**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO PAULO**

Paola Lara Faria

**Análise de polimorfismos, expressão gênica e níveis
séricos de IL-18, IL18BP e IFN- γ na infecção crônica
pelo HCV e resolução espontânea.**

**São Paulo
2014**

Paola Lara Faria

Análise de polimorfismos, expressão gênica e níveis séricos de IL-18, IL18BP e IFN- γ na infecção crônica pelo HCV e resolução espontânea.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Da Universidade de São Paulo para
a obtenção de Título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Faria, Paola Lara

Análise de polimorfismos, expressão gênica e níveis séricos de IL-18, IL18BP e IFN- γ na infecção crônica pela HCV e resolução espontânea / Paola Lara Faria. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1.Interleucina-18 2.Proteína de ligação da interleucina-18 3.Hepatite C crônica 4. Remissão espontânea 5.Polimorfismo de nucleotídeo único 6.Interferon gama

USP/FM/DBD-424/14

DEDICATÓRIA

Primeiramente á **Deus**, pelo dom da vida, por me dar forças e proteção ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais **Ana Maria Lara Faria** e **Paulo Maldonado Faria**, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudéssemos realizar os nossos. A vocês, pais por natureza, por opção e amor, não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer tudo isso. Mas é o que nos acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar. Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras. Eu amo vocês, muito obrigada!

Ao meu segundo pai, **Francisco Ferraroli**, que não mediu esforços para me ajudar nessa jornada, pelos conselhos, pelas preocupações, pelo carinho e pelo principalmente pelo amor e que a mim foi dada.

Ao meu namorado, **William Bruno de Sousa**, pelo amor, carinho, companheirismo, apoio incondicional e acima de tudo por tornar minha vida muito mais feliz a cada dia.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, **Dr. João Renato Rebello Pinho**, pela confiança, pelo apoio constante, pelos aconselhamentos, por estar ao meu lado seja nas brincadeiras relacionadas a times de futebol quanto nos momentos emocionantes da correção de artigos científico. Muito obrigada pela oportunidade e pela aprendizagem.

À minha 'co-orientadora' **Dra. Fernanda de Mello Malta**, pela confiança, ensinamentos e diversas oportunidades de crescimento tanto pessoal, quanto profissional. Meus sinceros agradecimentos pelo profissionalismo, pela atenção, dedicação, pelo encorajamento, pela paciência e pelos ensinamentos na elaboração deste estudo. Mais uma vez foi um privilégio tê-la no meu dia a dia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos **pacientes** que aceitaram participar desse estudo, por colaborarem com a pesquisa, os quais sem eles nada disso seria possível. Agradecer também a toda equipe HCFMUSP, enfermeiras, auxiliares de enfermagem, serviços de nutrição, funcionários da limpeza, pela disponibilidade, alegria, atenção, delicadeza, amor e carinho prestados a estes pacientes.

Aos meus irmãos, **Thiago, Rudhy, Rhenan e Filipe**, pelo amor, amizade, confiança e pelo apoio em todos os momentos.

Às minhas cunhadas, **Priscila, Janaína, Ana e Vanessa**, pela amizade e apoio constante.

À minha mãe-amiga, **Ketti Gleyzer de Oliveira**, na qual sempre me apoiou, sempre esteve ao meu lado em todos os momentos desse estudo. Agradeço a ela que fez uma enorme diferença na minha vida profissional e pessoal, pela amizade, pelos conselhos, pelo ouvido, pelos sorrisos e principalmente por saber que essa amizade construída não ficará por aqui.

Aos funcionários do laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical, em especial, **Ariana Carolina Ferreira, Dra. Michele Soares Gomes Gouvêa, Karine Gaspareto, João Paulo Moreira, Caroline Noble, Livia Botelho Lima e Dra. Ana Catharina de Seixas Santos Nastri**, cujos trabalhos e colaborações foram essenciais para a realização desse trabalho. Agradeço a amizade e ao companheirismo cotidiano, pelos sorrisos, pelas alegrias e principalmente agradeço por saber que em cada parte desse trabalho vocês estão presentes.

Agradeço também ao **Dr. Hermes Vieira Barbeiro** e ao **Dr. Francisco Garcia Soriano** pelo tempo, disponibilidade e aprendizagem.

Ao **Thiago Andrade Patente** e **Marcio Augusto Diniz** pela prontidão e disponibilidade em colaborar com a análise estatística.

Às minhas grandes amigas, **Mel Kitzinger, Carolina Bassetti, Camila Bassetti, Letícia Martinez, Mariana Martinez, Aline Rocha e Bruna Coimbra**, pelo apoio constante, ajuda e conselhos nos momentos mais difíceis, pela amizade de colégio e pela certeza pra vida toda.

Às minhas amigas de faculdade, **Andressa Ferrette, Bibiana Alves, Livia Lima, Bruna Nogueira e Fernanda Nogueira**, meus eternos corpinhos, por

estarem ao meu lado sempre me apoiando, me ajudando e incentivando. Em especial, agradeço também a **Lilian Erhardt Machado**, uma irmã que a faculdade me deu, o amor amigo, o ouvido pinico e a companheira de muitas aventuras sejam essas boas ou ruins, mas acima de tudo inesquecíveis.

Ao meu melhor amigo, **Raphael Trez Rios Simões**, o qual me mostrou que força é algo que vem de dentro, que companheirismo é algo do coração e principalmente que melhores amigos não estão relacionados com o tempo, com a frequência em que se encontram e sim com a imensidão que se admira e que se ama.

Agradeço a minha segunda família **Sheila Folhini, Alex Guedes, Louise Marie, Maria Edil, Wellington Rosa** e **Adriana Mana** que me acolheu, me incentivou e que de alguma forma sempre acreditaram em mim.

Obrigada a todos que direto ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Epidemiologia e transmissão da Hepatite C.....	2
1.2 História natural da infecção pelo HCV	3
1.3 Tratamento	3
1.4 Vírus da Hepatite C	4
1.4.1 Organização do genoma	5
1.5 Resposta Imune na infecção pelo HCV	6
1.5.1 Resposta Imune inata	6
1.5.2 Resposta imune adaptativa	10
1.5.3 Citocinas	11
1.5.3.1 Interleucina 18.....	11
1.5.3.2 Proteína ligante da IL-18 (IL18BP).....	14
1.5.3.3 Interferon –gamma (IFN-γ).....	14
1.6 Polimorfismo de base única.....	17
1.6.1 Polimorfismo no gene da <i>IL-18</i>	17
1.6.2 Polimorfismo no gene da <i>IL18BP</i>	18
1.6.3 Polimorfismo no gene do <i>IFN-γ</i>	19
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1.Aspectos Éticos.....	24
3.2.Casuística	24
3.3.Coleta das amostras	25
3.4.Extração e quantificação de ácidos nucleicos.....	25
3.5.Detecção e genotipagem de polimorfismos de base única	26
3.6.Transcrição Reversa.....	27
3.7.Análise da expressão de mRNA por PCR em Tempo Real (qPCR)	28
3.7.1.Análise da expressão do mRNA.....	28
3.8.Dosagem sérica das citocinas.....	30

3.9. Análise estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	33
4.1. Casuística	33
4.2. Análises dos polimorfismos de base única	33
4.2.1. Polimorfismo no gene da <i>IL-18</i>	34
4.2.2. Polimorfismo no gene da <i>IL18BP</i>	35
4.2.3. Polimorfismo no gene do <i>IFN-γ</i>	37
4.3. Expressão do mRNA da <i>IL-18</i> , <i>IL-18BP</i> e <i>IFN-γ</i>	38
4.4. Avaliação dos níveis séricos de citocinas	38
4.4.1. Associação entre os níveis séricos com polimorfismos de base única..	40
4.4.2. Correlação entre os níveis séricos de <i>IL-18</i> e <i>IL18BP</i>	41
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	51
7. ANEXOS	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
anti-HCV	Anticorpos contra o HCV
AST	Aspartatoaminotransferase
CD4+	Células T auxiliares
CD8+	Células citotóxicas
cDNA	DNA complementar
CHC	Carcinoma Hepatocelular
core	Nucleocapsídeo
Ct	Ciclo limiar
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Glicoproteína 1 do envelope viral
E2	Glicoproteína 2 do envelope viral
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
GAF	Fator de ativação do interferon-gamma
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GAS	Sítio de ativação do interferon-gamma
GGT	Gama glutamiltransferase
HCV	Vírus da Hepatite C
IFN	Interferon
IFNAR1	Receptor 1 do Interferon-alfa
IFNAR2	Receptor 2 do Interferon-alfa
IFNGR1	Receptor 1 do interferon-gamma
IFNGR2	Receptor 2 do interferon-gamma
IFN-α	Interferon-alfa
IFN-β	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL18BP	Proteína de ligação da IL18
IL18Rα	Receptor alfa da IL-18
IL18Rβ	Receptor beta da IL-18
IPs	Inibidores de protease

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IRAK	Quinase associado ao IL-1R
IRF3	Fator III de regulação do IFN
ISG	Genes estimulados pelo IFN
JAK	Proteína da família Janus quinase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Proteína de diferenciação mielóide primária 88
NCR	Regiões não codificantes
NFκβ	Fator nuclear kappa β
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células <i>Natural Killer T</i>
ORF	Região aberta de leitura
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PegIFN+RIBA	Interferon peguilado e RIBA
qPCR	PCR em tempo real
RIG1	<i>Retinoic acid-inducible I</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de base única
STAT1	Sinal transdutor e ativador da transcrição
TGF-β	Fator de crescimento tumoral β
Th1	Resposta celular
Th2	Resposta humoral
TLR	Recetores <i>Toll like</i>
TNFα	Fator de necrose tumoral
TRAF6	Receptor de TNF associado ao fator 6
Tregs	Células T regulatórias
UTR	Regiões não traduzidas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização do genoma do vírus da Hepatite C.....	5
Figura 2: Resposta imune inata e o HCV.....	7
Figura 3: Modulação da resposta imune inata durante a infecção pelo vírus da Hepatite C.....	9
Figura 4: Via de sinalização da IL-18.....	13
Figura 5: Via de sinalização do IFN- γ	16
Figura 6: Curva de amplificação do PCR em tempo real.....	29
Figura 7: Distribuição dos genótipos dos polimorfismos localizados no gene da <i>IL-18</i>	34
Figura 8: Distribuição dos genótipos dos polimorfismos localizados no gene da <i>IL18BP</i>	36
Figura 9: Distribuição dos genótipos do polimorfismo localizado no gene do IFN- γ	37
Figura 10: Comparação dos níveis séricos da IL-18.....	39
Figura 11: Comparação dos níveis séricos da IL18BP.....	40
Figura 12: Impacto do polimorfismo -137 G>C no nível sérico nos indivíduos com infecção crônica pelo HCV e resolução espontânea.....	41
Figura 13: Correlação entre os níveis séricos de IL-18 e IL18BP.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localização e descrição dos SNPs.....	27
Tabela 2: Descrição dos ensaios de expressão gênica.....	28
Tabela 3: Descrição dos kits comerciais do ELISA.....	30
Tabela 4: Características dos indivíduos participantes do estudo.....	33
Tabela 5: Frequência haplotípica dos SNPs no gene da <i>IL18</i> de acordo com a cronicidade da infecção por HCV.....	35
Tabela 6: Frequência haplotípica dos SNPs no gene da <i>IL18BP</i> de acordo com a cronicidade da infecção por HCV.....	37
Tabela 7: Análise comparativa dos níveis de expressão da IL-18, IL18BP e IFN- γ	38

