diâmetro. O diagnóstico de hipotireoidismo subclínico foi feito com 10,4 meses do tratamento, com TSH 6,24 mUI/L. Como a

elevação do TSH ocorreu próximo ao final do tratamento com IFN α , foi optado por não iniciar a reposição com levotiroxina. Houve redução dos níveis de TSH com normalização aos 6 meses do término do IFN α . A US de tireóide, após 8,1 meses do término do tratamento, manteve o padrão de heterogeneidade e hipoecogenicidade de parênquima e apresentou aumento de vascularização (padrão III). O volume glandular foi de 5,8 gramas (8% de redução de volume glandular) e o mesmo nódulo hipoecogênico de 0,4 cm de maior diâmetro foi observado.

4.4.3.2. Tireoidites destrutivas induzidas por IFN α

Dois casos desenvolveram tireoidites destrutivas pelo tratamento com IFN α . O primeiro caso foi uma mulher de 47 anos submetida a tratamento com IFN α convencional por apresentar genótipo viral 3. Os níveis hormonais antes do tratamento eram: T3T 124 ng/dL, T4T 8,2 μ g/dL, T4L 0,78 ng/dL e TSH 3,96 mUI/L. Tireoglobulina sérica inicial era de 27,7 ng/dL. Não apresentava anticorpos antitireoidianos. O exame de US de tireóide prévio ao tratamento apresentou heterogeneidade, ecogenicidade normal e aumento de vascularização (padrão III) do parênquima. O volume glandular era de 8,4 gramas e não foram identificados nódulos tireoidianos. O diagnóstico de hipertireoidismo foi feito com 3 meses do tratamento, através da elevação dos níveis de T3T 218 ng/dL, T4T 18,9 μ g/dL, T4L 2,7 ng/dL e tireoglobulina 106 ng/dL, com supressão de TSH. Não ocorreu desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos e TRAb permaneceu inferior a 8%. A paciente não referia sintomas de hipertireoidismo ou dor cervical. A

US de tireóide, 1 mês após o quadro, apresentou heterogeneidade e permaneceu com ecogenicidade normal do parênquima. A vascularização glandular diminuiu e tornou-se pouco aumentada (padrão II). O volume glandular foi de 4,9 gramas, com 41,7% de redução de volume glandular, sem nódulos identificados. O IFN α e ribavirina foram suspensos após 6 meses, conforme o protocolo de tratamento. A cintilografia de tireóide com iodo-131 (^{131}I), foi realizada apenas com 4 meses do quadro laboratorial de hipertireoidismo, e revelou distribuição heterogênea do radiomarcador com hipocaptação discreta em terços inferiores dos lobos tireoidianos e captação no limite superior do normal (13% e 38% após 2 e 24 horas, respectivamente). Com 3,2 meses após o término do tratamento com IFN α , a paciente desenvolveu quadro de hipotireoidismo subclínico, com níveis de T3T 172 ng/dL, T4T 9,0 $\mu\text{g/dL}$, T4L 0,7 ng/dL e TSH 7,72 mUI/L, permanecendo com ausência de anticorpos. Em última avaliação, após 7,1 meses do término do tratamento com IFN α , manteve-se o diagnóstico de hipotireoidismo subclínico, com TSH de 9,07 mUI/L. O exame de US de tireóide, após 8,5 meses do término do tratamento com IFN α , permaneceu inalterado com heterogeneidade e ecogenicidade normal do parênquima e vascularização glandular pouco aumentada (padrão II). Porém, o volume glandular foi de 5,7 gramas, com 32% de redução de volume glandular em relação ao inicial, permanecendo sem nódulos. Não foi iniciado o tratamento com levotiroxina neste período de seguimento (Figura 22A).

O segundo caso foi um homem de 41 anos submetido a tratamento com IFN α peguilado por apresentar genótipo viral 1. Os níveis hormonais

antes do tratamento eram de T3T 145 ng/dL, T4T 8,9 µg/dL, T4L 0,86 ng/dL e TSH 3,68 mUI/L e tireoglobulina sérica inicial de 10,5 ng/dL. Não apresentava anticorpos antitireoidianos. A US de tireóide prévia ao tratamento apresentou heterogeneidade, ecogenicidade normal e vascularização pouco aumentada (padrão II) do parênquima. O volume glandular era de 18,0 gramas e não havia nódulos. O diagnóstico de hipertireoidismo foi feito com 3,4 meses do tratamento com IFN α , pelos níveis elevados de T3T 233 ng/dL, T4T 21,3 µg/dL, T4L 3,56 ng/dL e tireoglobulina 147 ng/dL, com supressão do TSH. Notou-se o aparecimento de anticorpos antitireoidianos, anti-Tg 41 UI/L e anti-TPO 66 UI/L, sem elevação de TRAb (< 8%). O paciente não referia qualquer sintoma de hipertireoidismo ou dor cervical. Após 2 meses do quadro laboratorial de hipertireoidismo, iniciou quadro de hipotireoidismo franco com níveis hormonais de T4T 1,6 µg/dL, T4L 0,3 ng/dL e TSH 156,87 mUI/L. Foi iniciada a reposição com levotiroxina, sem suspensão do tratamento com IFN α . O exame de US de tireóide, após 3 meses do quadro laboratorial de hipertireoidismo, permaneceu com heterogeneidade, mas desenvolveu hipoecogenicidade do parênquima e ocorreu aumento da vascularização glandular (padrão III). O volume glandular diminuiu para 15,4 gramas (14,4% de redução de volume glandular) e permaneceu sem nódulos identificados. O paciente não realizou cintilografia de tireóide. O término do tratamento com IFN α e ribavirina foi após 12 meses. A US de tireóide, após 2 meses do final do tratamento com IFN α , manteve a heterogeneidade e a hipoecogenicidade do parênquima e o aumento de vascularização glandular.

O volume glandular permaneceu em 15,4 gramas, sem nódulos tireoidianos. Após 2 meses do término do tratamento com IFN α , a reposição com levotiroxina foi mantida (Figura 22B).

Figura 22. Evolução de T4L e TSH ao longo do tratamento com IFN α nos dois casos de tireoidites destrutivas. Valores de referência: T4L 0,7 a 1,5 ng/dL, TSH 0,4 a 4,5 mUI/L. + presente, — evolução dos níveis de T4L, - - - evolução dos níveis de TSH.

As únicas características que diferiram significativamente os quatro casos de tireoidites não auto-imunes induzidas pelo IFN α dos 14 casos sem distúrbios tireoidianos com o tratamento foram os níveis séricos iniciais de T3T ($p=0,018$) e T4T ($p=0,005$), significativamente mais baixos. A média dos níveis séricos de TSH foi mais alta, porém não significativa ($p=0,079$), nos indivíduos que desenvolveram tireoidites não auto-imunes por IFN α (Tabela 17).

5.DISCUSSÃO

5.1. Avaliação clínica e tireoidiana

5.1.1. *Disfunções tireoidianas e doenças auto-imunes de tireóide em indivíduos infectados por VHC*

Apesar da maioria dos estudos apontarem para a associação de infecção por VHC e doenças auto-imunes de tireóide, principalmente hipotireoidismo auto-imune², existe ainda divergência sobre o assunto. O presente estudo não conseguiu detectar diferenças nas frequências de doenças auto-imunes de tireóide entre indivíduos com infecção crônica por VHC e indivíduos doadores de sangue normais (10,7 % vs 13,5%, $p=0,585$). Importantes estudos populacionais sugerem que mulheres e indivíduos de maior idade apresentam maior frequência de alterações de anticorpos antitireoidianos ou maiores níveis de TSH¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Levando-se em consideração que a idade da população de pacientes infectados por VHC foi maior, esperaríamos que a frequência de doenças auto-imunes da tireóide também fosse maior. Porém não observamos essa diferença. De qualquer forma, mesmo pareando para sexo e idade, não encontramos maior frequência de doenças auto-imunes da tireóide na nossa população de infectados crônicos por VHC (6,9% vs 15%, $p=0,125$).

Diversos aspectos poderiam justificar a ausência de associação da infecção pelo VHC e de doenças auto-imunes de tireóide neste estudo. Primeiramente, diferenças de origens genéticas, com destaque para a etnia,

poderiam justificar. A população brasileira apresenta ampla miscigenação racial e os outros estudos, em sua grande maioria, envolvem populações européias e asiáticas, que podem ser consideradas homogêneas⁶⁻²⁰.

Além disso, existem evidências de que a população brasileira foi submetida recentemente a excesso de suplementação de iodo na dieta, por excesso de iodação de sal de cozinha. O projeto Thyromobil observou que 86% das crianças estudadas apresentavam excreção urinária de iodo superior a 300 µg/L e 50% das amostras de sal de cozinha coletadas continham mais de 60 mg de iodo / kg de sal¹¹¹. Atualmente, o Ministério da Saúde preconiza que o sal deve conter 20 a 40 mg de iodo/kg de sal¹¹². O excesso de ingestão de iodo confere maior risco de desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos e disfunções hormonais da tireóide, com destaque para o hipotireoidismo¹¹³. Em estudo da população urbana de São Paulo, a prevalência de doenças auto-imunes de tireóide foi elevada (16,9%), considerando achados clínicos, hipoecogenicidade do parênquima ou presença de anticorpo anti-TPO, e oito por cento da população tinha hipotireoidismo auto-imune¹¹⁴. A frequência de doenças auto-imunes de tireóide no grupo de doadores de sangue do atual estudo também foi elevada (13,5%), como no anterior. As populações normais usadas para comparações com infectados por VHC em outros estudos apresentavam frequências de doenças auto-imunes de tireóide mais baixas (0% a 11%) e estas populações eram variadas quanto à suficiência de iodo^{8, 9, 11, 12, 14-16, 20, 115}. Todos estes fatores poderiam mascarar o efeito predisponente da infecção crônica por VHC na população do presente estudo.

Além disso, a avaliação de anticorpos antitireoidianos, anti-Tg e anti-TPO, foi feita por técnica imunofluorométrica, sabidamente mais sensível e mais específica para doenças auto-imunes de tireóide do que o radioimunoensaio ou a avaliação do anticorpo antimicrosomal^{116, 117}, que foram empregados em outros estudos, contribuindo para a elevada frequência de doenças auto-imunes de tireóide deste estudo.