RESUMO

Faria PL. *Análise de polimorfismos, expressão gênica e níveis séricos de IL-18, IL18BP e IFN- γ na infecção crônica pelo HCV e resolução espontânea* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O curso da infecção pelo HCV é determinado pela competência da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória importante em ambas as respostas imunes e atua sinergicamente com IL-12 induzindo a expressão de IFN- γ pelas células T e natural killer. O IFN- γ por sua vez possui um papel chave no combate de infecções intracelulares, induzindo um estado antiviral nas células infectadas. O balanço de IL-18 é controlado pela IL18BP, uma citocina importante que atua como um antagonista natural. Estudos mostram que indivíduos cronicamente infectados pelo HCV possuem elevados níveis séricos de IL-18 e IL18BP. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos: 1) determinar o genótipo de polimorfismos de base única (SNPs) localizados nos genes da *IL-18* (-607 C>A e -137 G>C), *IL18BP* (rs2298455 e rs1541304) e *IFN- γ* +874 T>A; 2) quantificar a expressão de seus respectivos mRNAs; e por fim, 3) dosagem dos níveis séricos das respectivas citocinas. Para isto, foram selecionados 51 indivíduos com resolução espontânea e 50 com infecção crônica pelo HCV genótipo 1 que submetidos a técnica de PCR em tempo real para a genotipagem dos polimorfismos *IL-18* (-607 C>A e -137 G>C), *IL18BP* (rs2298455 e rs1541304) e *IFN- γ* +874 T>A; posteriormente foi feita a análise da expressão gênica destes mRNA utilizando como controle endógeno o GAPDH e a dosagem das citocinas foi determinada pela técnica de ELISA. A distribuição dos genótipos nos polimorfismos nos genes *IL-18* e *IL18BP* foram semelhantes nos dois grupos de estudo. No entanto, para o polimorfismo no gene do IFN- γ , observamos frequência maior do genótipo TA no grupo de infecção crônica, enquanto que no grupo de resolução espontânea foi mais frequente o genótipo AA ($p=0.006$). Em contrapartida a expressão gênica nos permitiu observar que nos indivíduos com infecção crônica o mRNA de *IL-18* ($p<0.001$) e *IL18BP* ($p<0.001$) estavam com uma maior expressão quando comparados com os indivíduos com resolução espontânea, e que isto refletia nas dosagens séricas, onde os indivíduos cronicamente infectados pelo HCV apresentavam altos níveis séricos de *IL-18* ($p<0.001$) e *IL18BP* ($p=0.012$) do que os indivíduos com resolução espontânea. O alelo G foi associado com uma maior produção de *IL-18* ($p=0.02$) nos indivíduos com resolução espontânea. Em relação à expressão gênica do mRNA do IFN- γ não foi possível observar nenhuma diferença entre os grupos estudados ($p=0.322$) e a dosagem sérica não foi detectada em ambos os grupos. Os resultados sugerem que apesar do sistema imune ser estimulado durante a infecção pelo HCV, a persistência viral leva a um estado de anergia onde a produção de IFN- γ parece ser escassa para uma resposta imune eficaz, sendo que os meios nos quais modulam a expressão gênica do IFN- γ ainda parecem obscuros, no entanto já foram descritos mecanismos pós-transcricionais que tem como alvo a região 3'UTR do mRNA do IFN- γ e podendo interferir na sua expressão.

Descritores: Interleucina-18 ; Proteína de ligação da interleucina-18 ; Hepatite C crônica ; remissão espontânea; Polimorfismo de nucleotídeo único, Interferon gama.

ABSTRACT

Faria PL. *Analysis of polymorphisms, gene expression and serum levels of IL-18, IFN- γ and IL18BP in chronic HCV infection and spontaneous clearance* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

The course of HCV infection is determined by the competence of the innate and adaptive immune response of the host. IL-18 is an important proinflammatory cytokine in both immune responses and acts synergistically with IL-12 induces the expression of IFN- γ by T and natural killer cells. The IFN- γ turn plays a key role in fighting intracellular infections, inducing an antiviral state in infected cells. The balance of IL-18 is controlled by IL18BP, an important cytokine that acts as a natural antagonist. Studies show that individuals chronically infected with HCV have elevated serum levels of IL-18 and IL18BP. Therefore, this study aimed to: 1) determine the genotype of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in genes of *IL-18* (-607 C>A and -137 G> C), *IL18BP* (rs2298455 and rs1541304) and *IFN- γ* +874 T> A; 2) to quantify the expression of their respective mRNAs; and finally 3) the determination of serum levels of the respective cytokines. Fifty-one individuals with spontaneous clearance and 50 were selected with chronic HCV genotype 1 infection who underwent the technique of real-time PCR for genotyping polymorphisms of *IL-18* (-607 C> A and -137 G> C), *IL18BP* (rs2298455 and rs1541304) and *IFN- γ* +874 T> A; later analysis of gene expression of these mRNA was performed using GAPDH as endogenous control and used the ELISA method for the serum of these cytokines. The distribution of genotypes in the *IL-18* polymorphisms and *IL18BP* genes were similar in both study groups. However, for the polymorphism in the *IFN- γ* gene, the genotype most frequently observed in the group of TA chronic infection, whereas in the group of spontaneous clearance AA was more frequent ($p = 0.006$) genotype. In contrast to gene expression allowed us to observe that in individuals with chronic infection the mRNA of *IL-18* ($p < 0.001$) and *IL18BP* ($p < 0.001$) had a higher expression when compared with individuals with spontaneous resolution, and that this reflected in serum using the ELISA technique, where individuals chronically infected with HCV had higher serum levels of *IL-18* ($p < 0.001$) and *IL18BP* ($p = 0.012$) than subjects with spontaneous clearance. The G allele was associated with increased production of *IL-18* ($P = 0.02$) in spontaneous clearance group. Regarding the gene expression of *IFN- γ* mRNA was not observed any difference between the groups ($p = 0.322$) and the serum was not detected in both groups. The results suggest that although the immune system is stimulated during HCV infection leads to viral persistence of anergy a state where the production of IFN- γ appears to be scarce for an effective immune response, and the means in which modulate the expression the *IFN- γ* gene still seem unclear, however have been described post-transcriptional mechanisms which target the 3'UTR of the mRNA of *IFN- γ* may interfere with its expression.

Descriptors: Interleukin-18; Interleukin-18 binding protein; Hepatitis C, chronic; Remission, spontaneous; Polymorphism, single nucleotide; Interferon-gamma.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e transmissão da Hepatite C

A Hepatite C é uma infecção com impacto mundial significativo. No mundo cerca de 130 a 170 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo vírus da Hepatite C (HCV).[1-4] No Brasil, a prevalência varia entre 1% a 2%, mas os dados são pouco esclarecedores, uma vez que englobam áreas geográficas restritas ou populações específicas, como é o caso dos doadores de sangue. [5] No que se refere ao período de 1999 a 2011, foram notificados ao Sistema Nacional de Atendimento Médico (Sinan) 82.041 casos confirmados de Hepatite C no Brasil, a maioria destes provenientes das Regiões Sudeste (67,3%) e Sul (22,3%). [6]

Os principais mecanismos de transmissão do HCV são: transfusões de sangue e hemoderivados, transplantes de órgãos, injeções aplicadas com seringas contaminadas e o uso de drogas injetáveis. [4]

A exposição parenteral ao vírus da Hepatite C é o meio mais eficiente de transmissão. A maioria dos pacientes infectados pelo HCV na Europa e nos Estados Unidos adquiriu a infecção através do uso de drogas injetáveis ou por transfusão de sangue, sendo que esta última tornou-se rara desde a implantação dos testes de rotina para HCV aplicados pelos bancos de sangue.[2]

O mesmo acontece no Brasil em 2010, no qual a fonte de infecção mais frequente foi o uso de drogas (29,1%), seguido por transfusão sanguínea (26,6%), contato sexual (18,3%), acidente de trabalho (0,8%), hemodiálise (0,7%), transmissão vertical (0,4%) e outros (22,9%). [6]

1.2 História natural da infecção pelo HCV

Em 15% dos casos de infecção pelo HCV observa-se a fase aguda da infecção caracterizada por icterícia, febre, dores abdominais, mal estar, diarreia e fadiga. [7-9] No entanto, na maioria dos casos, a fase aguda é assintomática e os casos são diagnosticados apenas na fase crônica da infecção. [10-14]

A progressão para doença crônica pode variar devido a uma série de fatores, tais como: idade e gênero (mais rápida em homens com mais de 40 anos e mais lenta em crianças), etnia (mais lenta em Afro-americanos), a ingestão de álcool (mesmo quantidades moderadas de álcool aumentam a replicação do HCV, o que aumenta a progressão da Hepatite C crônica e acelera a lesão hepática), co-infecção viral (mais rápida nos pacientes co-infectados pelo HIV ou HBV, com maior lesão hepática). [2, 15]

Cerca de 60-80% dos pacientes com Hepatite C não eliminam o vírus e progridem para infecção crônica [16, 17], sendo que 20% destes casos crônicos evoluem para cirrose e destes, 1-5% evoluem para carcinoma hepatocelular (CHC). [10-14] Por outro lado, de 20 a 40% dos indivíduos infectados resolvem a infecção de forma espontânea. [18, 19] Os fatores que determinam as diferentes evoluções da infecção não são completamente compreendidos.

1.3 Tratamento

A terapia antiviral combinada de interferon peguilhado $\alpha 2a/\alpha 2b$ e ribavirina (PegIFN+RIBA) conduz à uma resposta virológica sustentada em aproximadamente 50% dos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1, e atinge 70-90% de sucesso entre indivíduos infectados pelo HCV genótipo 2 e 3, sendo a resposta virológica sustentada definida pelo

RNA do HCV não detectável após 6 meses do término do tratamento. [2]No que diz respeito ao genótipo 1, a eficácia do tratamento diminui em indivíduos do gênero masculino e de etnia negra, com o aumento da faixa etária, quando há cirrose hepática e quando se associam outras comorbidades, tais como diabetes, esteatose hepática, alcoolismo e obesidade. [20]

Em 2011, a liberação do uso de dois inibidores de protease de 1ª geração (IPs) pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o boceprevir e o telaprevir, foi um passo importante para o tratamento de pacientes infectados pelo genótipo 1. Associados com a terapia PegIFN+RIBA, estas duas drogas aumentam a chance de cura em 30% nos pacientes virgem de tratamento, sendo o benefício ainda maior em indivíduos previamente tratados. Nesses casos a chance de cura aumenta em 50%-60% para os recidivantes, 40%-45% para os respondedores parciais e 25% para os não respondedores. [21-24]

1.4 Vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C foi identificado em 1989, por Choo e colaboradores [25], pertence ao gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*. Este vírus de aproximadamente 50 nm de diâmetro apresenta um envelope esférico contendo as glicoproteínas E1 e E2. [26-28] Dentro da partícula viral é observada uma estrutura esférica que representa o nucleocapsídeo (core) abrigando o genoma viral. [29, 30]

De acordo com uma nomenclatura atualizada recentemente, o HCV é classificado em sete genótipos distintos, os quais estão subdivididos em 67 subtipos. Os genótipos do HCV diferem um do outro em cerca de 30% e os subtipos pelo menos 15% um do outro. [31, 32]

1.4.1 Organização do genoma

O genoma do vírus da Hepatite C é composto por uma única molécula de RNA fita simples com polaridade positiva, de aproximadamente 9,6 kb. Semelhante a outros vírus RNA de fita simples positiva, o RNA genômico do HCV atua como RNA mensageiro (mRNA) para a tradução de proteínas virais. A molécula linear contém uma única região aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*), que codifica para uma poliproteína precursora de aproximadamente 3000 resíduos de aminoácidos. As extremidades 5' e 3' do seu genoma ladeiam a região ORF e apresentam duas regiões não traduzidas (UTR, *untranslated region*) ou não codificantes de proteínas (NCR, *non coding region*) [Figura 1]. [9, 29-37]

Figura 1: Organização do genoma do vírus da Hepatite C A poliproteína codificada é clivada por proteases celulares (tesouras) e virais (setas), originando as proteínas estruturais e proteínas não estruturais. As proteínas estruturais estão localizadas no quarto amino terminal, sendo elas, o Core (C), duas glicoproteínas que fazem parte do envelope (E1 e E2) e a p7, já as proteínas não estruturais são compostas pela NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B.

1.5 Resposta Imune na infecção pelo HCV

1.5.1 Resposta Imune inata

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os microrganismos, constituída de mecanismos celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente.

Na infecção pelo HCV, o RNA viral é reconhecido por duas principais vias: os receptores *Tolllike3* (TLR3) presentes nas superfícies celular e pelo RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) presente no citoplasma. A identificação do RNA viral por esses receptores leva a ativação de uma cascata de sinalizações, incluindo o fator III de regulação do IFN (IRF3), o qual resulta na expressão do INF- β , este por sua vez induz um estado antiviral que se estende até as células vizinhas não infectadas. [38-40]

No meio extracelular a ligação de IFN- β ao seu receptor de superfície (IFNAR-1 e IFNAR-2), acionará a via JAK/STAT, que irá ativar genes estimulados pelo IFN (ISG) e a expressão de IFN- α , promovendo assim uma resposta para o controle da infecção e replicação viral (Figura 2). [38-43]

Figura 2: Resposta imune inata e o HCV. (A) Os hepatócitos reconhecem o RNA viral através dos receptores TLR3 e RIG-I, estes receptores ativam uma cascata de sinalizações através de moléculas adaptadoras como, por exemplo, IPS-1 e TRIF, que vão levar a fosforilação e transcrição do fator IRF3, este por sua vez ativa a transcrição do gene IFN-β. No entanto, como mecanismo de escape viral, a proteína NS3/4A do vírus pode clivar as moléculas adaptadoras IPS-1 e TRIF bloqueando assim a sinalização TLR3 e RIG-I. **(B)** A ligação do IFN-β com o seu receptor ativa a via JAK/STAT, que resultará na ativação de genes estimulados pelo IFN (ISG) e a expressão de IFN-α, promovendo uma resposta antiviral. Em laranja estão destacadas as proteínas virais que já foram descritas por bloquearem a cascata de sinalização inibindo moléculas sinalizadoras.

O IFN tipo I (INF-α e INF-β) liberado pelas células infectadas ativa as células *natural killer* (NK) e as células T *natural killer* (NKT), nas quais constituem uma fonte relevante de interferon gama (IFN-γ) e fator de necrose tumoral (TNF-α), que são citocinas importantes, pois são capazes de inibir a replicação viral. [38] Outras funções do IFN tipo I é a estimulação e a diferenciação de células dendríticas e o aumento na expressão de moléculas de MHC (complexo principal de histocompatibilidade) classe I nos hepatócitos. [44] Os IFN-α e β agem

de forma a inibir a replicação viral e induzem a apoptose de hepatócitos infectados. [45]

As células NK são componentes da resposta imune inata e respondem minutos ou horas após a infecção através de uma polarização dos grânulos à célula infectada e a liberação de seu conteúdo com perforinas, induzindo assim a sua morte. [46] Também são necessárias para uma ação citolítica efetiva por parte dos linfócitos T citotóxicos, através da liberação de IFN- γ e ativação de células dendríticas (DCs). [47]

Apesar de ser abundante no tecido hepático, uma redução na frequência de NKs no sangue periférico e no fígado foi observada nos pacientes cronicamente infectados por este vírus. [48, 49] Esse fato pode ser devido a uma inibição funcional das NKs, observada *in vitro*, após a ligação da proteína viral E2 à molécula CD81 presente na superfície celular das células NK (Figura 3). [50, 51]

Na infecção crônica pelo HCV, também foi observada uma baixa produção de IFN- α e de IL-12 pelas células dendríticas plasmocitóides e mielóides, respectivamente. As células dendríticas produzem citocinas IL-12 e IL-15 que agem de forma a intensificar a função da célula NK. No entanto, já foi observado que o HCV inibe a função das DCs fazendo com que a estimulação das células NK seja comprometida (Figura 3) e, além disso, as proteínas estruturais do vírus podem interagir com TLRs e induzir a produção de IL-10, o qual inibe a função de células dendríticas e NKs. [38, 50]

NELLORE E FISHMAN, 2011

Figura 3: Modulação da resposta imune inata durante a infecção pelo vírus da Hepatite C. Em resposta à infecção pelo HCV, (1) as células NK produzem interferon- γ para mediar os efeitos antivirais. No entanto, (2) a proteína E2 do HCV se liga aos receptores de superfície, o CD81, das células NK promovendo uma redução da liberação de IFN- γ e dos grânulos citotóxicos das células NK. (3) A proteína do core do HCV aumenta a expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC I) nos hepatócitos infectados, o qual resulta na diminuição da atividade das células NK frente às células infectadas. (4) Proteção e a resolução espontânea da infecção pelo HCV têm sido associadas com a expressão de KIR2L3 e seu ligante HLA-C1. (5) As células dendríticas (DCs) produzem citocinas IL-12 e IL-15 e estas citocinas aumentam a função da célula NK, porém o HCV inibe a função das DCs, fazendo com que a estimulação das células NK não ocorra. (6) O HCV também aumenta a população das células T reguladoras (Tregs) no fígado, estas células secretam fator de crescimento tumoral β (TGF- β) e IL-10, para inibir a função das células NKs. (7) Nas células infectadas, as proteínas não estruturais do HCV (NS3/NS4a) interagem com diversos adaptadores da cascata de ativação do IFN I de forma a bloquear as vias de sinalização da célula, inibindo assim a produção e efeitos antivirais do IFN.

1.5.2 Resposta imune adaptativa

Uma característica importante na infecção pelo HCV é o aparecimento tardio da resposta imune adaptativa, que só é detectada de 8-12 semanas tanto nos indivíduos que tiveram infecção controlada como aqueles que progrediram para infecção crônica. [39]

Indivíduos que resolveram a infecção de forma espontânea apresentaram uma forte resposta de células CD4+ na fase aguda da infecção pelo HCV com melhor proliferação de células T e produção de IL-2 e IFN- γ quando comparados aos indivíduos que progrediram para a infecção crônica. [39]

As células CD4+ desempenham um papel importante na resposta adaptativa, ativando as respostas citotóxicas e humorais. Estas células podem secretar tanto citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, incluindo IFN- γ e TNF- α , favorecendo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos ocasionando uma resposta inflamatória, como também podem secretar citocinas envolvidas na resposta humoral (Th2), tais como IL-4 e IL-10, que limitam a resposta Th1 e favorece o desenvolvimento da resposta Th2. [38]

Os linfócitos T citotóxicos (CTLs), CD8+, podem eliminar o vírus utilizando mecanismos relacionados à apoptose por ação citolítica e mecanismos mediados por citocinas do tipo Th1. Na fase crônica da infecção pelo HCV são poucas as células CD8+ que desempenham respostas específicas, bem como é observado uma redução da secreção de citocinas do tipo Th1. Outro mecanismo de bloqueio da produção dessas citocinas é resultante da atividade das células T reguladoras (Tregs), essas células podem secretar IL-10 e TGF- β e dessa maneira inibir a produção de citocinas e proliferação das células T. [38]

O fato de o HCV estabelecer infecção persistente na maioria dos indivíduos infectados sugere que o mesmo tenha desenvolvido

estratégias eficazes para driblar a ação do sistema imune inato e adaptativo.

1.5.3 Citocinas

As citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imunológico em resposta a microrganismos e outros antígenos. Elas desempenham um papel indispensável na regulação do equilíbrio entre a resposta imunológica celular (Th1) e humoral (Th2). As células classificadas como Th1 (IFN- γ , IL-12, IL-18) promovem imunidade mediada por células contra patógenos intracelulares, incluindo vírus e são produzidas pela ativação de linfócitos T. As citocinas produzidas pelas células Th2 tais como, IL-10, IL-4, IL-5 e IL-13 desempenham sua função na imunidade humoral, ou seja, regulam a produção de anticorpos contra patógenos extracelulares. Estudos de citocinas confirmam sua função imunomoduladora e os seus respectivos genes têm sido alvos de pesquisas de associação genética com o desenvolvimento de diversas doenças relacionadas ao sistema imunológico. [52]

1.5.3.1 Interleucina 18

A interleucina 18 (IL-18) foi inicialmente identificada como indutora de IFN- γ , nomenclatura esta dada pela capacidade da IL-18 atuar sinergicamente com IL-12 e induzir a expressão de IFN- γ pelas células T e NK, possuindo assim um papel chave na indução da resposta Th1. [53-55]

Por apresentar semelhanças estruturais com a IL-1 e por ambas serem sintetizadas intracelularmente como moléculas precursoras inativas, a IL-18 foi incorporada à família da IL-1. No caso da IL-18 seu precursor biológico é denominado de pró IL-18 e é produzido durante a resposta imunológica inata e sintetizada por diferentes tipos celulares,

tais como, monócitos/macrófagos, células dendríticas, células de kupffer, queratinócitos, osteoblastos e esplenócitos. [53, 55-59] A pró-IL18 é clivada pela enzima endoprotease conversora de IL-1 β (caspase-1) gerando um produto biologicamente ativo. [53, 56, 59, 60]

A IL-18 é um importante regulador da resposta imunológica celular e humoral, envolvida na indução de resposta do tipo Th1 e respostas do tipo Th2 dependendo do seu meio. [54, 60-62] Na presença da IL-12, a IL-18 atua de forma sinérgica e estimula a produção de IFN- γ , enquanto que cada citocina sozinha não possui essa habilidade com tanta eficiência. [53, 59] A IL-12 aumenta a expressão do receptor de IL-18, o qual é essencial para a transdução de sinal da IL-18. [60] Vale destacar que esta interleucina, além de possuir sinergismo com a IL-12, possui também outras funções adicionais, tais como, a proliferação de células T e citotoxicidade de células NK (pelo receptor Fas ligante), aumento da morte celular mediada por células NK (pela perforina) e indução de atividade pró-inflamatória. [63]

O receptor da IL-18 é expresso em uma variedade de células incluindo macrófagos, neutrófilos, células NK e do endotélio muscular. [55, 56, 59] Na ligação da IL-18 ao seu receptor ocorre a indução das vias de sinalização dependentes de proteínas adaptadoras como a proteína de diferenciação mielóide primária-88 (MyD88), a quinase associada ao IL-1R (IRAK), o receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6), ativando assim o fator nuclear kappa B (NF- κ B) promovendo a síntese de IFN- γ . [64] Além disso, a cascata inflamatória produzida pela IL-18 faz com que haja aumento na expressão de seus receptores na superfície de linfócitos e de células NK (Figura 4). [65]

Figura 4: Via de sinalização da IL-18. A pró-IL18 é clivada pela caspase1, dando origem a IL-18 ativa, esta interleucina pode ser regulada pela proteína de ligação (IL18BP) que se liga a IL-18 com alta afinidade e inibe a sua função. A IL-18 livre se liga a um receptor específico na superfície celular, este receptor é composto por duas subunidades, IL-18Ra e IL-18Rβ. A interação de IL-18 com o IL-18Ra estabiliza a sua interação com o IL-18Rβ, iniciando assim a transdução de sinal por recrutamento das moléculas adaptadoras, como a proteína de diferenciação mieloide primária-88 (MyD88), a quinase associada ao IL-1R (IRAK), o receptor de TNF associado ao fator 6 (TRAF6), ativando assim o fator nuclear kappa B (NF-κB) provocando a síntese de IFNγ.

No entanto, apesar da IL-18 desempenhar um papel fundamental na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares, o excesso de IL-18 pode induzir lesão sistêmica no hospedeiro. [66] Este aumento tem sido observado em pacientes com diversos tipos de câncer, bem como foi descrito um aumento desta interleucina na fase crônica da Hepatite C. Vários estudos concluíram que o nível sérico da IL-18 pode ter significância no prognóstico de alguns tipos de câncer como carcinoma de cólon, carcinoma gástrico e câncer de mama. Em relação ao carcinoma hepatocelular, foram encontrados níveis elevados desta interleucina em estágio avançado do tumor. Estes dados sugerem que a IL-18 possui um papel importante na progressão da doença e patogênese do CHC, já que esta citocina é um

importante fator para o desenvolvimento e inflamação na doença hepática. [54, 67]

Sharma e colaboradores (2009) descreveram uma associação entre a elevação dos níveis de IL-18 e a progressão da doença pelo HCV, demonstrando que os níveis séricos de IL-18 estavam significativamente elevados em pacientes infectados pelo HCV quando comparados aos indivíduos controles. [58]

1.5.3.2 Proteína ligante da IL-18 (IL18BP)

Esta proteína possui afinidade com a IL-18 e está associada com a regulação da atividade da IL-18, funcionando como um antagonista natural que possui a capacidade de neutralizá-la, impedindo a produção de IFN- γ por ela induzida (Figura 4). [59, 60, 62, 68]

A IL18BP é produzida constantemente no organismo e estudos mostram que a sua expressão é visivelmente aumentada pela presença de IFN- γ [69], e assim exerce efeito regulador da citotoxicidade induzida pela IL-18.