Alguns estudos, que não encontraram associação da infecção do VHC e doenças auto-imunes de tireóide, realizaram o diagnóstico de infecção por VHC apenas baseado na sorologia, o que poderia atenuar eventuais efeitos de alterações imunes relacionadas à infecção crônica^{16, 18, 19}. Um critério diferencial do presente estudo foi a seleção de pacientes com o diagnóstico da infecção por VHC feita por sorologia anti-VHC e a avaliação da cronicidade da doença foi feita pela detecção do RNA viral.

A avaliação hormonal dos infectados por VHC sem distúrbios tireoidianos identificou maiores níveis séricos de T3T e T4T relacionados com o aumento da globulina transportadora dos hormônios tireoidianos, TBG. Nas hepatopatias agudas e crônicas, este padrão hormonal é visto. A lesão hepatocelular provocaria liberação de TBG pelo fígado e elevação de seus níveis séricos¹¹⁸⁻¹²⁰. Desta forma, como as medidas de T3T e T4T englobam os respectivos hormônios livres e ligados à TBG, as dosagens estão falsamente elevadas. A falsa elevação não provoca alteração nos níveis de T4L e TSH, como visto em nosso estudo.

Encontrou-se maior frequência de hipotireoidismo subclínico não auto-imune em co-infectados por HIV. O hipotireoidismo subclínico é conhecidamente mais frequente em população infectada por HIV¹²¹.

5.1.2. Achados de ultra-sonografia de tireóide em indivíduos infectados por VHC

Como já era esperado, as alterações de heterogeneidade e hipoecogenicidade de parênquima na US de tireóide de pacientes com doenças auto-imunes de tireóide foi significativamente superior em relação àqueles sem distúrbio tireoidiano¹²²⁻¹²⁷.

Doenças auto-imunes de tireóide apresentam aumento de vascularização glandular¹²⁸. Chama a atenção o aumento de vascularização do parênquima tireoidiano nos pacientes infectados pelo VHC, independente da presença de doença auto-imune de tireóide, já que esteve presente em 49,2% de eutireoidianos sem anticorpos antitireoidianos. O aumento da vascularização poderia estar relacionado ao aumento de CXCL10 encontrado nos indivíduos infectados por VHC^{29, 129}. Um estudo de US de tireóide com Doppler em grupo de indivíduos com doenças auto-imunes de tireóide evidenciou a correlação entre a elevação dos níveis séricos de CXCL10 existente nestes pacientes e o aumento de vascularização do parênquima glandular¹²⁸. Os autores sugeriam que CXCL10 tivesse algum papel na modulação da angiogênese tireoidiana, possivelmente em função de seu aumento induzido por VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), que também apresentava correlação com aumento de

vascularização intratireoidiana^{130, 131}. Entretanto, nosso estudo não verificou diferenças significativas nos níveis séricos de CXCL10 em pacientes com diferentes padrões de vascularização tireoidiana, independente de disfunção tireoidiana (padrão I 352 ± 160 pg/mL, padrão II 352 ± 208 pg/mL e padrão III 467 ± 386 pg/mL, $p=0,643$). Aparentemente, CXCL10 não está relacionado com o aumento de vascularização glandular em pacientes infectados por VHC.

Apesar de pequena amostra, detectamos aumento de vascularização tireoidiana na US com Doppler em todos os indivíduos co-infectados por HIV, achado não descrito na literatura.

5.1.3. Papel do CXCL10

Os níveis séricos de CXCL10 foram elevados nos pacientes infectados pelo VHC quando comparados com indivíduos controles. CXCL10 se correlacionou com qAST e qALT e aumentou concomitante à piora no estágio de inflamação pela biópsia hepática. Estes achados reforçam o papel de CXCL10 no processo inflamatório hepático na infecção crônica ativa pelo VHC^{25, 26}. Além disso, CXCL10 esteve mais elevado em infectados pelo genótipo viral 1 em comparação aos infectados pelo genótipo 3. É possível que isto reflita um curso inflamatório mais agressivo do genótipo 1 que confere, inclusive, maior resistência ao tratamento com IFN α e ribavirina³⁵.

Em relação ao hipotético papel do CXCL10 na patogênese das tireoidopatias relacionadas à infecção por VHC²⁷, não ocorreu associação

entre os níveis séricos de CXCL10 e os distúrbios auto-imunes ou não auto-imunes na população de infectados pelo VHC. Estudo anterior havia demonstrado a associação entre desenvolvimento de disfunção tireoidiana induzida por IFN α e menores níveis de CXCL10 antes ou durante o tratamento¹²⁹. Infelizmente, não foi realizada a dosagem de CXCL10 em todos os pacientes tratados para verificar tal associação.

Foi observada correlação entre níveis séricos de CXCL10 e de TBG, o que justificaria a associação também encontrada dos níveis da quimiocina e níveis de T3T e T4T. A associação de CXCL10 e TBG foi independente do aumento de transaminases, como verificado em modelo de regressão linear multivariada. Pode-se aventar que níveis de TBG reflitam doença hepática independente de destruição hepatocelular, representada pelo coeficiente qAST na análise multivariada. Estudo prévio em hepatite aguda sugeriu que aumento de TBG refletiria síntese por hepatócitos em regeneração e não apenas liberação por hepatócitos lesados¹³². Como CXCL10 é considerado marcador de processo inflamatório hepático e foi previamente proposto que níveis pré-tratamento de CXCL10 poderiam prever sucesso na terapia antiviral¹²⁹, os achados do presente estudo podem sugerir que a avaliação de TBG, com metodologia de dosagem mais acessível, poderia ser uma alternativa a avaliação de CXCL10 na programação terapêutica.

5.2. Avaliação dos polimorfismos do gene CTLA4

Poucos estudos avaliaram a associação dos polimorfismos do gene CTLA4 com a infecção pelo VHC. No presente estudo, as populações de

indivíduos infectados pelo VHC e de controles apresentaram os polimorfismos do gene CTLA4 -318C>T e CT60 em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entretanto, o polimorfismo A49G não esteve em equilíbrio. A49G foi estudado em população brasileira com doença de Graves e não é descrito o equilíbrio de Hardy-Weinberg⁹⁰. Portanto, apesar deste polimorfismo ser amplamente estudado em outras populações, não se pode descartar que os achados positivos de correlação com este polimorfismo não se devam a falhas na seleção dos pacientes. Uma falha poderia ser a limitação da amostra, especialmente de infectados pelo VHC, que foi uma amostra de conveniência, selecionada a partir de pacientes acompanhados no Ambulatório de Moléstias Infecciosas em período de dois anos, entretanto, isto não interferiu na análise dos outros polimorfismos. Não se pode descartar ainda a presença de acasalamento não aleatório nas populações, efeitos de migrações permitindo fluxo genético ou mesmo aquisição de novas mutações interferindo na seleção natural das populações¹³³.

Estudo prévio de Schott et al. não observou relação entre os polimorfismos do gene CTLA4 e a infecção crônica por VHC⁹⁸. O presente estudo identificou maior frequência de oito repetições AT na região 3'UTR do gene CTLA4 na população com infecção por VHC. O maior número de repetições AT 3'UTR diminuiria a estabilidade do RNA mensageiro do CTLA4, reduzindo sua expressão protéica⁷¹. Não existem, entretanto, estudos funcionais que relacionam a expressão de CTLA4 proveniente de

gene com oito repetições AT e o controle de proliferação de linfócitos ativados.

Não foi identificada a relação entre os polimorfismos do gene CTLA4 e qualquer distúrbio tireoidiano, auto-imune ou não auto-imune, nos indivíduos infectados por VHC. É importante ressaltar o pequeno número de pacientes infectados pelo VHC com doenças tireoidianas, o que poderia interferir nos achados.

Verificou-se a associação dos polimorfismos -318C>T e A49G com a infecção pelos genótipos virais 1 e 3. A presença do alelo C na posição -318 e o alelo G na posição 49 tiveram associação negativa com a infecção pelo genótipo 1 e positiva com a infecção pelo genótipo 3. Pode-se especular que CTLA4, regulador imune negativo, estaria freando os mecanismos de controle de infecção pelo genótipo viral 1, favorecendo sua cronificação. Ou mesmo que a presença dos polimorfismos do gene do CTLA4, interferindo na sua capacidade de bloqueio da resposta imune, favoreceria a infecção crônica pelo genótipo viral 3. Entretanto, não foram estudados indivíduos infectados curados, ou seja, sem infecção crônica ativa, para confirmação.

5.3. Avaliação de distúrbios tireoidianos relacionados ao tratamento com IFN α

Trinta pacientes infectados pelo VHC (27%) foram submetidos ao tratamento com IFN α e ribavirina. Cinquenta e quatro por cento não desenvolveram distúrbio tireoidiano com o tratamento. Estudos prévios procurando identificar alterações hormonais associadas ao uso de IFN α

fizeram seguimento de apenas seis meses com uso apenas de IFN α não-peguilado^{134, 135}. Apenas um destes estudos identificou redução de T4L, ainda dentro dos limites da normalidade, além de um menor grau de redução de T3 livre, sem ocorrer variações de TSH e tireoglobulina no período¹³⁴. Em acompanhamento por até 12 meses, com emprego de IFN α peguilado e não-peguilado associado à ribavirina, o presente estudo identificou uma redução dos níveis de T3T e T4T com o tratamento. Esta redução poderia ser justificada pelo defeito na organificação de iodo induzido pelo IFN α ⁴¹. Entretanto, não houve alterações nos níveis de T4L e TSH.

A diminuição dos níveis de T3T e T4T totais poderia estar relacionada ao aumento de IL-6, decorrente do uso de IFN α ¹³⁶⁻¹⁴¹. Estudos de tratamento com IFN α convencional observaram aumento dos níveis de RNAm de IL-6 em leucócitos periféricos¹³⁷ e dos níveis séricos de IL-6¹³⁸⁻¹⁴⁰. O uso de IFN α peguilado também causa aumento dos níveis séricos de IL-6¹⁴¹. Sugere-se que a IL-6 seja uma das responsáveis pela diminuição de T3T nos pacientes com síndrome de eutireoidiano doente. A IL-6 causa inibição da captação de iodo, diminuição da expressão de TPO e menor liberação de hormônios, estimuladas por TSH, além de causar diminuição da secreção de proteínas transportadoras de hormônios tireoidianos^{142,143}. Consequentemente, IL-6 diminuiria T3T, com manutenção dos níveis de TSH e T4L. Corssmit et al. estudaram os efeitos agudos da administração de IFN α em indivíduos normais¹³⁶. Não encontraram alterações nos níveis séricos de T4T ou T4L, entretanto, observaram redução significativa de T3T e TSH, com elevação de T3 reverso, rT3. Os mecanismos sugeridos por

esses autores para as alterações hormonais agudas foram a liberação de cortisol induzida por IFN α , provocando a diminuição de TSH, e o aumento da IL-6. A ausência de alteração no índice de ligação de hormônios tireoidianos e de T4L afastaram a hipótese de efeitos diretos do IFN α em proteínas transportadoras. A diminuição de T3T e elevação de rT3 sugeriram uma redução da atividade periférica de 5'-deiodinase tipo 1, que preferencialmente converte T4 em T3.

Finalmente, as reduções de T3T e de T4T com o tratamento poderiam estar associadas à melhora da lesão hepatocelular pelo IFN α , representada pela redução nos níveis séricos de ALT. Não pudemos avaliar os níveis de TBG para ratificar tal hipótese.

O presente estudo confirmou a existência das duas principais formas de tireoidites induzidas por IFN α : auto-imunes (desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos e hipotireoidismo auto-imune) e não auto-imunes (tireoidite destrutiva e desenvolvimento de hipotireoidismo subclínico com ausência de anticorpos antitireoidianos).

Diversos mecanismos têm sido propostos para o desenvolvimento da doença tireoidiana durante o tratamento com IFN α . Primeiramente, considera-se que possa haver uma ação direta do VHC na tireóide^{22, 23}. A infecção dos tireócitos pelo vírus ou sua exposição a proteínas do VHC podem desencadear respostas imunes inatas ao vírus, que em conjunto com IFN α exógeno, resultam em inflamação tireoidiana³⁹.

As tireoidites induzidas por IFN α também podem ser mediadas por mecanismos imunes³⁹. O IFN α ativa seu receptor, resultando na ativação da cascata JAK-STAT, que leva a expressão de diversos genes, incluindo citocinas e moléculas de adesão, como ICAM e B7-1¹⁴³⁻¹⁴⁵. O IFN α também é capaz de aumentar a expressão de moléculas apresentadoras de antígeno MHC tipo I, que ativam a resposta imune citotóxica de células T¹⁴³, e de induzir um padrão de resposta imune T “helper” 1. Consequentemente, há aumento de produção de IFN γ e IL-2. O padrão de resposta do linfócito T “helper” 1 está sabidamente envolvido na patogênese das doenças auto-imunes de tireóide¹⁴⁶. O IFN α aumenta ainda a atividade de linfócitos, macrófagos e células NK, além de estimular a ativação de neutrófilos e monócitos e de induzir a liberação de diversas citocinas, como IL-6, IL-8 e IL-10, que poderiam participar de reações auto-imunes tireoidianas^{136, 143, 147-149}. Finalmente, o IFN α altera a produção de imunoglobulinas e diminui a função de células T supressoras, o que também promove respostas auto-imunes^{150, 151}.

Além dos mecanismos imunes, as tireoidites induzidas por IFN α podem decorrer dos efeitos diretos do IFN α na tireóide, evidenciados em estudos *in vitro*. A adição de IFN α provoca a inibição da expressão de Tg, TPO e simportador sódio-iodeto, com aumento precoce e posterior diminuição dos níveis de Tg e TPO, evidenciando morte celular tireoidiana^{152, 153}. Além disso, o IFN α pode interferir diretamente na organificação do iodo, podendo contribuir para insuficiência hormonal⁴¹.

Este estudo não evidenciou elevação significativa dos níveis séricos de tireoglobulina com o tratamento com IFN α . A elevação ocorreu apenas nos casos de tireoidite destrutiva, indicando destruição glandular. Foi observada uma redução, embora não significativa, no padrão de vascularização glandular ao longo do tratamento nos indivíduos que não desenvolveram distúrbios tireoidianos, predomínio de padrão III para predomínio de padrões I e II. A diminuição da vascularização pode estar relacionada à maior destruição glandular, como observado nas tireoidites tipo II associadas ao uso de amiodarona¹⁵⁴, correlacionando-se à diminuição dos valores de T3T e T4T. Entretanto, não ocorreu alteração dos níveis de TSH e não foi identificada diminuição do volume glandular.

O desenvolvimento de tireoidite destrutiva foi precoce, já identificada aos 3 meses de tratamento, sugerindo ação aguda destrutiva do IFN α nas células foliculares. Entretanto, o tempo médio para início de distúrbios tireoidianos induzidos por IFN α em nosso estudo foi de 6,2 meses, próximo ao encontrado em outros estudos, sugerindo ser necessária uma exposição prolongada para estimular e modular o sistema imune^{51, 155-159}.

Procurou-se identificar fatores que predispõem ao desenvolvimento das tireoidites induzidas por IFN α . Iniciando com possíveis fatores genéticos, encontrou-se associação entre desenvolvimento de doenças auto-imunes de tireóide e o sexo feminino, presente em todos os cinco casos ($p=0,045$), como já sugerido por outros autores^{10, 28, 33, 45, 47, 49, 51, 156, 160-163}. A maior associação com o sexo feminino pode ser explicada por genes de

susceptibilidade presentes no cromossomo X ou por ação de estrógeno no desenvolvimento de doenças auto-imunes¹⁶⁴.

Como o estudo incluiu no tratamento com IFN α apenas um indivíduo classificado como não caucasóide, não se identificou uma relação entre raça e risco de distúrbio tireoidiano por IFN α . Sabe-se que a diversidade étnica poderia interferir no risco das tireoidites induzidas por IFN α , como foi identificado risco maior em asiáticos^{160, 163}.

Não houve relação entre os vários polimorfismos do gene CTLA4 com as tireoidites induzidas por IFN α . Mais uma vez é importante destacar que o número de pacientes infectados pelo VHC tratados com IFN α no estudo foi limitado. Outros trabalhos identificaram a associação com determinados HLA (HLA-A2⁵¹ e DRB1*11¹⁶⁵) e com um polimorfismo do fator regulador de interferon 5 (IRF5)¹⁶⁶, porém também em casuístas pequenas. Jacobson et al. identificaram a associação de tireoidite induzida por IFN α com o alelo G do polimorfismo A49G do gene CTLA4¹⁰⁰. Entretanto, os autores agruparam pacientes com distúrbios tireoidianos com mecanismos patogênicos possivelmente diferentes. Além disso, em sua população de 35 indivíduos submetidos ao tratamento de IFN α , a frequência de doenças tireoidianas foi bastante superior à apresentada no estudo atual, sendo oito casos de tireoidite de Hashimoto, sete tireoidites destrutivas e um caso de doença de Graves. Os autores não esclarecem se sua casuística excluiu pacientes com alterações prévias ao IFN α . E, finalmente, a população americana estudada por Jacobsen et al. apresenta origens genéticas diferentes da população do presente estudo.

Confirmou-se achados prévios de que a indução de distúrbios tireoidianos não difere em relação ao tipo de IFN α utilizado no tratamento, convencional ou peguilado^{35, 37, 167}. Observação de destaque foi o desenvolvimento de hipotireoidismo em indivíduos mais jovens, o que não seria esperado, já que doenças auto-imunes de tireóide são mais frequentes com idade mais avançada. Outros possíveis fatores de risco para desenvolvimento de distúrbio tireoidiano com o tratamento com IFN α não foram identificados, como genótipos virais (1 e 2 em relação ao 3 ou genótipo misto), menor carga viral e grau de fibrose hepática^{33, 156, 161, 168, 169}.

Estudos anteriores haviam relacionado a hipoecogenicidade de parênquima com as doenças auto-imunes induzidas por IFN α , associadas ao tratamento com IFN α convencional¹⁷⁰ ou peguilado¹⁶⁸ com ribavirina. Neste estudo, apenas um dos dois indivíduos com tireoidites auto-imunes induzidas por IFN α que realizaram exame de US após 12 meses apresentou hipoecogenicidade.

Em relação às manifestações não auto-imunes, identificou-se como fator de risco para seu desenvolvimento menores níveis de T3T e T4T prévios ao tratamento e tendência a maiores níveis de TSH. Este achado não havia sido identificado em outros estudos. É possível que pacientes com menor reserva hormonal tireoidiana estejam mais propensos a distúrbios hormonais por lesão celular direta pelo IFN α .

A apresentação mais comum de distúrbio tireoidiano induzido pelo IFN α é a tireoidite de Hashimoto, podendo ser observada de sete até 40%

dos casos^{10, 21, 24, 33, 41, 47, 49, 156}. A frequência observada no presente estudo, seja na forma de eutireoidismo com anticorpos antitireoidianos *de novo* (três casos) ou na forma de hipotireoidismo com anticorpos (dois casos), foi de 19%. Devido ao número reduzido de casos de hipotireoidismo, não se pode estimar o risco sugerido pela literatura, de que a presença de anticorpos antitireoidianos prévia ao tratamento predispõe ao desenvolvimento do distúrbio hormonal num risco estimado de 3,9²⁴. Dos quatro casos estudados com anticorpos antitireoidianos prévios, somente um desenvolveu hipotireoidismo, justamente aquele com anti-TPO presente previamente ao uso de IFN α .

Foram identificados dois de 26 casos (8%) de desenvolvimento de anticorpos anti-TPO durante o tratamento com IFN α , sendo que um deles desenvolveu hipotireoidismo. Na compilação de dados de Prummel e Laurberg, o aparecimento de anti-TPO durante o tratamento com IFN α ocorreu em 9,5% dos pacientes e provocou o desenvolvimento de disfunção hormonal em 58% dos indivíduos²⁴.

Nesta casuística, encontraram-se dois casos de hipertireoidismo causados por tireoidite destrutiva (8%) e nenhum caso de doença de Graves. Existe uma baixa frequência de apresentação de hipertireoidismo induzido pelo IFN α , estimada em 2 a 3% dos indivíduos tratados^{33, 40-43, 171}. Provavelmente, a frequência de tireoidite destrutiva no estudo atual foi maior, pois se teve o cuidado de avaliar os hormônios tireoidianos precocemente (3 meses). Um mecanismo proposto para justificar a

preponderância das tireoidites destrutivas em relação à doença de Graves seria a supressão de resposta T “helper 2” pelo $IFN\alpha$, importante no desenvolvimento da doença de Graves¹⁷².