Quatro isoformas humanas (A, B, C e D) de IL18BP foram caracterizadas, mas apenas a IL18BP_A e IL18BP_C possuem a capacidade de regular a função da IL-18 *in vitro*, sendo a isoforma IL18BP_A com maior capacidade. [60, 69, 70]

Ludwiczek e colaboradores (2002) encontraram níveis séricos elevados de IL-18 e IL18BP em pacientes com doença hepática crônica, comparando com indivíduos saudáveis usados como controles. [58, 71]

1.5.3.3 Interferon –gamma (IFN- γ)

Os interferons são citocinas amplamente expressas e possuem potentes efeitos antivirais, sendo consideradas como a primeira linha de defesa contra infecções virais. A família de IFN inclui as principais classes

de citocinas: IFN tipo I que compõem diversos tipos de IFN, sendo os principais o INF- α e INF- β e o IFN tipo II, o qual é representado exclusivamente pelo IFN- γ e interferon tipo III (IFN λ). [72, 73]

Inicialmente, acreditava-se que somente os linfócitos T CD4+, os linfócitos citotóxicos CD8+ e as células NK possuíam a capacidade de produzir IFN- γ . Contudo, já se sabe que outros tipos celulares, tais como células B, células NKT e as células apresentadoras de antígeno, também são capazes de sintetizar esta citocina. [74]

O IFN- γ possui um papel crucial no reconhecimento e na eliminação de agentes patogênicos pelo sistema imunológico através do aumento da apresentação de antígenos e atua também na indução de um estado antiviral nas células infectadas. [75] Sua produção é controlada por citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígeno, e principalmente pelas citocinas IL-12 e IL-18 [74], sendo constitutivamente expresso em baixas quantidades, no entanto, na presença de estímulos como infecções virais, câncer e manifestações autoimunes, são produzidas maiores quantidades. Alterações no mecanismo da ação do IFN- γ diminuem a resistência contra infecções virais e bacterianas. [76, 77]

SAVAN, 2014 (modificado).

Figura 5: Via de sinalização do IFN-γ. Após a ligação do IFN-γ com os seus receptores de superfície (IFNGR1 e IFNGR2) ocorre a ativação da JAK1 e JAK2, dando início ao processo de fosforilação destas duas proteínas e a fosforilação num domínio específico no receptor IFNGR1. Após estes passos ocorre um recrutamento da STAT1 que sofrerá ação da JAK2 se dimerizando e segue para o núcleo onde ativará os genes estimulados pelo IFN.

Como demonstrado na figura acima (Figura 5) o receptor de membrana do IFN- γ é formado por duas cadeias polipeptídicas denominadas IFNGR1 e IFNGR2. A estas cadeias estão associadas duas proteínas da família Janus quinase, JAK1 e JAK2, respectivamente. A ligação do IFN-γ ao domínio extracelular de seus receptores faz com que as duas cadeias se unam ativando as JAKs, estas quando ativadas ocorre uma fosforilação cruzada, no qual a JAK2 se autofosforila e fosforila a JAK1, esta por sua vez irá fosforilar um resíduo de tirosina específico no domínio intracelular do receptor IFNGR1. [75] Este passo é fundamental para a sinalização do IFN-γ, com isso irá recrutar uma

molécula sinalizadora denominada STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription*), esta molécula sofrerá fosforilação exercida pela JAK2, promovendo a dimerização da STAT1 e a formação do complexo denominado GAF (*Gamma activated factor*). Este irá migrar para o núcleo onde se ligará a sequências específicas na região promotora dos genes induzidos pelo IFN, conhecidos como GAS (*Gamma activated site*), resultando na ativação da expressão destes genes. [72, 73, 78]

1.6 Polimorfismo de base única

Polimorfismo de base única (do inglês *single nucleotide polymorphism*-SNP) é definido como variações genéticas com uma frequência >1% na população. [79]

Estudos de polimorfismos genéticos de citocinas inflamatórias associados às doenças têm sido descritos, esses polimorfismos, em certos casos, podem até influenciar a transcrição do gene, ocasionando variações nos níveis de expressão do mRNA e da produção de citocinas séricas. [63, 64, 80-82]

1.6.1 Polimorfismo no gene da IL-18

O gene da *IL-18* está localizado no cromossomo 11q22.2 - 22.3, apresenta seis éxons e codifica um polipeptídeo de 193 aminoácidos e possui cerca de 90 polimorfismos conhecidos na região promotora e na porção codificadora do gene.[80]

Thompson e Humphries (2007) observaram que no fragmento de 909pb na região promotora há três SNPs (-137 G>C, +113 T>G e +127 C>T), essas variações alélicas alteram a transcrição do gene, alterando assim os níveis de produção da citocina. [64]Em outro estudo de polimorfismo da mesma região, Giedraitis e colaboradores (2001)

analisaram outro fragmento da região promotora que apresentava cinco SNPs (-656 G>T, -607 C>A, -137 G>C, +113 T>G e +127 C>T). [80]Dentre esses SNPs correlacionados com a atividade de transcrição da IL-18, destacam-se o SNP -137 (rs187238), uma substituição de G para C, e o SNP -607 (rs1946518), substituição de C para A. [61, 63]

A importância de se estudar a região promotora do gene da *IL-18* é a de avaliar se a variação genética observada pode interferir nos níveis séricos dessa citocina. Conforme Chen e Gan (2012) o SNP -607 podem causar alterações na transcrição desse gene e por consequência ter um impacto na expressão da IL-18. [63] Portanto, é plausível dizer que polimorfismos no gene promotor podem ter como consequência o desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2. [80]

1.6.2 Polimorfismo no gene da *IL18BP*

Mosbruger e colaboradores (2010) investigaram se os SNPs em genes importantes na resposta imune poderiam estar associados com o clareamento espontâneo da infecção pelo HCV [82]. Dentre os genes estudados, encontra-se o gene da *IL18BP* (rs2298455) que está localizado no cromossomo 11 na posição 11q13. Este gene tem se tornado alvo de pesquisas pelo fato de que as variações na *IL18BP* podem ser capazes de afetar a atividade de IL-18 e a produção de IFN- γ , alterando assim a evolução da infecção pelo HCV. Outro polimorfismo importante a ser estudado é o rs1541304, uma mudança de C para T, localizado na região promotora NUMA no gene da *IL18BP*, já que uma mudança nesta região poderia interferir nos níveis séricos desta citocina e desta forma poderia alterar a interação de IL-18/*IL18BP*.

1.6.3 Polimorfismo no gene do *IFN-γ*

O gene do *IFN-γ* está localizado no cromossomo 12 na posição q24.1 com aproximadamente 5961pb, sendo composto por quatro éxons e três íntrons. [81]O RNA mensageiro transcrito pelo gene traduz um polipeptídeo de 166 aminoácidos, que após o processamento passa a apresentar 143 aminoácidos, sendo a forma biologicamente ativa do *IFN-γ* um heterodímero de 34 kDA. [81, 83]

O gene que codifica o *IFN-γ* tem no primeiro íntron um STR (curta repetição em Tandem, do inglês Short Tandem Repeat) de CA, caracterizando diferentes alelos, tais como: IFNG*1 com 12 repetições de CA, IFNG*2 com 13 repetições, IFNG*3 com 14 repetições e IFNG*4 com 15 repetições. O polimorfismo destes microssatélites está associado com uma variação individual na produção dos níveis de *IFN-γ*. Indivíduos homozigotos para IFNG*2 apresentam uma produção significativamente aumentada de *IFN-γ* quando comparada com outras combinações alélicas. [84]

No estudo de Pravica (2000), pode-se observar que o polimorfismo T>A, o qual está localizado na posição +874, está localizado no mesmo íntron onde os microssatélites descritos acima estão localizados. Neste estudo foi observada uma correlação absoluta entre o polimorfismo +874 com o alelo IFNG*2 caracterizado por 13 repetições de CA. O polimorfismo +874 coincide com um provável sítio de ligação de NF-κβ que pode representar um papel importante na produção elevada de *IFN-γ*. A associação dos alelos com uma baixa (AA), média (TA) e alta (TT) produção de citocina foi demonstrada *in vitro*. [84]

Diversos SNPs são encontrados no gene do *IFN-γ*, dentre os quais está o +874 T>A que foi associado a várias condições inflamatórias autoimunes e crônicas. [81, 85]

Sabe-se que a resposta imunológica desencadeada durante a infecção pelo HCV abrange mecanismos de imunidade inata e imunidade adaptativa. Entretanto os mecanismos que levam a progressão da doença continuam obscuros. Estudos demonstraram a importância que a IL-18 possui na resposta inata do hospedeiro contra infecções virais. No entanto, nenhum estudo mostrou a associação dos polimorfismos no gene da *IL-18*, *IL18BP* e *IFN-γ* com os seus respectivos dados de expressão gênica e seus níveis séricos nos indivíduos com resolução espontânea e infecção crônica pelo HCV, o que poderia auxiliar na melhor compreensão das interações destas citocinas com a resposta do hospedeiro frente à infecção pelo HCV.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar em dois grupos de pacientes (grupo 1 – pacientes com resolução espontânea da infecção pelo HCV e grupo 2 – pacientes com hepatite crônica C):

1. a frequência de polimorfismos de base única nos genes *IL-18*, *IL18BP* e *IFN-γ*;
2. níveis de expressão do mRNA da *IL-18*, *IL18BP* e *IFN-γ*;
3. níveis séricos de *IL-18*, *IL18BP* e *IFN-γ*

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Os participantes voluntários incluídos neste estudo foram indivíduos com antecedentes de infecção pelo HCV encaminhados ao ambulatório de Hepatologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e ao Ambulatório da Divisão de Clínica das Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas que concordaram em participar estando cientes dos riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE- Anexo A). O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Cappesq HCFMUSP projeto nº nº 151.913 em 21/11/2012- Anexo B).

3.2. Casuística

Os participantes deste estudo foram subdivididos em 2 grupos de acordo com os seguintes critérios:

Grupo 1 – 51 indivíduos com histórico de resolução espontânea da infecção pelo HCV - caracterizado pela ausência de RNA viral detectável pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), simultaneamente à detecção de anticorpos anti-HCV por ensaio imunoenzimático, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), em ao menos dois momentos distintos, segundo a rotina laboratorial do serviço envolvido. Os resultados positivos obtidos no teste ELISA foram

confirmados pelo teste de Imunoblot em tiras (CHIRON® RIBA® HCV 3.0 SAI, CHIRON, Emeryville, CA, USA).

Grupo 2 - 50 indivíduos com infecção crônica pelo HCV (genótipo 1) caracterizada por sorologia positiva para HCV (detecção de anticorpos anti-HCV no teste ELISA) e pela detecção de RNA viral pela técnica de PCR, todos sem tratamento prévio.

Os indivíduos com sorologia positiva para HIV e HBV foram excluídos do estudo.

3.3. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (BD Vacutainer® BloodCollection Tube, NJ, EUA) e em tubos com gel separador. As amostras coletadas foram encaminhadas ao laboratório central do HC-FMUSP para a realização das análises bioquímicas dos testes de função hepática, tais como: alanina amino transferase (ALT), aspartato amino transferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transferase (GGT) e foi realizado o teste para quantificação do número de cópias de HCV-RNA- circulante (Cobas® Taqman® HCV Test, Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton).

3.4. Extração e quantificação de ácidos nucléicos

A extração de DNA foi feita utilizando o QIAamp DNA® Blood mini kit (Qiagen®, Germany) e para a extração do RNA total utilizou-se o *mirVana™ PARIS Isolation Kit* (Ambion® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram seguidas as orientações dos fabricantes. O DNA e o RNA foram eluídos em 50 µL de tampão de eluição, e armazenados a -80°C até o momento do uso. A pureza dos ácidos nucléicos obtidos nas

extrações foi avaliada no equipamento NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific Technologies, Delaware, Waltham-MA, USA), sendo que o grau de pureza foi verificado pela razão A_{260}/A_{280} , a variação entre 1,8 e 2,0 indica uma boa qualidade da amostra.

Para a quantificação foi utilizado o fluorímetro Qubit (Fluorometer. Qubit® 2.0. Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados reagentes específicos para quantificar RNA e DNA, Qubit® RNA Assay Kit e Qubit® DNA AssayKit, respectivamente (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

3.5. Detecção e genotipagem de polimorfismos de base única

A partir do DNA extraído, foram detectados e genotipados os polimorfismos de base única que estão localizados nos genes IL-18 (rs187238 e rs1946518), IL18BP (rs2298455 e rs1541304) e IFN- γ (+874).