Possível benefício do exame de US com Doppler colorido poderia existir para diferenciar hipertireoidismo por doença de Graves da fase inicial das tireoidites destrutivas. Esperava-se um comportamento similar ao das tireoidites induzidas por amiodarona tipo I e II. Nestes casos, ocorre aumento de vascularização de parênquima associado à doença de Graves ou à doença nodular da tireóide (tipo I), sem alteração ou mesmo diminuição da vascularização relacionada à tireoidite destrutiva (tipo II)^{55, 168, 173}. Deve-se destacar que a elevada frequência de casos com aumento de vascularização na população de infectados pelo VHC estudada (49,2%), a princípio, já dificultaria a identificação de doença de Graves subsequente ao uso de $IFN\alpha$. Um dos casos de tireoidite destrutiva confirmou a expectativa, uma vez que a US prévia ao tratamento apresentou aumento de vascularização e, após uso de $IFN\alpha$, ela se reduziu. Entretanto, o outro caso não revelou redução de vascularização, pelo contrário, identificou seu aumento. Esta aparente discordância poderia ser relacionada com o tempo de realização do exame (6,3 meses, fase em que o paciente já se apresentava com hipotireoidismo franco). No entanto, a presença de processo auto-imune concomitante, representado pelo desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos, também poderia justificar este aumento de vascularização. O único achado de relevância na US de tireóide dos dois

casos foi a redução do volume do parênquima glandular, o que já seria esperado pelo processo destrutivo.

Por fim, apesar de classificadas como manifestações não auto-imunes do IFN α , existem evidências de participação de processo auto-imune nas tireoidites destrutivas. Isto pode ser sugerido pelo caso que desenvolveu anticorpos antitireoidianos, anti-Tg e anti-TPO, concomitante ao processo destrutivo. Estudos, com seguimento de periodicidade menor, também puderam identificar o desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos mesmo antes do hipertireoidismo, como nas tireoidites subagudas, pós-parto e indolor silenciosa^{24, 54, 174}. O desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos durante o processo de tireoidite destrutiva parece estar relacionado com a permanência do hipotireoidismo em longo prazo^{54, 172, 175}. Este não foi objetivo do presente estudo, mas se pode observar que o hipotireoidismo foi mais grave no caso que desenvolveu auto-anticorpos.

Dessa forma, a classificação em tireoidites auto-imunes e não auto-imunes pode falhar em explicar os verdadeiros mecanismos causadores dos distúrbios tireoidianos induzidos por IFN α .

5.4. Considerações finais

Apesar de não ter sido encontrada relação entre a infecção crônica pelo VHC e os distúrbios tireoidianos, é importante considerar o papel das alterações de TBG interferindo na interpretação das avaliações hormonais tireoidianas destes pacientes. A análise de função tireoidiana deve ser feita em todos os pacientes considerados ao tratamento com IFN α e ribavirina,

previamente a seu início. Como os distúrbios tireoidianos podem ser induzidos pelo tratamento com IFN α , o acompanhamento precoce da função tireoidiana, desde 3 meses do início da terapêutica, deve ser realizado para diagnóstico e tratamento adequado, já que sintomas podem ser mascarados pelos sintomas habituais causados diretamente pelo IFN α .

6.CONCLUSÕES

Os indivíduos infectados pelo VHC apresentam níveis séricos de T3T e T4T elevados, relacionados com aumento de TBG, com níveis de T4L reduzidos, porém dentro dos limites de normalidade do ensaio empregado, e de TSH sem alterações.

A frequência de distúrbios tireoidianos na população de indivíduos com infecção crônica por VHC estudada foi de 10,7%. Identificamos cinco casos de tireoidites auto-imunes induzida por IFN α , sendo três casos com desenvolvimento de anticorpos antitireoidianos sem distúrbio hormonal e dois casos de hipotireoidismo. Além disso, quatro indivíduos apresentaram tireoidites não auto-imunes induzidas por IFN α , correspondendo a dois casos de hipotireoidismo subclínico com anticorpos ausentes e dois de tireoidites destrutivas.

Encontrou-se maior frequência de oito repetições AT na região 3'UTR do gene CTLA4 nos infectados por VHC. Porém, não se observou relação dos diferentes polimorfismos do gene CTLA4 com características clínicas e laboratoriais dos infectados pelo VHC ou com a presença de disfunção tireoidiana prévia ou desenvolvida durante tratamento com IFN α associado à ribavirina.

7. ANEXOS

Anexo A: Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ref.: Carta datada de 29.09.09

A
Disciplina de Endocrinologia
Departamento de Clínica Médica

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 07.04.10 tomou conhecimento que o Protocolo de Pesquisa nº 1370/06 intitulado "**AVALIAÇÃO TIREOIDIANA DE PACIENTES INFECTADOS PELO VIRUS DA HEPATITE C (HCV): CORRELAÇÃO COM POLIMORFISMO DO GENE CTLA-4**", aprovado em 14.07.07 será tese de doutorado da aluna DÉBORA LUCIA SEGURO DANILOVIC, tendo como orientadora DRA. SUEMI MARUI.

CAPPesq, 08 de abril de 2010.

 Professora Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 Em Endocrinologia

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
 Presidente da Comissão Ética para Análise
 de Projetos de Pesquisa

Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes participantes do estudo.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO – BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

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

- 1. NOME DO PACIENTE:**
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO **Nº** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE **SEXO:** M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: **Nº** **APTO:**
BAIRRO: **CIDADE:**
CEP: **TELEFONE:** DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA** **Avaliação tireoidiana de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV): correlação com polimorfismos do gene CTLA-4.**
PESQUISADOR: Suemi Marui.....
CARGO/FUNÇÃO: Médica-Assistente..... **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº** CRM 70248.
UNIDADE DO HCFMUSP: Unidade de Tireóide, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia,
- 3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**
 SEM RISCO ☐ RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO **X**
 RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
- 4. DURAÇÃO DA PESQUISA :** 48 meses.....

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

1. **justificativa e os objetivos da pesquisa:** Os pacientes que apresentam infecção pelo vírus da hepatite C podem ter doenças da tireóide, mesmo sem tratamento. Durante o tratamento com interferon e ribavarina, às vezes as doenças da tireóide podem aparecer, como hipotireoidismo (falta de hormônio da tireóide) ou tireotoxicose (excesso de hormônios da tireóide) e devem ser tratadas. Recentemente associaram a presença de doenças da tireóide com a presença de determinado tipo de sequência no gene CTLA-4. O objetivo deste trabalho é avaliar se ter ou não estas sequências neste gene pode indicar se a doença da tireóide vai ocorrer em quem tem hepatite C e também como seria a resposta ao tratamento para a hepatite C. Este trabalho também avaliará as diferentes formas de aparecimento das doenças da tireóide com o tratamento para a hepatite C.
2. **procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:** Para poder participar deste estudo, você precisa ser um adulto portador de hepatite crônica C e ser candidato a tratamento dessa infecção. O seu médico irá avaliar se você tem essas características, e após a explicação de todos os procedimentos, você poderá decidir se quer ou não participar. Caso você deseje participar do estudo, toda a avaliação será feita a partir de uma amostra de seu sangue. Será coletado sangue para alguns exames relacionados ao funcionamento de sua glândula tireóide e à infecção pelo vírus da hepatite C. Esses exames serão realizados antes, durante e após o tratamento de sua hepatite C. Esses exames são normalmente realizados em todos os pacientes que precisam fazer o tratamento da hepatite C. A avaliação do gene será feita também a partir de uma única coleta de sangue feita na primeira avaliação. O exame de ultra-sonografia da tireóide é feito através de um bastão colocado no seu pescoço, sem doer ou furar e a imagem é vista como se fosse uma televisão. A biópsia hepática é um exame obrigatório, na maioria das vezes, antes do início do tratamento da hepatite C. Com a biópsia, o médico examina um pequeno pedaço do tecido do fígado para ver os sinais da hepatite. A biópsia é considerada uma pequena cirurgia e é feita sempre no Hospital. Você ficará deitado na maca, receberá uma anestesia local e uma agulha será espetada perto das costelas do lado direito, onde está o fígado. Esta agulha que retira um pedacinho do seu

1. fígado para o médico examinar. Após a biópsia, o médico colocará um curativo e você deverá ficar em repouso o dia inteiro. Após o tratamento, esse exame é opcional e você poderá ser consultado, se deseja realizá-lo, ao final de seu tratamento. A decisão para a realização desse procedimento adicional será realizada, por você e por seu médico, ao final do tratamento.
2. **desconfortos e riscos esperados:** Para a avaliação da tireóide somente tem a picada da coleta de sangue. Algumas vezes pode ficar uma mancha roxa no local da picada. A quantidade de sangue tirada é bem pouca e não causa anemia. Para a biópsia do fígado, você pode sentir um pouco de dor no lugar e às vezes no ombro direito que desaparece em pouco tempo (horas a 1 dia). Raramente tem alguma complicação da biópsia, como sangramento do fígado ou a quantidade retirada não ser suficiente.
3. **benefícios que poderão ser obtidos:** Com a avaliação destas seqüências do sangue, será possível avaliar se a sua hepatite tem mais chance de melhorar com o tratamento e se você tem mais chance de desenvolver uma doença da tireóide. Esta resposta não virá agora, mas pode auxiliar no futuro, pacientes com a mesma doença que você tem. Com a biópsia do fígado, o médico poderá avaliar os danos que a hepatite C está causando e indicar o melhor tratamento.
4. **procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo:** Sua participação no estudo é voluntária. Caso você não deseje participar do estudo, não haverá qualquer modificação no seu atendimento médico no Hospital das Clínicas. Caso sejam identificados problemas em sua tireóide, você será atendido pelo setor de Endocrinologia do Hospital das Clínicas, por um médico especialista no assunto.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. **acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.** Você terá garantia, a qualquer tempo, que receberá as informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecimentos de qualquer dúvida. Os exames de sangue para este estudo não têm risco. Para esclarecimentos, a pessoa pode entrar em contato com o pesquisador responsável pelo projeto (item V).
2. **liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.** Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Você pode recusar a participar do estudo ou poderá descontinuar sua

1. participação do mesmo, a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou perda dos benefícios aos quais de outra forma faria jus. A Dra. Suemi Marui e a Dra. Maria Cássia J. Mendes Corrêa poderão prontamente aconselhá-lo sobre as opções alternativas de seguimento ou tratamento que sejam consideradas apropriadas e o melhor meio de interromper, de forma bem ordenada, sua participação. Se você decidir interromper sua participação no estudo, você deverá entrar em contato com as pessoas responsáveis pelo estudo no telefone (11) 30696530, de forma a permitir que os procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados. Sua participação neste estudo será mantida em caráter confidencial e seu nome não será revelado a ninguém que não seja do estudo. Entretanto, autoridades governamentais nacionais responsáveis pela segurança e conduta ética dos estudos com seres humanos poderão revisar os registros do estudo, e os registros poderão ser submetidos à divulgação decorrente de outras ordens ou requisitos governamentais. Caso os resultados deste estudo sejam publicados na literatura médica, você não será identificado nominalmente, sendo sua confidencialidade garantida em todas as ocasiões. O comitê de ética poderá ter acesso direto ao seu prontuário médico para verificação dos procedimentos de finalização de sua participação no estudo possam ser iniciados.
2. **salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.** Você compreende que a Dra. Suemi Marui e a Dra. Maria Cássia Corrêa tem o direito de interromper sua participação neste estudo, caso você não siga as instruções do mesmo, ou se considerar que esta interrupção seria de maior benefício para você. Caso seja descoberta qualquer nova informação significativa sobre sua doença enquanto este estudo estiver sendo desenvolvido, você será imediatamente informado e poderá decidir continuar ou interromper sua participação. Os resultados dos exames serão entregues apenas aos responsáveis pelo paciente, não sendo divulgados para nenhuma outra pessoa. Toda a pesquisa terá sigilo absoluto. Os dados obtidos serão usados sem a identificação dos participantes.
3. **disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.** Caso você venha a apresentar indicação de internação hospitalar, durante o período de estudo, ela será feita preferencialmente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e na enfermaria de Endocrinologia.
4. **viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.** Não cabe indenização, porque o paciente receberá toda a assistência e não haverá prejuízo à sua assistência médica.

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

Você será incentivado a fazer perguntas, em qualquer ocasião durante o estudo. Caso você tenha perguntas sobre o estudo ou sobre seus direitos como paciente, por favor entre em contato com a Dras. Suemi Marui e Maria Cássia Jacintho M. Corrêa, nos telefone (11) 30696530 e (11)30696123 .

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 200... .

assinatura do sujeito da pesquisa ou
responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)
DRA SUEMI MARUI
CRM 70.248
DRA M. CASSIA J. CORREA

8. REFERÊNCIAS

1. Ferreira CT, Silveira TR. Viral hepatitis: epidemiological and preventive aspects. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:473-87.
2. Antonelli A, Ferri C, Fallahi P, Ferrari SM, Ghinoi A, Rotondi M, Ferrannini E. Thyroid disorders in chronic hepatitis C virus infection. *Thyroid.* 2006;16:563-72.
3. Mendes-Correa MC, Barone AA, Guastini C. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001;43:15-9.
4. Mendes-Correa MC, Barone AA. Hepatitis C in patients co-infected with human immunodeficiency virus. A review and experience of a Brazilian ambulatory. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2005;47:59-64.
5. Abbas AK, Fausto N, Kumar VMD. Fígado e Trato Biliar. In: *Robbins & Cotran: Patologia - Bases Patológicas das Doenças.* 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
6. Tran A, Quaranta JF, Benzaken S, Thiers V, Chau HT, Hastier P, Regnier D, Dreyfus G, Pradier C, Sadoul JL, Hebutern X, Rampa P. High prevalence of thyroid autoantibodies in a prospective series of

patients with chronic hepatitis C before interferon therapy. *Hepatology*. 1993;18:253-7.

7. Preziati D, La Rosa L, Covini G, Marcelli R, Rescalli S, Persani L, Del Ninno E, Meroni PL, Colombo M, Beck-Peccoz P. Autoimmunity and thyroid function in patients with chronic active hepatitis treated with recombinant interferon alpha-2a. *Eur J Endocrinol*. 1995;132:587-93.
8. Matsuda J, Saitoh N, Gotoh M, Gohchi K, Tsukamoto M, Syoji S, Miyake K, Yamanaka M. High prevalence of anti-phospholipid antibodies and anti-thyroglobulin antibody in patients with hepatitis C virus infection treated with interferon-alpha. *Am J Gastroenterol*. 1995;90:1138-41.
9. Custro N, Montalto G, Scafidi V, Soresi M, Gallo S, Tripi S, Notarbartolo A. Prospective study on thyroid autoimmunity and dysfunction related to chronic hepatitis C and interferon therapy. *J Endocrinol Invest*. 1997;20:374-80.
10. Fernandez-Soto L, Gonzalez A, Escobar-Jimenez F, Vazquez R, Ocete E, Olea N, Salmeron J. Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. *Arch Intern Med*. 1998;158:1445-8.

11. Huang MJ, Tsai SL, Huang BY, Sheen IS, Yeh CT, Liaw YF. Prevalence and significance of thyroid autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection: a prospective controlled study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50:503-9.
12. Ganne-Carrie N, Medini A, Coderc E, Seror O, Christidis C, Grimbart S, Trinchet JC, Beaugrand M. Latent autoimmune thyroiditis in untreated patients with HCV chronic hepatitis: a case-control study. *J Autoimmun*. 2000;14:189-93.
13. Ploix C, Verber S, Chevallier - Queyron P, Ritter J, Bousset G, Monier JC, Fabien N. Hepatitis C virus infection is frequently associated with high titers of anti-thyroid antibodies. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 1999;12:121-6.
14. Peoc'h K, Dubel L, Chazouilleres O, Ocwieja T, Duron F, Poupon R, Johanet C. Polyspecificity of antimicrosomal thyroid antibodies in hepatitis C virus-related infection. *Am J Gastroenterol*. 2001;96:2978-83.
15. Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, Marchi S, Ferrannini E. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med*. 2004;117:10-3.

16. Boadas J, Rodriguez-Espinosa J, Enriquez J, Miralles F, Martinez-Cerezo FJ, Gonzalez P, Madoz P, Vilardell F. Prevalence of thyroid autoantibodies is not increased in blood donors with hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 1995;22:611-5.
17. Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafrani ES, Duval J, Dhumeaux D. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology.* 1994;19:841-8.
18. Metcalfe RA, Ball G, Kudesia G, Weetman AP. Failure to find an association between hepatitis C virus and thyroid autoimmunity. *Thyroid.* 1997;7:421-4.
19. Loviselli A, Oppo A, Velluzzi F, Atzeni F, Mastinu GL, Farci P, Orgiana G, Balestrieri A, Cocco PL, Mariotti S. Independent expression of serological markers of thyroid autoimmunity and hepatitis virus C infection in the general population: results of a community-based study in north-western Sardinia. *J Endocrinol Invest.* 1999;22:660-5.
20. Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, Pedini B, Tositti G, Bosi E, de Lalla F. Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care.* 2000;23:1177-81.

21. Deutsch M, Dourakis S, Manesis EK, Gioustozi A, Hess G, Horsch A, Hadziyannis S. Thyroid abnormalities in chronic viral hepatitis and their relationship to interferon alfa therapy. *Hepatology*. 1997;26:206-10.
22. Bartolome J, Rodriguez-Inigo E, Quadros P, Vidal S, Pascual-Miguelanez I, Rodriguez-Montes JA, Garcia-Sancho L, Carreno V. Detection of hepatitis C virus in thyroid tissue from patients with chronic HCV infection. *J Med Virol*. 2008;80:1588-94.
23. Gowans EJ. Distribution of markers of hepatitis C virus infection throughout the body. *Semin Liver Dis*. 2000;20:85-102.
24. Prummel MF, Laurberg P. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2003;13:547-51.
25. Mihm S, Schweyer S, Ramadori G. Expression of the chemokine IP-10 correlates with the accumulation of hepatic IFN-gamma and IL-18 mRNA in chronic hepatitis C but not in hepatitis B. *J Med Virol*. 2003;70:562-70.
26. Patzwahl R, Meier V, Ramadori G, Mihm S. Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J Virol*. 2001;75:1332-8.

27. Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Colaci M, Sansonno D, Fallahi P. Endocrine manifestations of hepatitis C virus infection. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009;5:26-34.
28. Caturegli P, Hejazi M, Suzuki K, Dohan O, Carrasco N, Kohn LD, Rose NR. Hypothyroidism in transgenic mice expressing IFN-gamma in the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1719-24.
29. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Buonamano A, Ferrannini E, Serio M. High levels of circulating CXC chemokine ligand 10 are associated with chronic autoimmune thyroiditis and hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5496-9.
30. Hanafusa T, Pujol-Borrell R, Chiovato L, Russell RC, Doniach D, Bottazzo GF. Aberrant expression of HLA-DR antigen on thyrocytes in Graves' disease: relevance for autoimmunity. *Lancet.* 1983;2:1111-5.
31. Piccinini LA, Mackenzie WA, Platzer M, Davies TF. Lymphokine regulation of HLA-DR gene expression in human thyroid cell monolayers. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64:543-8.
32. Akeno N, Blackard JT, Tomer Y. HCV E2 protein binds directly to thyroid cells and induces IL-8 production: a new mechanism for HCV induced thyroid autoimmunity. *J Autoimmun.* 2008;31:339-44.

33. Koh LK, Greenspan FS, Yeo PP. Interferon-alpha induced thyroid dysfunction: three clinical presentations and a review of the literature. *Thyroid*. 1997;7:891-6.
34. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*. 2001;358:958-65.
35. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., Haussinger D, Diago M, Carosi G, Dhumeaux D, Craxi A, Lin A, Hoffman J, Yu J. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002;347:975-82.
36. Yee LJ, Perez KA, Tang J, van Leeuwen DJ, Kaslow RA. Association of CTLA4 polymorphisms with sustained response to interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2003;187:1264-71.
37. Russo MW, Fried MW. Side effects of therapy for chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003;124:1711-9.