Para a realização da detecção e genotipagem desses polimorfismos, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Foram utilizados ensaios TaqMan® SNP Genotyping Assays pré-desenhados (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, EUA), entretanto para o SNP no gene do IFN- γ o ensaio foi customizado pela própria Applied Biosystems. Esses ensaios se baseiam na amplificação e detecção de alelos específicos em amostras de DNA genômico. Durante a etapa de amplificação, a enzima Taq DNA polimerase amplifica o DNA utilizando iniciadores específicos, e as sondas TaqMan® MGB, ligadas ao DNA alvo, são degradadas durante a extensão das fitas de DNA e a partir desse momento passam a emitir um sinal de fluorescência, que é detectada pelo equipamento. Uma vez que estas sondas são alelo específicas, e marcadas com fluorescências diferentes, possibilitando

assim sua diferenciação pela cor emitida. Os ensaios utilizados estão listados na tabela 1.

Tabela 1- Localização e descrição dos SNPs

Gene	Cromossomo	Posição do SNP	Mutação	Código do ensaio*
<i>IL-18</i>	11q22.2-q22.3	rs1946518	C/A	C_2898460_10
		rs197238	G/C	C_2408543_10
<i>IL18BP</i>	11q13	rs1541304	C/T	C_8893738_10
		rs2298455	A/C	C_16189423_10
<i>IFN-γ</i>	12q24.1	+874	T/A	AH6R2C9 **

*código Applied Biosystems

** ensaio customizado

3.6. Transcrição Reversa

Após a análise da pureza e quantificação do RNA extraído, foi realizada a síntese do DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa e para essa etapa foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA). A fita de cDNA foi sintetizada a partir de 150ng de RNA total utilizando-se iniciadores específicos para cada gene estudado.

A reação de transcrição reversa foi realizada com volume final de 15µL, e foram seguidas as seguintes etapas de incubação: 16°C por 30 minutos, 42°C por 5 minutos e uma última etapa a 85°C por 5 minutos para a inativação da enzima.

3.7. Análise da expressão de mRNA por PCR em Tempo Real (qPCR)

A partir do cDNA foi realizado o ensaio de quantificação relativa por qPCR para avaliarmos a expressão dos mRNAs dos genes da IL18, IL18BP e IFN- γ . Todas as amostras foram testadas em triplicata e para cada amostra também foi realizada a amplificação do gene GAPDH que foi utilizado como controle endógeno.

A reação foi realizada utilizando-se ensaios TaqMan® pré-desenhados (Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA; Qiagen®, Hilden Germany), (Tabela 2), sendo o volume final da reação de 20 μ L contendo 4 μ L do cDNA. A detecção e análise foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As condições das reações foram as seguintes: 50°C por 20 segundos, 95°C por 10 minutos, 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min.

Tabela 2: Descrição dos ensaios de expressão gênica

Alvo	Fluoróforo	Fabricante	Código do ensaio
IL-18	FAM	Applied Biosystems	Hs01038788_m1
IL18BP	FAM	Applied Biosystems	Hs00271720_m1
IFN- γ	FAM	QIAGEN	QF00482132
GAPDH	FAM	Applied Biosystems	Hs03929097_g1

3.7.1. Análise da expressão do mRNA

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan® foram detectados pelo equipamento e os dados analisados no programa *Sequence Detection Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Em cada amostra foram obtidos valores de C_T (*cycle threshold* ou ciclo limiar) de cada mRNA alvo. O C_T é o ponto que correspondente

ao número de ciclos onde a amplificação atinge o limiar de detecção (Threshold), o que permite a análise quantitativa da expressão (Figura 6).[86]

NOVAES e ALVES, 2004 (modificado).

Figura 6: Curva de amplificação do PCR em tempo real.. A curva de amplificação nos mostra três fases distintas (1) linha basal também denominada de *baseline*, nesta fase não há amplificação de produtos da PCR suficiente para detectar a fluorescência; (2) fase exponencial: a quantidade de produtos da PCR dobra a cada ciclo, neste momento a amostra ultrapassa o limiar da detecção (*Threshold*). O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (C_T). (3) Fase platô: não há mais aumento no número de produtos.

Os valores de C_T obtidos nos experimentos foram utilizados para o cálculo do ΔC_T , que corresponde ao valor normalizado da expressão dos mRNA. O ΔC_T de cada mRNA foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\Delta C_T = (C_T \text{ controle endógeno} - C_T \text{ mRNA alvo})$$

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro $2^{-\Delta C_T}$ para a análise dos dados. Dessa maneira foi possível determinar a expressão gênica individual dos participantes de cada grupo (resolução espontânea e infecção crônica).

3.8. Dosagem sérica das citocinas

As dosagens séricas das citocinas IL-18, IL-18BP e IFN- γ foram realizadas utilizando a técnica de ELISA.

Utilizamos ensaios comerciais seguidos às instruções do fabricante (Tabela 3).

Tabela 3: Descrição dos kits comerciais do ELISA

Citocina	Fabricante ou fornecedor	Código
IL-18	MBL	7620
IL-18BP α	Abnova	KA1735
IFN- γ	Invitrogen	KHC4021C

Os níveis séricos de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL), a partir da curva padrão. Cada ensaio foi baseado em curvas com valores de referência, controle da reação e o controle branco que foi utilizado para minimizar qualquer valor de interferência.

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa R Foundation for Statistical Computing (versão 2.15.3, R Development Core Team 2008, Vienna, Austria). As análises descritivas foram realizadas de acordo com a natureza das variáveis e os resultados estão apresentados em forma gráfica para melhor interpretação das informações mais relevantes. Para a análise dos dados gerados nos ensaios de genotipagem de SNPs, ensaios de expressão gênica e ELISA foram feitas comparações entre os grupos de infecção crônica pelo HCV e resolução

espontânea utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney, considerando o valor de $p < 0,05$ para indicar uma diferença estatisticamente significativa.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Casuística

A tabela 4 nos mostra os resultados dos exames laboratoriais dos indivíduos incluídos neste estudo.

Tabela 4: Características dos indivíduos participantes do estudo.

	Resolução Espontânea pelo HCV (n=51)	Infecção Crônica pelo HCV (n=50)	valores de p
Gênero n (%)			1.000
F	29 (57%)	29(58%)	
M	22 (43%)	21 (42%)	
Idade, anos (mín.- máx.)	48,0(21-70)	46,5 (18-69)	0,535
ALT (U/L)	24 (16,0-28,0)	47(30,5-66,5)	<0,0001
AST (U/L)	23 (20,0-28,0)	40 (28,0-47,75)	<0,0001
FA (U/L)	73 (60,0-101,0)	72,5 (60,25-106,5)	0,986
GGT (U/L)	28 (18,0-39,0)	47 (25,75-73,25)	0,002
HCV-RNA log (mín.-máx.)	ND	5,89(3,49-7,39)	

Os dados laboratoriais estão apresentados em valores de mediana e interquartil (25th-75th).
Teste Mann-Whitnev. ND. não detectado.

Os resultados da análise estatística apontaram diferenças significantes para os valores de ALT, AST e GGT quando comparado os valores entre indivíduos com resolução espontânea e indivíduos cronicamente infectados pelo HCV, sendo estes últimos os que apresentaram níveis séricos elevados destas enzimas.

4.2. Análises dos polimorfismos de base única

O ensaio de discriminação alélica dos SNPs localizados nos genes *IL-18*, *IL18BP* e *IFN-γ* foi realizado em todas as amostras dos indivíduos

incluídos neste estudo e os polimorfismos analisados aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weimberg

4.2.1. Polimorfismo no gene da *IL-18*

A análise dos resultados gerados demonstra que os indivíduos com infecção crônica e aqueles que resolveram a infecção de forma espontânea apresentaram uma distribuição semelhante dos genótipos nos polimorfismos -607 C>A (Figura 7A) e -137 G>C (Figura 7B) localizado no gene da *IL-18*, com o valor estatístico de $p=1,0$ e $p=0,811$, respectivamente.

(A)

(B)

Figura 7: Distribuição dos genótipos dos polimorfismos localizados no gene da *IL-18*. (A) genótipos encontrados para o polimorfismo -607 C>A (rs1946518) (B) genótipos encontrados para o polimorfismo-137 G>C (rs197238).

Assim como foi analisada a frequência haplotípica destes dois polimorfismos no gene da IL-18, onde não se observou associação dos haplótipos com o curso da infecção pelo HCV. (Tabela 5)

Tabela 5. Frequência haplotípica dos SNPs no gene da IL-18 de acordo com a cronicidade da infecção pelo HCV.

Haplótipos (-607/-137)	Resolução Espontânea (n=51)	Infecção Crônica (n=50)	OR (95% CI) para infecção para HCV	p
C/G	0,549	0,550	1,00	
C/C	0,000	0,000	-	-
A/G	0,157	0,190	1,18 (0,52 – 2,67)	0,69
A/C	0,294	0,260	0,87 (0,44 – 1,74)	0,69

Os haplótipos representam os alelos para os SNP -607 C>A (rs1946518) e -137 G>C (rs1972238), respectivamente. Odds ratio (OR) para a infecção do HCV para cada haplótipo comparado com o OR do haplótipo mais frequente (CG) considerado como 1. O valor representa a prevalência da infecção crônica do HCV ajustada por sexo e idade. IC: intervalo de confiança. Considerado como significativo $p < 0,05$.

4.2.2. Polimorfismo no gene da IL18BP

Os polimorfismos da IL18BP foram avaliados nos dois grupos de estudo e pode-se observar que tanto os indivíduos com infecção crônica quanto os indivíduos com resolução espontânea o predomínio do genótipo encontrado foi o CC seguido pelo CT para o rs1541304 [Figura 8A ($p = 0,554$)]. Esta semelhança na distribuição dos genótipos entre os grupos também foi observada para o rs2298455 localizado no mesmo gene [Figura 8B ($p = 0,816$)].

Figura 8: Distribuição dos genótipos dos polimorfismos localizados no gene da *IL18BP*.(A) genótipos encontrados para o polimorfismo C>T rs1541304 (B) genótipos encontrados para o polimorfismo A>C rs2298455.

A frequência dos haplótipos também foi analisada e nenhuma associação foi encontrada em relação aos polimorfismos no gene da *IL18BP* com o curso da infecção pelo HCV como demonstra a tabela 6 a seguir.

Tabela 6. Frequência haplotípica dos SNPs no gene da *IL18BP* de acordo com a cronicidade da infecção pelo HCV.

Haplótipos rs1541304/ rs2298455	Resolução Espontânea (n=51)	Infecção Crônica (n=50)	OR (95% CI) para infecção para HCV	p
C/A	0,843	0,811	1,00	
C/C	0,108	0,119	0,80 (0,29 – 2,18)	0,66
T/A	0,049	0,069	0,73 (0,19 – 2,72)	0,64
T/C	0,000	0,000	-	-

Os haplótipos representam os alelos para os SNPs rs1541304 e rs2298455, respectivamente. Odds ratio (OR) para a infecção do HCV para cada haplótipo comparado com o OR do haplótipo mais frequente (CA) considerado como 1. O valor representa a prevalência da infecção crônica do HCV ajustada por sexo e idade. IC: intervalo de confiança. Considerado significativo $p < 0,05$.

4.2.3. Polimorfismo no gene do *IFN-γ*

O polimorfismo +874 localizado no gene do *IFN-γ* (Figura 9), a análise mostrou perfis genotípicos diferentes para cada grupo estudado. Os indivíduos com infecção crônica pelo HCV genótipo 1 apresentaram o predomínio do genótipo TA. Por outro lado, os indivíduos com resolução espontânea o genótipo AA foi o mais frequente para este polimorfismo ($p=0,006$).

Figura 9: Distribuição dos genótipos do polimorfismo localizado no gene do *IFN-γ*.

4.3. Expressão do mRNA da IL-18, IL-18BP e IFN- γ

Os resultados de expressão do mRNA das citocinas IL-18, IL18BP e IFN- γ foram comparadas nos dois grupos de estudo. A tabela a seguir mostra o resultado da análise estatística (Tabela 7)

Tabela 7- Análise comparativa dos níveis de expressão de mRNA IL-18, IL18BP e IFN- γ .

	Infecção Crônica pelo HCV (n=50)	Resolução Espontânea pelo HCV (n=51)	valores de p
Expressão mRNA ($2^{-\Delta CT}$)			
IL-18	0.004 (0.001-0.012)	0.001 (0.000-0.003)	0.0013
IL18BP	0.015 (0.006-0.153)	0.007 (0.000-0.013)	<0.001
IFN-γ	0.376 (0.128-1.059)	0.414 (0.105-0.589)	0,322

Os dados estão apresentados em valores de mediana e interquartil (25th - 75th). Teste Mann-Whitney. Considerado significativo $p < 0,05$.

Os níveis de expressão das citocinas IL-18 e IL-18BP foram maiores no grupo de infecção crônica quando comparados com o grupo de resolução espontânea, essa diferença foi estatisticamente significativa para os níveis de expressão de IL-18 ($p=0.0013$) e IL18BP (<0.001).

Em relação à expressão de IFN- γ não foi observada diferença significativa entre os indivíduos infectados cronicamente pelo HCV e os de resolução espontânea ($p= 0.322$).

4.4. Avaliação dos níveis séricos de citocinas

A partir de amostras de soro dos indivíduos selecionados no presente estudo, foi realizada a dosagem sérica das citocinas IL-18, IL18BP e IFN- γ .

O resultado do ELISA mostra que indivíduos com infecção crônica possuem elevados níveis séricos de IL-18 (507,75 pg/mL) quando

comparados aos níveis séricos dos com resolução espontânea (400,1 pg/mL) [Figura 10].

Figura 10: Comparação dos níveis séricos da IL-18. Os dados estão apresentados em valores de mediana e interquartil (25th-75th); Teste T.

O mesmo foi encontrado em relação a IL18BP, os indivíduos com infecção crônica possuem maiores níveis séricos desta citocina (163,83 pg/mL) quando comparados aos indivíduos com resolução espontânea (75 pg/mL) [Figura 11]. Em relação os níveis séricos do IFN- γ foram menores do que o limite de detecção do kit em ambos os grupos de estudo (dados não mostrados).

Figura 11: Comparação dos níveis séricos de IL18BP Os dados estão apresentados em valores de mediana e interquartil (25th-75th); Teste Mann-Whitney.

4.4.1. Associação entre os níveis séricos com polimorfismos de base única.

No grupo de resolução espontânea foi observado que os níveis séricos de IL-18 foram significativamente menores nos pacientes com o genótipo CC do que naqueles pacientes que herdaram pelo menos um alelo G, na qual caracterizamos os genótipos GG, GC e CC com alta, intermediária e baixa produção de IL-18, respectivamente, [CC: 398 ± 73 , GC: 440 ± 28 e GG: 512 ± 24 pg/mL; média $\pm$ erro padrão da média; $p=0.02$ (Figura 12)], enquanto que no grupo de infecção crônica essa associação não foi observada ($p=0,32$), assim como, para outras associações entre os níveis séricos e os demais polimorfismos analisados no presente estudo (dados não mostrados).

Figura 12: Impacto do polimorfismo -137G>C no nível sérico da IL-18 nos indivíduos com infecção crônica pelo HCV e com resolução espontânea .

4.4.2. Correlação entre os níveis séricos de IL-18 e IL18BP

O papel regulador da IL18BP frente aos níveis séricos de IL-18 foi analisado através do teste de Spearman, no qual observou uma tendência a uma correlação positiva mostrado na Figura 13 abaixo (coeficiente $\rho=0,28$ e $p=0,007$).

Figura 13: Correlação entre os níveis séricos de IL-18 e IL18BP.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A infecção pelo HCV representa um problema mundial de saúde pública. Estima-se que, em todo o mundo, existam cerca de 170 milhões de indivíduos cronicamente infectados pelo HCV. [1-4] Estudos demonstram que, na maior parte das infecções crônicas, o HCV não é capaz de induzir uma resposta imunológica eficiente pelo hospedeiro ou é altamente capaz de driblar o sistema imunológico condizendo com a estimativa de que em 60 a 80 % dos infectados progridam para a cronicidade [16, 17, 87, 88] sendo que 20% destes casos crônicos evoluem para cirrose e destes, 1-5% evoluem para carcinoma hepatocelular (CHC). [10-14] Por outro lado, de 20 a 40% dos indivíduos infectados resolvem a infecção de forma espontânea. [18, 19]

Nos últimos anos, muitos conhecimentos foram adquiridos em relação à história natural da infecção pelo HCV, bem como fatores importantes relacionadas à progressão da doença hepática e a complexa interação entre a resposta imune do hospedeiro e o vírus da hepatite C. [89] Estudos têm demonstrado associações entre polimorfismos em genes de citocinas com o dano hepático e fatores genéticos do hospedeiro, bem como fatores virais, que podem estar associados com eliminação ou persistência viral. [90] No entanto, os mecanismos que determinam essas diferenças na progressão da infecção pelo HCV permanecem obscuros. Dessa forma, no presente estudo, foram avaliadas as frequências dos SNPs nos genes da *IL-18*, *IL18BP* e *IFN- γ* , os níveis de expressão do mRNA desses genes e por fim, os níveis séricos de *IL-18*, *IL18BP* e *IFN- γ* nos indivíduos com histórico de infecção pelo HCV (resolução espontânea) e indivíduos com infecção crônica pelo HCV.

A associação de polimorfismos de citocinas com manifestações de algumas doenças, bem como a possível susceptibilidade a estas, se baseia no fato de que diferenças polimórficas podem influenciar a produção destas citocinas.

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória que potencializa respostas imunes do tipo Th1. Os polimorfismos do gene da *IL-18* estão relacionados com a atividade da interleucina, por provável influência na transcrição gênica e, conseqüentemente, variações de seus níveis séricos. [91] Estudos prévios demonstram que indivíduos homozigotos para os alelos -137 G e -607 C expressam níveis mais elevados de IL-18, enquanto que na presença dos alelos -137 C e -607 a sua atividade está reduzida. [80, 92]

Em diferentes populações foi demonstrada associação entre polimorfismos da *IL-18* com a resolução espontânea e com a infecção crônica pelo HCV. Em um estudo realizado por An e colaboradores (2008) cujo objetivo era avaliar os SNPs presente no gene da IL-18 durante a infecção pelo HCV, foi observado que o alelo A do -607 e o alelo C do -137 eram mais frequentes entre os pacientes com resolução espontânea. [61] No entanto, essa diferença só foi observada em indivíduos americanos e não em indivíduos com ancestralidade europeia. Na mesma linha de pesquisa, outro estudo descreveu que a herança genética de no mínimo um alelo C na posição -607 ou um alelo G na posição -137 do gene da *IL-18* parece ser fator de risco para o desenvolvimento de formas mais graves de infecção crônica pelo HCV em indivíduos Tunisianos. [93]

No presente estudo, evidenciou-se que não houve diferença genotípica e haplotípica para os polimorfismos no gene da IL-18 entre o grupo de infecção crônica e resolução espontânea nos indivíduos brasileiros. No entanto, a casuística deste estudo foi testada para ancestralidade (dados não mostrados, pois é parte de outro estudo) e foi

observado predomínio de indivíduos com maior carga genética europeia do que ameríndia e/ou africana nos dois grupos de estudo. Portanto, os resultados para os polimorfismos de *IL-18* estão em concordância com o estudo de An e colaboradores que não encontraram associação para os indivíduos europeus.

Estudos prévios descreveram a *IL-18* como um marcador de inflamação e dano hepático, sendo que estes níveis séricos foram correlacionados com a severidade da inflamação nos pacientes infectados pelo HCV. [94, 95] Realmente já foi observado que na infecção pelo HCV o nível sérico da *IL-18* se encontra em níveis elevados nos indivíduos infectados cronicamente. [58, 96, 97]

Outro estudo mostra que o nível de mRNA de *IL-18* está elevado no fígado de indivíduos com infecção crônica pelo HCV [98] e, de fato, no presente estudo que utilizou o sangue periférico, foram observados altos níveis de mRNA de *IL-18* nos indivíduos cronicamente infectados pelo HCV quando comparados aos indivíduos com resolução espontânea. Além desse aumento nos níveis de mRNA foi observada uma diferença significativa entre níveis de *IL-18* entre o grupo de infecção crônica e o grupo de resolução espontânea. A explicação para este resultado pode ser atribuída à ativação constante da resposta imune exercida pela presença viral, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias.

No presente estudo foi verificado se os polimorfismos no gene da *IL-18* poderiam ter impacto na produção desta citocina inflamatória durante a infecção pelo HCV. Essa associação não foi observada para os polimorfismos -607 C>A e -137 G>C nos indivíduos com infecção crônica, uma vez que os níveis séricos de *IL-18* estavam elevados de uma forma geral, independente do genótipo apresentado.

No entanto foi possível observar que no grupo de resolução espontânea para o polimorfismo -137 G>C, a presença do alelo G estava

correlacionada com o maior nível sérico de IL-18, sendo característico desta população.

A fim de equilibrar os níveis de IL-18 nosso sistema imune produz uma citocina importante para o seu controle, a qual se denomina IL18BP, sua proteína ligante, esta exerce um papel fundamental na regulação da atividade da IL-18, atuando como um antagonista natural e impedindo a produção de IFN- γ . [53, 59, 60, 62, 68] Mosbruguer e colaboradores (2010) observaram que o polimorfismo no gene da *IL18BP* (rs2298455) estava associado com a resolução espontânea da infecção pelo HCV tanto para indivíduos europeus e americanos. [82] No entanto, no presente estudo não foi observado nenhuma associação com a infecção crônica pelo HCV ou a resolução espontânea.

No estudo de Ludwiczek et al (2002) foi encontrado níveis séricos elevados de IL-18 e IL18BP em pacientes com doença hepática crônica, comparando com indivíduos saudáveis usados como controles. [58, 71] De fato, os dados obtidos no presente estudo evidenciaram essa diferença estatística entre o grupo de infecção crônica pelo HCV e o de resolução espontânea em relação ao nível sérico de IL18BP e como mencionado anteriormente de IL-18. Com isso foi observado uma tendência à correlação positiva entre o nível sérico de IL-18 e de seu regulador IL-18BP, reforçando o papel imunomodulador da IL18BP.

Os níveis séricos de IL18BP no grupo de infecção crônica estão elevados, em concordância com outro dado do presente estudo, onde foi observado que o mRNA de IL18BP desses indivíduos estão mais expressos quando comparado ao grupo de resolução espontânea.

A IL-18 leva a produção de IFN- γ , uma importante citocina inflamatória expressa principalmente por células T e pelas células NK ativadas. A ação do IFN- γ geralmente resulta na ativação de macrófagos e na diferenciação de células T, promovendo uma resposta

imune do tipo Th1. [99] A expressão gênica muitas vezes pode ser afetada pelos polimorfismos em regiões promotoras ou em regiões de ligação NF κ B.