38. Fentiman IS, Thomas BS, Balkwill FR, Rubens RD, Hayward JL. Primary hypothyroidism associated with interferon therapy of breast cancer. *Lancet*. 1985;1:1166.
39. Tomer Y, Blackard JT, Akeno N. Interferon alpha treatment and thyroid dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2007;36:1051-66; x-xi.
40. Mandac JC, Chaudhry S, Sherman KE, Tomer Y. The clinical and physiological spectrum of interferon-alpha induced thyroiditis: toward a new classification. *Hepatology*. 2006;43:661-72.
41. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli S, Schianchi C, Gardini E, Salvi M, Fiaccadori F, Ugolotti G, Neri TM, Braverman LE. Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. *Am J Med*. 1996;101:482-7.
42. Wong V, Fu AX, George J, Cheung NW. Thyrotoxicosis induced by alpha-interferon therapy in chronic viral hepatitis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56:793-8.
43. Lisker-Melman M, Di Bisceglie AM, Usala SJ, Weintraub B, Murray LM, Hoofnagle JH. Development of thyroid disease during therapy of chronic viral hepatitis with interferon alfa. *Gastroenterology*. 1992;102:2155-60.

44. Baudin E, Marcellin P, Pouteau M, Colas-Linhart N, Le Floch JP, Lemmonier C, Benhamou JP, Bok B. Reversibility of thyroid dysfunction induced by recombinant alpha interferon in chronic hepatitis C. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993;39:657-61.
45. Carella C, Amato G, Biondi B, Rotondi M, Morisco F, Tuccillo C, Chiuchiolo N, Signoriello G, Caporaso N, Lombardi G. Longitudinal study of antibodies against thyroid in patients undergoing interferon-alpha therapy for HCV chronic hepatitis. *Horm Res*. 1995;44:110-4.
46. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Manganella G, Rotondi M, Tuccillo C, Sorvillo F, Caporaso N, Amato G. Long-term outcome of interferon-alpha-induced thyroid autoimmunity and prognostic influence of thyroid autoantibody pattern at the end of treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1925-9.
47. Watanabe U, Hashimoto E, Hisamitsu T, Obata H, Hayashi N. The risk factor for development of thyroid disease during interferon-alpha therapy for chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1994;89:399-403.
48. Imagawa A, Itoh N, Hanafusa T, Oda Y, Waguri M, Miyagawa J, Kono N, Kuwajima M, Matsuzawa Y. Autoimmune endocrine disease induced by recombinant interferon-alpha therapy for chronic active type C hepatitis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:922-6.

49. Marazuela M, Garcia-Buey L, Gonzalez-Fernandez B, Garcia-Monzon C, Arranz A, Borque MJ, Moreno-Otero R. Thyroid autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before and during interferon-alpha therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1996;44:635-42.
50. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Rotondi M, Cioffi M, Tuccillo C, Sorvillo F, Caporaso N, Amato G. The addition of ribavirin to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2002;146:743-9.
51. Kakizaki S, Takagi H, Murakami M, Takayama H, Mori M. HLA antigens in patients with interferon-alpha-induced autoimmune thyroid disorders in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 1999;30:794-800.
52. Fattovich G, Zagni I, Ribero ML, Castagnetti E, Minola E, Lomonaco L, Scattolini C, Fabris P, Boccia S, Giusti M, Abbati G, Felder M, Rovere P, Redaelli A, Tonon A, Tomba A, Montanari R, Paternoster C, Distasi M, Fornaciari G, Tositti G, Rizzo C, Suppressa S, Pantalena M, Noventa F, Tagger A. A randomized trial of prolonged high dose of interferon plus ribavirin for hepatitis C patients nonresponders to interferon alone. *J Viral Hepat*. 2004;11:543-51.

53. Parana R, Cruz M, Lyra L, Cruz T. Subacute thyroiditis during treatment with combination therapy (interferon plus ribavirin) for hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* 2000;7:393-5.
54. Mazziotti G, Sorvillo F, Stornaiuolo G, Rotondi M, Morisco F, Ruberto M, Cioffi M, Amato G, Caporaso N, Gaeta GB, Carella C. Temporal relationship between the appearance of thyroid autoantibodies and development of destructive thyroiditis in patients undergoing treatment with two different type-1 interferons for HCV-related chronic hepatitis: a prospective study. *J Endocrinol Invest.* 2002;25:624-30.
55. Bogazzi F, Bartalena L, Brogioni S, Mazzeo S, Vitti P, Burelli A, Bartolozzi C, Martino E. Color flow Doppler sonography rapidly differentiates type I and type II amiodarone-induced thyrotoxicosis. *Thyroid.* 1997;7:541-5.
56. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392:245-52.
57. McLachlan SM, Nagayama Y, Rapoport B. Insight into Graves' hyperthyroidism from animal models. *Endocr Rev.* 2005;26:800-32.
58. Grewal IS, Flavell RA. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol Today.* 1996;17:410-4.

59. Bluestone JA. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity*. 1995;2:555-9.
60. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
61. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*. 1998;282:2263-6.
62. Carreno BM, Bennett F, Chau TA, Ling V, Luxenberg D, Jussif J, Baroja ML, Madrenas J. CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol*. 2000;165:1352-6.
63. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 1997;6:411-7.
64. Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Liorbach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. *Curr Opin Immunol*. 1999;11:294-300.

65. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3:541-7.
66. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H, Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995;270:985-8.
67. Wang XB, Zhao X, Giscombe R, Lefvert AK. A CTLA-4 gene polymorphism at position -318 in the promoter region affects the expression of protein. *Genes Immun*. 2002;3:233-4.
68. Anjos S, Nguyen A, Ounissi-Benkalha H, Tessier MC, Polychronakos C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. *J Biol Chem*. 2002;277:46478-86.
69. Ueda H, Howson JM, Esposito L, Heward J, Snook H, Chamberlain G, Rainbow DB, Hunter KM, Smith AN, Di Genova G, Herr MH, Dahlman I, Payne F, Smyth D, Lowe C, Twells RC, Howlett S, Healy B, Nutland S, Rance HE, Everett V, Smink LJ, Lam AC, Cordell HJ, Walker NM, Bordin C, Hulme J, Motzo C, Cucca F, Hess JF, Metzker ML, Rogers J, Gregory S, Allahabadia A, Nithiyananthan R, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Bingley P, Gillespie KM, Undlien DE, Ronningen KS,

- Guja C, Ionescu-Tirgoviste C, Savage DA, Maxwell AP, Carson DJ, Patterson CC, Franklyn JA, Clayton DG, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA, Gough SC. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 2003;423:506-11.
70. Dariavach P, Mattei MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *Eur J Immunol*. 1988;18:1901-5.
71. Wang XB, Kakoulidou M, Giscombe R, Qiu Q, Huang D, Pirskanen R, Lefvert AK. Abnormal expression of CTLA-4 by T cells from patients with myasthenia gravis: effect of an AT-rich gene sequence. *J Neuroimmunol*. 2002;130:224-32.
72. Park YJ, Chung HK, Park DJ, Kim WB, Kim SW, Koh JJ, Cho BY. Polymorphism in the promoter and exon 1 of the cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene associated with autoimmune thyroid disease in Koreans. *Thyroid*. 2000;10:453-9.
73. Braun J, Donner H, Siegmund T, Walfish PG, Usadel KH, Badenhoop K. CTLA-4 promoter variants in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Tissue Antigens*. 1998;51:563-6.

74. Hadj Kacem H, Bellassoued M, Bougacha-Elleuch N, Abid M, Ayadi H. CTLA-4 gene polymorphisms in Tunisian patients with Graves' disease. *Clin Immunol*. 2001;101:361-5.
75. Heward JM, Allahabadia A, Carr-Smith J, Daykin J, Cockram CS, Gordon C, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. No evidence for allelic association of a human CTLA-4 promoter polymorphism with autoimmune thyroid disease in either population-based case-control or family-based studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1998;49:331-4.
76. Ward L, Bufalo NE, Santos RB, Romaldini JH. Association of CTLA-4 318 and GST polymorphisms with susceptibility to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy in a brazilian population. In: Proceedings of the 91th Annual Meeting of the Endocrine Society; June 2009; Washington, D.C. 2009. p.OR27-5.
77. Petrone A, Giorgi G, Galgani A, Alemanno I, Corsello SM, Signore A, Di Mario U, Nistico L, Cascino I, Buzzetti R. CT60 single nucleotide polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 gene region is associated with Graves' disease in an Italian population. *Thyroid*. 2005;15:232-8.
78. Kouki T, Gardine CA, Yanagawa T, Degroot LJ. Relation of three polymorphisms of the CTLA-4 gene in patients with Graves' disease. *J Endocrinol Invest*. 2002;25:208-13.

79. Sahin M, Erdogan MF, Erdogan G. Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 polymorphisms in Turkish Graves' disease patients and association with probability of remission after antithyroid therapy. *Eur J Intern Med.* 2005;16:352-5.
80. Nakkash-Chmaishe H, Makki RF, Abdelhamid E, Fakhoury H, Salti NN, Salti I. CTLA-4 gene polymorphism and its association with Graves' disease in the Lebanese population. *Eur J Immunogenet.* 2004;31:141-3.
81. Mochizuki M, Amemiya S, Kobayashi K, Shimura Y, Ishihara T, Nakagomi Y, Onigata K, Tamai S, Kasuga A, Nanazawa S. Association of the CTLA-4 gene 49 A/G polymorphism with type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease in Japanese children. *Diabetes Care.* 2003;26:843-7.
82. Kinjo Y, Takasu N, Komiya I, Tomoyose T, Takara M, Kouki T, Shimajiri Y, Yabiku K, Yoshimura H. Remission of Graves' hyperthyroidism and A/G polymorphism at position 49 in exon 1 of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:2593-6.
83. Heward JM, Allahabadia A, Armitage M, Hattersley A, Dodson PM, Macleod K, Carr-Smith J, Daykin J, Daly A, Sheppard MC, Holder RL, Barnett AH, Franklyn JA, Gough SC. The development of Graves'

- disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2398-401.
84. Kalantari T, Mostafavi H, Pezeshki AM, Farjadian S, Doroudchi M, Yeganeh F, Ghaderi A. Exon-1 polymorphism of ctla-4 gene in Iranian patients with Graves' disease. *Autoimmunity.* 2003;36:313-6.
 85. Bednarczuk T, Hiromatsu Y, Fukutani T, Jazdzewski K, Miskiewicz P, Osikowska M, Nauman J. Association of cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphism and non-genetic factors with Graves' ophthalmopathy in European and Japanese populations. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:13-8.
 86. Yung E, Cheng PS, Fok TF, Wong GW. CTLA-4 gene A-G polymorphism and childhood Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;56:649-53.
 87. Terauchi M, Yanagawa T, Ishikawa N, Ito K, Fukazawa T, Maruyama H, Saruta T. Interactions of HLA-DRB4 and CTLA-4 genes influence thyroid function in Hashimoto's thyroiditis in Japanese population. *J Endocrinol Invest.* 2003;26:1208-12.
 88. Nithiyananthan R, Heward JM, Allahabadia A, Franklyn JA, Gough SC. Polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with autoimmune hypothyroidism in the United Kingdom. *Thyroid.* 2002;12:3-6.