No caso do IFN- γ alguns estudos têm mostrado que o SNP localizado na posição +874 desempenha um papel primordial na produção de IFN- γ , com três possíveis genótipos (AA, TA e TT) e vários fenótipos. [84] Uma vez que este SNP se encontra no sítio de ligação do NF κ B e se liga preferencialmente ao alelo T, a presença do alelo A reduz a sua ligação, reduzindo assim a expressão de IFN- γ em resposta ao estímulo. [100]

Estudos prévios mostraram que variações no gene do IFN- γ têm sido associadas com infecção pelo vírus da Hepatite B e pelo vírus da Hepatite C, além de associação com tuberculose, câncer de mama, asma entre outros. [85] 102]

Nosso estudo mostrou uma diferença significativa deste polimorfismo entre o grupo de infecção crônica no qual o genótipo de maior predomínio foi o TA, já no grupo de resolução espontânea o genótipo de maior frequência foi o AA. Desse modo esse resultado está em discordância com estudos previamente reportados, onde essa diferença entre diferentes evoluções clínicas da Hepatite C não foi significativa. [101, 102]

Estudo prévio realizado no Brasil associou a presença do alelo T com fator de risco para o desenvolvimento de cirrose quando comparados a pacientes homozigotos para o alelo A. Esses genótipos foram associados com um fator de risco de 2 vezes para a progressão a formas mais graves da doença hepática. [103]

Apesar dos resultados deste estudo ter mostrado perfil distinto entre o grupo de infecção crônica e o grupo de resolução espontânea, não foi observado uma associação entre os genótipos, expressão do mRNA e

os níveis séricos. É de se considerar que produção de IFN- γ em muitos outros estudos está sendo avaliada utilizando ensaios de estimulação em culturas celulares e não ensaios imunoenzimáticos. [73]

De fato, já foi mencionado que o HCV possui mecanismos de escape do sistema imunológico como a ligação da proteína viral E2 a molécula CD81 presente na superfície das células NK de forma a inibir a estimulação de IFN- γ . [50, 52]

Na infecção crônica pelo HCV, também foi observada uma baixa produção de IFN- α e de IL-12 pelas células dendríticas plasmocitóides e mielóides, respectivamente. As células dendríticas produzem citocinas IL-12 e IL-15 que agem de forma a intensificar a função da célula NK. Alguns trabalhos sugerem que o HCV inibe a função das DCs fazendo com que a estimulação das células NK seja comprometida e, além disso, as proteínas estruturais do vírus podem interagir com TLRs e induzir a produção de IL-10, o qual inibe a função de células dendríticas e NKs. [38, 50] Entretanto, em outro estudo realizado pelo nosso grupo sobre a infecção crônica pelo HCV, não foi observado alterações nas frequências de células dendríticas e NK, indicando que a frequência dessas células não teve um papel determinante na evolução da infecção. Além do mais se destacaram as células NK citotóxicas altamente diferenciadas e incapazes de produzir IFN- γ , sendo que esta baixa produção de IFN- γ por parte das células NK é um dos fatores envolvidos na deficiente ativação de uma resposta imune adaptativa capaz de controlar a infecção pelo HCV. [104, 105]

A regulação da expressão do mRNA IFN- γ analisada no presente trabalho não mostrou diferença estatística entre os grupos de infecção crônica pelo HCV e resolução espontânea. Em um estudo recente de Savan (2014) descreve a regulação da expressão gênica pelos RNAs não codificantes, no qual revelou uma nova dimensão na regulação pós-transcricional.[73] Dentre os RNAs não codificantes, os microRNAs

(miRNAs) são uma importante classe de pequenos RNAs endógenos que surgiram como potentes reguladores da expressão gênica, o qual resulta no silenciamento do gene pela supressão da tradução ou pela degradação do mRNA. É observado que o mRNA do IFN- γ possui na sua região 3'UTR um elemento de reconhecimento de miRNA se tornando alvo para a ação direta destes. Já foram descritos que os miR-29 e miR-155 estão implicados na modulação da transcrição, nos eventos pós-transcricionais e na sinalização do IFN- γ . [73]

Além disso, a produção de IFN- γ pode ser afetada por diversos membros da resposta imune, via ativação de vários fatores de transcrição, a qual ativa ou reprime a sua transcrição. Já foi descrito que o TGF β inibe a expressão de IFN- γ por inibir a expressão dos fatores de transcrição T-bet e STAT4, os quais são importantes para a sua expressão. Também foi mostrado evidências de que o gene do IFN- γ esteja sujeito a modificação epigenética, essas modificações são controladas por vários fatores de transcrição, incluindo o T-bet em regiões promotoras, sendo particularmente importantes uma vez que estas áreas estejam envolvidas na expressão de genes. [73]

Desta forma, a resposta imune do hospedeiro contra o HCV é um importante fator na evolução clínica da doença. A resolução espontânea representa um grande evento na história natural da infecção pelo HCV, podendo ser influenciada por diversos mecanismos, entre eles aqueles que controlam a resposta imune. Habitualmente nos indivíduos infectados cronicamente por este vírus tendem a apresentar resposta imune inata e adaptativa ineficazes contra o vírus, exibindo uma redução da frequência das células NKs bem como suas funções de citotoxicidade. Considerando-se que a interleucina -18 é uma citocina pró-inflamatória que potencializa respostas imunes do tipo Th1 e coestimula a produção de outras citocinas inflamatórias, bem como o IFN- γ , pode-se supor que apesar do sistema imune ser estimulado durante a infecção

pelo HCV, a persistência viral leva a um estado de anergia onde a produção de IFN- γ parece ser escassa para uma resposta imune eficaz e que existam fatores intrínsecos ainda não completamente estabelecidos na regulação gênica do IFN- γ .

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- ❖ Não se identifica nenhuma associação entre os polimorfismos da *IL-18* e *IL18BP* com as diferentes formas evolutivas da infecção pelo HCV (resolução espontânea e infecção crônica).
- ❖ O genótipo TA do polimorfismo do IFN- γ foi associado com o grupo de infecção crônica, enquanto o genótipo AA foi o de maior frequência para o grupo de resolução espontânea, indicando variações genótípicas diferentes em ambos os grupos.
- ❖ O genótipo GG na posição -137 da *IL-18* foi associado com maior nível sérico de IL-18 nos indivíduos com resolução espontânea.
- ❖ A expressão do mRNA de IL-18 e IL18BP, e consequentemente os níveis séricos destas citocinas estão elevadas em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV em relação aos com resolução espontânea.
- ❖ A expressão do mRNA de IFN- γ foi semelhante entre os grupos de infecção crônica pelo HCV e resolução espontânea.
- ❖ Foi observada uma tendência a uma correlação positiva entre os níveis séricos de IL-18 e IL18BP.

Anexos

7. ANEXOS

ANEXO A: Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
- 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 (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE: **“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA IL-18 E IL18BP E DOS POLIMORFISMOS DE SEUS GENES EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES EVOLUÇÕES CLÍNICAS DA HEPATITE C”**

2. PESQUISADOR: **Dr. João Renato Rebello Pinho**

CARGO/FUNÇÃO: **Médico** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **51.496**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Departamento de Gastroenterologia**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável

Rubrica do pesquisador

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

As informações seguintes estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo:

Você teve contato com o vírus da hepatite C e está sendo convidado a participar de nosso estudo. Os avanços na área de saúde ocorrem através de estudos como esse, e por isso sua participação é importante. Nós queremos entender como algumas pessoas conseguem eliminar o vírus rapidamente, outras precisam do auxílio de remédios e outras não conseguem nem com o tratamento.

É importante estudar seus genes, ou seja, as moléculas que ficam dentro de suas células e que determinam as características dos seres vivos. Por exemplo, alguns genes podem determinar a sua imunidade, isto é, o modo como seu organismo reage ao contato com os agentes causadores de doenças, incluindo o vírus da hepatite C. Para isso, precisamos de uma amostra de seu sangue, colhido da veia do braço, em seis tubos de laboratório (no total 30 ml). Os genes que pretendemos analisar são: *interferon- γ* , *IP-10*, *IL18*, *IL28B* e *IL18BP*a. Asseguramos que nossa pesquisa está de acordo com os critérios éticos internacionais.

Todo paciente que participa dessa pesquisa tem direito de escolher entre ser informado ou não sobre os resultados de seus exames, sobre o andamento de nossos estudos e avanços. Tem também a garantia de que os resultados são sigilosos e que estes resultados e seu sangue serão somente utilizados com finalidades bem aceitas pelas normas de ética científica mundiais. Cabe ainda ressaltar que todo material coletado será armazenado em nosso laboratório sob nossa responsabilidade e caso sejam úteis para futuros projetos somente serão utilizados mediante a autorização do paciente e mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e pela CONEP. Além disso, o participante é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, podendo se recusar a participar desta pesquisa sem que isso lhe traga prejuízos no tratamento que recebe da equipe médica.

Não há riscos adicionais de danos à saúde relacionados a essa pesquisa. Você poderá ter algum desconforto quando receber uma picada para que se colha o sangue de seu braço. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Nossa equipe assiste a todos os pacientes que são acompanhados nos ambulatórios de doenças do fígado (A2MG) em suas intercorrências, de acordo com os recursos que nos são disponíveis nesta instituição.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. João Renato Rebello Pinho, que pode ser encontrado no endereço AV. DOUTOR ÉNEAS DE CARVALHO AGUIAR, 500 / 2º andar – Instituto de Medicina tropical. Telefone(s) 3061-8217. A médica responsável é a Dra. Ana Catharina de Seixas Santos e-mail: ana.css@uol.com.br, que pode ser encontrada no ambulatório de Doenças do Fígado: terça-feira e sexta-feira, 7-12 hs, PAMB, 4º andar, sala 11, tel: (11) 2661-7943. Urgências: Pronto Socorro do HCFMUSP. Secretaria da Disciplina de Gastroenterologia: tel: (11) 2661-7940.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA IL-18 E IL18BP E DOS POLIMORFISMOS DE SEUS GENES EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES EVOLUÇÕES CLÍNICAS DA HEPATITE C”**

Eu discuti com o Dr. João Renato Rebello Pinho sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

[illegible]

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818

Assinatura da testemunha _____ Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO B: Aprovação da Comissão Ética para Análise de projetos de pesquisa- CaPPesp

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DA IL-18 E IL18BP E DOS POLIMORFISMOS DE SEUS GENES EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES EVOLUÇÕES CLÍNICAS DA HEPATITE C.

Pesquisador Responsável: João Renato Rebello Pinho

Versão: 3

Pesquisador Executante: Paola Lara Faria

CAAE: 06388512.4.0000.0068

Co-autores: Fernanda de Mello Malta, Ana Catharina de Seixas Santos Nastri

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Instituição: HCFMUSP

Departamento: GASTROENTEROLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 9698

Número do Parecer: 151.913

Data da Relatoria: 21/11/2012

Apresentação do Projeto: O projeto apresentado é bastante interessante, de extrema relevância para área. Foi apresentado de maneira clara, objetiva, bem escrito e com fundamentação científica apropriada. Serão estudados 100 pacientes com antecedentes de infecção pelo HCV, sem tratamento prévio, encaminhados aos Ambulatórios de Hepatologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), que serão divididos em dois grupos: - indivíduos com histórico de resolução espontânea da infecção pelo HCV, e - indivíduos com infecção crônica pelo HCV genótipo 1.

Objetivo da Pesquisa: O objetivo do projeto é analisar polimorfismos tipo SNP nos genes da IL-18 e IL18BP e avaliar comparativamente a expressão dos respectivos genes entre os indivíduos que montaram uma resposta imune bem sucedida, ou seja, clarearam espontaneamente o HCV com aqueles que evoluíram para infecção crônica. Irão ser comparados também dados de expressão desses genes e de dosagem plasmática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Os únicos riscos da pesquisa são aqueles inerentes à coleta de sangue (dor e formação de hematoma). Não há benefício direto ao indivíduo, uma vez que se trata de estudo descritivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O projeto está apresentado de maneira clara e os objetivos são justificáveis para melhor entendimento da etiologia da doença. Os dados clínicos serão retirados dos prontuários dos pacientes haverá somente coleta de sangue para análise genética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Alguns pontos devem ser esclarecidos e modificações devem ser realizadas para que o projeto possa ser aprovado: - É necessário encaminhar uma carta de aprovação/colaboração do chefe do Serviço onde serão recrutados os pacientes. - O pesquisador declara que o projeto será custeado por financiamento próprio, mas é necessário que haja um esclarecimento de onde virá esse financiamento (verba do laboratório, pessoal, outros projetos, etc...), já que o mesmo envolve a compra de kits de biologia molecular que têm um custo alto. - No Cadastro de Pesquisa consta que o projeto terá a duração de 2 anos, mas no TCLE esse dado é de 3 anos. É necessário corrigir em um dos documentos para que todas as informações sejam coerentes em todos os documentos. - é necessário também descrever no projeto a idade mínima dos pacientes que irão participar da pesquisa. Caso haja a inclusão de menores de 18 anos, é necessário encaminhar, além do TCLE direcionado aos pais ou responsáveis, um Termo de Assentimento para que seja assinado pelo participante. - NO TCLE encaminhado consta a informação de que futuras pesquisas com esse mesmo material coletado só serão

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

realizadas após a aprovação do CEP e CONEP. Favor retirar essa frase, pois não é necessário o encaminhamento desse tipo de protocolo à CONEP. - Uma vez que foi declarado pelo pesquisador que haverá o armazenamento das amostras biológicas e possível uso para pesquisas futuras, é necessário que o TCLE seja adaptado às novas normas de elaboração de biorrepositórios, aprovadas pela CAPPesq. Para isso, um novo modelo de TCLE foi encaminhado a todos os departamentos para que seja usado nesse tipo de pesquisa. Esse modelo também está disponível na página da CAPPesq. Caso o SR. não encontre, favor entrar em contato com a secretaria da CAPPesq. Todas as modificações realizadas no projeto devem ser assinaladas, para que não seja necessário avaliar todo o projeto novamente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: No parecer anterior foi solicitado que o pesquisador citasse a fonte financiadora do projeto, apresentasse uma carta de concordância pelo responsável pelo Serviço, e fizesse algumas modificações em relação ao TCLE. O pesquisador encaminhou carta declarando que o projeto já foi aprovado pela FAPESP, assim como a carta de anuência do chefe do Serviço e realizou todas as modificações e esclarecimentos solicitados anteriormente.