89. Tomer Y, Greenberg DA, Barbesino G, Concepcion E, Davies TF. CTLA-4 and not CD28 is a susceptibility gene for thyroid autoantibody production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:1687-93.
90. Namó Cury A, Longui CA, Kochi C, Calliari LE, Scalissi N, Salles JE, Neves Rocha M, Barbosa de Melo M, Rezende Melo M, Monte O. Graves' disease in Brazilian children and adults: lack of genetic association with CTLA-4 +49A>G polymorphism. *Horm Res*. 2008;70:36-41.
91. Frydecka I, Daroszewski J, Suwalska K, Zoledziowska M, Tutak A, Slowik M, Potoczek S, Dobosz T. CTLA-4 (CD152) gene polymorphism at position 49 in exon 1 in Graves' disease in a Polish population of the Lower Silesian region. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2004;52:369-74.
92. Weng YC, Wu MJ, Lin WS. CT60 single nucleotide polymorphism of the CTLA-4 gene is associated with susceptibility to Graves' disease in the Taiwanese population. *Ann Clin Lab Sci*. 2005;35:259-64.
93. Ban Y, Tozaki T, Taniyama M, Tomita M. Association of a CTLA-4 3' untranslated region (CT60) single nucleotide polymorphism with autoimmune thyroid disease in the Japanese population. *Autoimmunity*. 2005;38:151-3.

94. Ban Y, Concepcion ES, Villanueva R, Greenberg DA, Davies TF, Tomer Y. Analysis of immune regulatory genes in familial and sporadic Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:4562-8.
95. Kotsa K, Watson PF, Weetman AP. A CTLA-4 gene polymorphism is associated with both Graves disease and autoimmune hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;46:551-4.
96. Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80:41-5.
97. Kavvoura FK, Akamizu T, Awata T, Ban Y, Chistiakov DA, Frydecka I, Ghaderi A, Gough SC, Hiromatsu Y, Ploski R, Wang PW, Bednarczuk T, Chistiakova EI, Chojm M, Heward JM, Hiratani H, Juo SH, Karabon L, Katayama S, Kurihara S, Liu RT, Miyake I, Omrani GH, Pawlak E, Taniyama M, Tozaki T, Ioannidis JP. Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 gene polymorphisms and autoimmune thyroid disease: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3162-70.
98. Schott E, Witt H, Pascu M, van Boemmel F, Weich V, Bergk A, Halangk J, Muller T, Puhl G, Wiedenmann B, Berg T. Association of CTLA4 single nucleotide polymorphisms with viral but not autoimmune liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19:947-51.

99. Schott E, Witt H, Hinrichsen H, Neumann K, Weich V, Bergk A, Halangk J, Muller T, Tinjala S, Puhl G, Neuhaus P, Wiedenmann B, Berg T. Gender-dependent association of CTLA4 polymorphisms with resolution of hepatitis C virus infection. *J Hepatol.* 2007;46:372-80.
100. Jacobson EM, Chaudhry S, Mandac JC, Concepcion E, Tomer Y. Immune-regulatory gene involvement in the etiology of interferon-induced thyroiditis (IIT). *Thyroid.* 2006;16:926.
101. Gayotto LCC, Comitê SBP/SBH. Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas. *GED.* 2000;19:137-40.
102. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1215.
103. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA in molecular cloning: a laboratory manual. In: Press CSHL. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: 1989.
104. Deichmann K, Heinzmann A, Bruggenolte E, Forster J, Kuehr J. An Mse I RFLP in the human CTLA4 promotor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:817-8.

105. Kouki T, Sawai Y, Gardine CA, Fisfalen ME, Alegre ML, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism at position 49 in exon 1 reduces the inhibitory function of CTLA-4 and contributes to the pathogenesis of Graves' disease. *J Immunol.* 2000;165:6606-11.
106. Ahmed S, Ihara K, Kanemitsu S, Nakashima H, Otsuka T, Tsuzaka K, Takeuchi T, Hara T. Association of CTLA-4 but not CD28 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus in the Japanese population. *Rheumatology (Oxford).* 2001;40:662-7.
107. Polymeropoulos MH, Xiao H, Rath DS, Merrill CR. Dinucleotide repeat polymorphism at the human CTLA4 gene. *Nucleic Acids Res.* 1991;19:4018.
108. Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1991;34:77-83.
109. Prentice LM, Phillips DI, Sarsero D, Beever K, McLachlan SM, Smith BR. Geographical distribution of subclinical autoimmune thyroid disease in Britain: a study using highly sensitive direct assays for autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1990;123:493-8.

110. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, Braverman LE. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:489-99.
111. Rossi AC, Tomimori E, Camargo R, Medeiros-Neto G. Searching for iodine deficiency disorders in schoolchildren from Brazil: the Thyromobil project. *Thyroid.* 2001;11:661-3.
112. Medeiros-Neto G. Iodine nutrition in Brazil: where do we stand? *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53:470-4.
113. Teng W, Shan Z, Teng X, Guan H, Li Y, Teng D, Jin Y, Yu X, Fan C, Chong W, Yang F, Dai H, Yu Y, Li J, Chen Y, Zhao D, Shi X, Hu F, Mao J, Gu X, Yang R, Tong Y, Wang W, Gao T, Li C. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *N Engl J Med.* 2006;354:2783-93.
114. Camargo RY, Tomimori EK, Neves SC, Rubio IGS, Galrao AL, Knobel M, Medeiros-Neto G. Thyroid and the environment: exposure to excessive nutritional iodine increases the prevalence of thyroid disorders in Sao Paulo, Brazil. *Eur J Endocrinol.* 2008;159:293-9.
115. Murdolo G, Francisci D, Forini F, Baldelli F, Angeletti G, Stagni G, Santeusano F, Calcinaro F, Falorni A. Expression of endocrine

- autoantibodies in chronic hepatitis C, before and after interferon-alpha therapy. *J Endocrinol Invest*. 2002;25:938-46.
116. Kohno T, Tsunetoshi Y, Ishikawa E. Existence of anti-thyroglobulin IgG in healthy subjects. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;155:224-9.
117. Ericsson UB, Christensen SB, Thorell JI. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radioassay. *Clin Immunol Immunopathol*. 1985;37:154-62.
118. Borzio M, Caldara R, Borzio F, Piepoli V, Rampini P, Ferrari C. Thyroid function tests in chronic liver disease: evidence for multiple abnormalities despite clinical euthyroidism. *Gut*. 1983;24:631-6.
119. L'Age M, Meinhold H, Wenzel KW, Schleusener H. Relations between serum levels of TSH, TBG, T4, T3, rT3 and various histologically classified chronic liver diseases. *J Endocrinol Invest*. 1980;3:379-83.
120. Shimada T, Higashi K, Umeda T, Sato T. Thyroid functions in patients with various chronic liver diseases. *Endocrinol Jpn*. 1988;35:357-69.
121. Madeddu G, Spanu A, Chessa F, Calia GM, Lovigu C, Solinas P, Mannazzu M, Falchi A, Mura MS. Thyroid function in human immunodeficiency virus patients treated with highly active antiretroviral

therapy (HAART): a longitudinal study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006;64:375-83.

122. Hayashi N, Tamaki N, Konishi J, Yonekura Y, Senda M, Kasagi K, Yamamoto K, Iida Y, Misaki T, Endo K, Torizuka K, Mori T. Sonography of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Ultrasound*. 1986;14:123-6.
123. Nordmeyer JP, Shafah TA, Heckmann C. Thyroid sonography in autoimmune thyroiditis. A prospective study on 123 patients. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1990;122:391-5.
124. Marcocci C, Vitti P, Cetani F, Catalano F, Concetti R, Pinchera A. Thyroid ultrasonography helps to identify patients with diffuse lymphocytic thyroiditis who are prone to develop hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1991;72:209-13.
125. Vitti P, Lampis M, Piga M, Loviselli A, Brogioni S, Rago T, Pinchera A, Martino E. Diagnostic usefulness of thyroid ultrasonography in atrophic thyroiditis. *J Clin Ultrasound*. 1994;22:375-9.
126. Pedersen OM, Aardal NP, Larssen TB, Varhaug JE, Myking O, Vik-Mo H. The value of ultrasonography in predicting autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. 2000;10:251-9.

127. Rago T, Chiovato L, Grasso L, Pinchera A, Vitti P. Thyroid ultrasonography as a tool for detecting thyroid autoimmune diseases and predicting thyroid dysfunction in apparently healthy subjects. *J Endocrinol Invest.* 2001;24:763-9.
128. Corona G, Biagini C, Rotondi M, Bonamano A, Cremonini N, Petrone L, Conforti B, Forti G, Serio M. Correlation between, clinical, biochemical, color Doppler ultrasound thyroid parameters, and CXCL-10 in autoimmune thyroid diseases. *Endocr J.* 2008;55:345-50.
129. Rotondi M, Minelli R, Magri F, Leporati P, Romagnani P, Baroni MC, Delsignore R, Serio M, Chiovato L. Serum CXCL10 levels and occurrence of thyroid dysfunction in patients treated with interferon-alpha therapy for hepatitis C virus-related hepatitis. *Eur J Endocrinol.* 2007;156:409-14.
130. Iitaka M, Miura S, Yamanaka K, Kawasaki S, Kitahama S, Kawakami Y, Kakinuma S, Oosuga I, Wada S, Katayama S. Increased serum vascular endothelial growth factor levels and intrathyroidal vascular area in patients with Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3908-12.
131. Boulday G, Haskova Z, Reinders ME, Pal S, Briscoe DM. Vascular endothelial growth factor-induced signaling pathways in endothelial cells that mediate overexpression of the chemokine IFN-gamma-

- inducible protein of 10 kDa in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2006;176:3098-107.
132. Shigemasa C, Tanaka T, Mitani Y, Ueta Y, Taniguchi S, Urabe K, Adachi T, Yoshida A, Abe K, Mashiba H. Are increases in thyroxin-binding globulin in patients with acute hepatitis ascribable to synthesis by regenerating hepatocytes? *Clin Chem.* 1988;34:776-80.
133. Mayo O. A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet.* 2008;11:249-56.
134. Del Monte P, Bernasconi D, De Conca V, Randazzo M, Meozzi M, Badaracco B, Mesiti S, Marugo M. Endocrine evaluation in patients treated with interferon-alpha for chronic hepatitis C. *Horm Res.* 1995;44:105-9.
135. Barreca T, Picciotto A, Franceschini R, Varagona G, Corsini G, Valle F, Cataldi A, Molinari E, Garibaldi A, Rolandi E. Long term therapy with recombinant interferon alpha 2 b in patients with chronic hepatitis C: effects on thyroid function and autoantibodies. *J Biol Regul Homeost Agents.* 1993;7:58-62.
136. Corssmit EP, Heijligenberg R, Hack CE, Endert E, Sauerwein HP, Romijn JA. Effects of interferon-alpha (IFN-alpha) administration on leucocytes in healthy humans. *Clin Exp Immunol.* 1997;107:359-63.

137. Shapiro S, Gershtein V, Elias N, Zuckerman E, Salman N, Lahat N. mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFN-alpha) treatment. *Clin Exp Immunol*. 1998;114:55-60.
138. Malaguarnera M, Di Fazio I, Laurino A, Ferlito L, Romano M, Trovato BA. Serum interleukin 6 concentrations in chronic hepatitis C patients before and after interferon-alpha treatment. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 1997;35:385-8.
139. Grungreiff K, Reinhold D, Ansorge S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Cytokine*. 1999;11:1076-80.
140. Mazur W, Mazurek U, Jurzak M, Wilczok T, Gonciarz M, Gonciarz Z. Short-term changes of serum IL-2 and IL-6 induced by interferon alpha-2b in patients with chronic hepatitis C. *Med Sci Monit*. 2001;7 Suppl 1:151-6.
141. Falasca K, Mancino P, Ucciferri C, Dalessandro M, Manzoli L, Pizzigallo E, Conti CM, Vecchiet J. Quality of life, depression, and cytokine patterns in patients with chronic hepatitis C treated with antiviral therapy. *Clin Invest Med*. 2009;32:E212-8.

142. Boelen A, Platvoet-Ter Schiphorst MC, Wiersinga WM. Association between serum interleukin-6 and serum 3,5,3'-triiodothyronine in nonthyroidal illness. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:1695-9.
143. Corssmit EP, de Metz J, Sauerwein HP, Romijn JA. Biologic responses to IFN-alpha administration in humans. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20:1039-47.
144. Nguyen KB, Watford WT, Salomon R, Hofmann SR, Pien GC, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Biron CA. Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science.* 2002;297:2063-6.
145. You X, Teng W, Shan Z. Expression of ICAM-1, B7.1 and TPO on human thyrocytes induced by IFN-alpha. *Chin Med J (Engl).* 1999;112:61-6.
146. Tilg H. New insights into the mechanisms of interferon alfa: an immunoregulatory and anti-inflammatory cytokine. *Gastroenterology.* 1997;112:1017-21.
147. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Bordens R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP, Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res.* 1998;58:2489-99.

148. Herberman RB. Effect of alpha-interferons on immune function. *Semin Oncol.* 1997;24:S9-78-S9-80.
149. Aulitzky WE, Tilg H, Vogel W, Aulitzky W, Berger M, Gastl G, Herold M, Huber C. Acute hematologic effects of interferon alpha, interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin 2. *Ann Hematol.* 1991;62:25-31.
150. Lindahl P, Leary P, Gresser I. Enhancement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemia L 1210 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973;70:2785-8.
151. Krause I, Valesini G, Scrivo R, Shoenfeld Y. Autoimmune aspects of cytokine and anticytokine therapies. *Am J Med.* 2003;115:390-7.
152. Caraccio N, Giannini R, Cuccato S, Faviana P, Berti P, Galleri D, Dardano A, Basolo F, Ferrannini E, Monzani F. Type I interferons modulate the expression of thyroid peroxidase, sodium/iodide symporter, and thyroglobulin genes in primary human thyrocyte cultures. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1156-62.
153. Akeno N, Tomer Y. Dissecting the mechanisms of interferon-induced thyroiditis (IIT): direct effects of interferon alpha on thyroid epithelial cells
In: Proceedings of the 89th Annual Meeting of the Endocrine Society;
June 2007; Toronto, Canada. 2007.

154. Macedo TA, Chammas MC, Jorge PT, Souza LP, Farage L, Watanabe T, Santos VA, Cerri GG. Differentiation between the two types of amiodarone-associated thyrotoxicosis using duplex and amplitude Doppler sonography. *Acta Radiol.* 2007;48:412-21.

155. Fattovich G, Giustina G, Favarato S, Ruol A. A survey of adverse events in 11,241 patients with chronic viral hepatitis treated with alfa interferon. *J Hepatol.* 1996;24:38-47.

156. Gelu-Simeon M, Burlaud A, Young J, Pelletier G, Buffet C. Evolution and predictive factors of thyroid disorder due to interferon alpha in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2009;15:328-33.

157. Vezali E, Elefsiniotis I, Mihas C, Konstantinou E, Saroglou G. Thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C: virus- or therapy-related? *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1024-9.

158. Tran HA, Reeves GE, Jones TL. The natural history of interferon-alpha2b-induced thyroiditis and its exclusivity in a cohort of patients with chronic hepatitis C infection. *QJM.* 2009;102:117-22.

159. Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y. Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): a model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2004;3:388-93.

160. Dalgard O, Bjoro K, Hellum K, Myrvang B, Bjoro T, Haug E, Bell H. Thyroid dysfunction during treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha: no association with either interferon dosage or efficacy of therapy. *J Intern Med.* 2002;251:400-6.
161. Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, Shin SJ, Dai CY, Chen SC, Lin ZY, Hsieh MY, Liu JF, Wang LY, Chang WY. Virologic factors related to interferon-alpha-induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Endocrinol.* 2000;142:431-7.
162. Okanoue T, Sakamoto S, Itoh Y, Minami M, Yasui K, Sakamoto M, Nishioji K, Katagishi T, Nakagawa Y, Tada H, Sawa Y, Mizuno M, Kagawa K, Kashima K. Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1996;25:283-91.
163. Jamil KM, Leedman PJ, Kontorinis N, Tarquinio L, Nazareth S, McInerney M, Connelly C, Flexman J, Burke V, Metcalf C, Cheng W. Interferon-induced thyroid dysfunction in chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24:1017-23.
164. Tomer Y, Davies TF. Searching for the autoimmune thyroid disease susceptibility genes: from gene mapping to gene function. *Endocr Rev.* 2003;24:694-717.

165. Kryczka W, Brojer E, Kowalska A, Zarebska-Michaluk D. Thyroid gland dysfunctions during antiviral therapy of chronic hepatitis C. *Med Sci Monit.* 2001;7 Suppl 1:221-5.
166. Haggerty SM, Concepcion E, Tomer Y. Functional variants in the interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene are associated with susceptibility to interferon induced thyroiditis (IIT). *Thyroid.* 2008;18:S-41.
167. Tran HA, Attia JR, Jones TL, Batey RG. Pegylated interferon-alpha2beta in combination with ribavirin does not aggravate thyroid dysfunction in comparison to regular interferon-alpha2beta in a hepatitis C population: meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22:472-6.
168. Friedrich-Rust M, Theobald J, Zeuzem S, Bojunga J. Thyroid function and changes in ultrasound morphology during antiviral therapy with pegylated interferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2009;16:168-77.
169. Rodriguez-Torres M, Rios-Bedoya CF, Ortiz-Lasanta G, Marxuach-Cuetara AM, Jimenez-Rivera J. Thyroid dysfunction (TD) among chronic hepatitis C patients with mild and severe hepatic fibrosis. *Ann Hepatol.* 2008;7:72-7.

170. Schiemann U, Walli R, Schmidt F, Bogner J, Gross M. Thyroid hypoechogenicity in patients with chronic hepatitis receiving interferon-alpha therapy: evaluation by standardized grey scale ultrasonography. *Eur J Med Res.* 2002;7:271-7.
171. Monzani F, Caraccio N, Dardano A, Ferrannini E. Thyroid autoimmunity and dysfunction associated with type I interferon therapy. *Clin Exp Med.* 2004;3:199-210.
172. Carella C, Mazziotti G, Amato G, Braverman LE, Roti E. Clinical review 169: Interferon-alpha-related thyroid disease: pathophysiological, epidemiological, and clinical aspects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3656-61.
173. Erdogan MF, Anil C, Cesur M, Baskal N, Erdogan G. Color flow Doppler sonography for the etiologic diagnosis of hyperthyroidism. *Thyroid.* 2007;17:223-8.
174. Bohbot NL, Young J, Orgiazzi J, Buffet C, Francois M, Bernard-Chabert B, Lukas-Croisier C, Delemer B. Interferon-alpha-induced hyperthyroidism: a three-stage evolution from silent thyroiditis towards Graves' disease. *Eur J Endocrinol.* 2006;154:367-72.
175. Huang JF, Chuang WL, Dai CY, Chen SC, Lin ZY, Lee LP, Lee PL, Wang LY, Hsieh MY, Chang WY, Yu ML. The role of thyroid

autoantibodies in the development of thyroid dysfunction in Taiwanese chronic hepatitis C patients with interferon-alpha and ribavirin combination therapy. *J Viral Hepat.* 2006;13:396-401.