Situação do Parecer: APROVADO

Necessita Apreciação da CONEP: NÃO

São Paulo, 23 de Novembro de 2012

PI
Prof. Dr. Luiz Eugênio Garcez Leme
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa-CAPPesq

ANEXO C: Artigo científico submetido para publicação.

De: "Journal of Hepatitis Research" <hepatitis@austinpublishinggroup.net>

Data: 4 de outubro de 2014 03:59:22 BRT

Para: "'Fernanda de'" <femalta@yahoo.com>

Assunto: RE: Reg: Submission Acknowledgement

Dear Dr. Fernanda de,

Greetings for the day!

Thank for your valuable contribution.

We have received peer review comments from reviewers.

We here attach the comments below to revise the manuscript “-137G>C POLYMORPHISM IN THE PROMOTER REGION OF IL18 GENE IS ASSOCIATED WITH SERUM INTERLEUKIN 18 (IL-18) LEVELS IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION” within few days.

Accepted with minor changes.

Please feel free to contact us contact us for further queries.

Best regards,

Helen Ruth

Editorial manger

Editorial office- Annals of Nutritional Disorders & Therapy

Austin Publishing Group

3126 Riverside Station Blvd

Secaucus, New Jersey 07094, USA

Tel: [201-655-7075](tel:201-655-7075)

For more information: <http://www.austinpublishinggroup.com/nutritional-disorders/>

137G>C POLYMORPHISM IN THE PROMOTER REGION OF IL18 GENE IS ASSOCIATED WITH SERUM INTERLEUKIN 18 (IL-18) LEVELS IN PATIENTS WITH HEPATITIS C VIRUS INFECTION

Faria PL¹, Patente TA^{4,5}, Nastri ACSS^{1,3}, Carrilho FJ¹, Pinho JRR^{1,2*}, Malta FM¹

¹Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil

²Hospital Israelita Albert Einstein, Brazil

³Department of Infectious and Parasitic Diseases, University of São Paulo School of Medicine, Brazil

⁴Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

⁵Celular and Molecular Laboratory (LIM25), University of São Paulo School of Medicine, Brazil

***Corresponding author:** Pinho JRR, Department of Gastroenterology, University of São Paulo School of Medicine, Brazil, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar No. 255, Prédio II, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil, Tel: +55 1130618217; Email: jrrpinho@usp.br

Abstract:

Hepatitis C virus (HCV) is usually associated with chronic infection and the factors leading to viral clearance or persistence are poorly understood. Interleukin 18 (IL-18) is a pro-inflammatory cytokine with broad biological effects. Several polymorphisms in the *IL18* gene and plasma IL-18 levels have been reported to influence the outcome of hepatitis C. In this study, *IL18* gene promoter polymorphisms (-607C>A and -137G>C) and levels of serum IL-18 were analyzed in 51 HCV spontaneous clearance and 50 chronically infected patients. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped by qPCR with specific primers and a specific ELISA was used for the quantitative determination of IL-18 cytokine. The results showed that there was no evidence for association between the polymorphisms and the outcome of HCV infection. Nevertheless, plasma IL-18 levels were found to be higher in chronic HCV infected patients than in HCV clearance ones. GG genotype at position -137 was associated with higher IL-18 levels in the studied population even when adjusted for HCV infection status. In conclusion, our data suggest that -137 G>C in IL-18 gene is associated with a functional dysregulation of the IL-18 production in a Brazilian cohort of patients with HCV infection.

Keywords: IL-18, HCV, single polymorphism and viral clearance.

Introduction

Hepatitis C virus (HCV) infection is usually subclinical and typically asymptomatic in the acute phase. However, the virus replicates in the liver continuously and progressively and it is estimated that more than 130 million people were infected worldwide [1, 102]. A hallmark of HCV infection is its high propensity to establish persistence in 60–80% of infected individuals. These patients are unable to eliminate the virus and most of them evolve to a chronic infection accompanied by liver inflammation, followed by liver fibrosis, cirrhosis and an increased risk to develop hepatocellular carcinoma (HCC) [10, 11, 15]. Nevertheless, some patients are able to spontaneously clear the virus. Estimates of clearance rates ranged from 20-40% [18, 19] and the reasons why these differences exist in the progression of the disease are not fully understood, although the influence of host and viral factors must be considered.

The immune factors and other biomarkers associated with HCV pathogenesis are not well defined and very little is known about the early events in virus–host interactions that determine HCV clearance versus progression to chronic HCV infection. Cytokines play a key role in the regulation of immune responses. During Hepatitis C virus infection, the production of cytokine appears to contribute to viral persistence and to affect response to therapy [38-40, 46].

One factor that can modulate the host immune response is Interleukin-18 (IL-18), also known as IFN γ -inducing factor, an important regulator of innate and adaptive immune responses that has multiple roles in chronic inflammation and autoimmune disorders [53, 60, 65, 66]. IL-18, a member of IL-1 cytokine family, IL-18 is an 18 kDa glycoprotein synthesized as a 23 kDa inactive precursor (pro-IL-18) that needs to be cleaved by caspase-1 in order to become an active. [53, 54, 60, 62, 68, 106, 107]. It is a pleiotropic cytokine expressed at relatively high levels in different cell types, such as macrophages, osteoblasts, monocytes, macrophages, keratinocytes, intestinal epithelial cells, astrocytes, dendritic cells and microglia [55, 56, 59, 62, 64, 66].

The IL-18 plays a fundamental role in host defense against pathogens and can regulate both innate immunity and adaptive responses. In chronic HCV infection, the implication of IL-18 has been repeatedly proven in several studies, first as a marker of inflammation

and hepatic injury and, second, as a predictor of antiviral treatment response [54, 58, 59, 62, 67, 94, 106-108]. IL-18 activity is determined in part by the action of an intrinsic inhibitor, an IL-18 binding protein (IL18BP), which has the ability to bind to a receptor site, preventing the action of IL-18 [59, 60, 68-70].

The *IL18* gene is located on chromosome 11q22.2-q22.3 and a variety of single polymorphisms (SNPs) have been detected within *IL18* gene sequence. Giedraitis *et al.*, [2001] described two SNPs at positions -607C>A (rs1946518) and -137G>C (rs197238). Both of them disrupt transcription factors binding sites leading to a decreasing level of IL-18 mRNA. The capacity for IL-18 cytokine production in individuals has a major genetic component. This has been related to polymorphisms within the regulatory regions of cytokine genes. Polymorphisms in *IL18* gene have been implicated in HCV infection outcome [61, 63, 80, 81].

This study was undertaken to investigate the association of two SNPs in the *IL18* gene (-607C>A [rs1946518] and -137 G>C [rs187238]) and the relationship between the clearance and the persistence of HCV infection in Brazilian patients. Associations with IL-18 cytokine levels were also assessed.

Materials and methods

Patients

A total of 101 subjects was recruited in this study, including 51 patients with anti-HCV positive and negative for HCV-RNA on at least two occasions, a minimum a six months apart, also confirmed by Recombinant ImmunoBlot Assay (spontaneous clearance) and 50 with chronic hepatitis C (anti-HCV and HCV-RNA positive, with the latter being repeatedly positive over at least a 6-month period of testing) [Table 1].

The study had been approved by the local ethics committee of Clinical Hospital of the University of São Paulo under protocol 151.913 (CAPPesq) and written informed consent was obtained from each participant before sampling.

DNA extraction and analysis of cytokine polymorphisms

Total genomic DNA was extracted from whole blood samples using the Qiamp DNA[®] blood mini kit (Qiagen[®], Hilden, Germany) following the protocol provided by manufacturer. All samples were typed for *IL18* gene polymorphisms (-607C>A and -137 G>C). Genotypes were determined by TaqMan SNP genotyping assays (-607C>A, assay ID: C_2898460_10 and -137 G>C, assay ID: C_2408546_10 of Applied Biosystems, by Life Technologies, Foster City, CA, USA). The reactions were performed in a final volume of 25 µl containing 10ng of DNA, 12.5 µl of 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 1.25 µl of the SNP genotyping assay reagent (Applied Biosystems) containing primers and MGB TaqMan probes. Real-time PCR was performed in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) under the following conditions: 10 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 second and at 60°C for 1 minute. Genotyping success rate was >95%. Genotyping was repeated in 5% of subjects with 100% concordance.

Assessment of IL-18 serum

A specific ELISA (Human IL-18 ELISA Kit, MBL, Nagoya, Japan) was used for the quantitative determination of IL-18 in serum. IL-18 concentration was determined according to a reference standard curve. The detection limit was 12.5 pg/ml.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean $\pm$ SD except where stated otherwise. Continuous variables were log-transformed for the analyses when the normality of the distribution was rejected by the Shapiro-Wilk W test. Fisher's chi squared test, ANOVA and ANCOVA were used for comparisons between groups. When the normality was not verified, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was selected. For the correlation analysis Pearson's r or Spearman's ρ were used. Associations with chronicity of HCV infection were assessed by regression models. Logistic regression analyses were used for cross-sectional analyses. Odds ratios (OR) with their 95% confidence intervals (CI) were computed for the risk allele of each SNP in a dominant model. Adjustments for clinical and biological parameters were carried out, by including them as covariates in the regression model. Correction for multiple comparisons was performed by the Bonferroni correction method and a value of

$p \leq 0.025$ was considered as significant for genotype-related comparisons. The power to detect associations of the SNPs with the chronicity of HCV infection was 0.20, for odds ratio ≥ 1.5 and $\alpha = 0.05$. Statistics were performed with JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC) software.

Results

Clinical Characteristics

A total of 101 patients with previous of infection by hepatitis C virus were enrolled in this study. Table 1 summarizes the demographic, virological and clinical characteristics for whole individuals included in this study, according to HCV infection state. Briefly, patients chronically infected with HCV had higher values of ALT, AST and GGT compared with patients with clearance infection, which might reflect a progression of disease and liver tissue damage. No significant difference was found between the groups regarding gender and age.

IL-18 promoter Genotype and Haplotype Frequencies

The genotype distribution of the two groups adhered to the theoretical proportions of Hardy-Weinberg equilibrium. Genotype frequencies according to HCV infection states are illustrated in Table 2. The frequencies of chronic HCV infection for -607C>A polymorphisms (CC: 48.2%; CA: 50.9%; AA: 48.1%) and for -137 G>C polymorphism (GG: 51.0%; GC: 50.0%; CC: 33.3%). It was not possible to observe an association with the prevalence of chronic HCV infection neither with the -607C>A polymorphism (OR 1.05; 95% C.I. 0.43 – 2.58; $p = 0.90$) nor with the -137 G>C polymorphism (OR 0.87; 95% C.I. 0.39 – 1.92; $p = 0.74$) in a dominant model of logistic regression analysis adjusted for sex and age. The CA genotype was the most common genotype among clearance and infected group in -607C>A polymorphisms. Regarding the -137 G>C polymorphism, the most frequent genotype was the GG one.

Table 3 shows the haplotype analysis performed for both polymorphisms. It was not possible to observe an association of any haplotype with the prevalence of chronic HCV infection. The linkage disequilibrium was calculated and it was possible to observe that

there is moderate LD among the polymorphisms (D' : 0.99; r^2 : 0.47; X^2 : 94.41; $p < 0.0001$).

Plasma IL-18 concentration by clinical characteristics and genotype

The plasma concentration of IL-18 cytokine was assessed from serum samples from both HCV clearance and chronic infection individuals. IL-18 concentrations were higher in men than in women (518 ± 183 vs 428 ± 201 , pg/mL; mean $\pm$ SD; $p = 0.018$) and positively correlated with ALT (r^2 : 0.32; $p = 0.0024$) and AST (r^2 : 0.38; $p = 0.0003$) levels. It was possible to observe that patients with chronic HCV infections had higher values of IL-18 when compared with patients with clearance HCV infection (536 ± 203 vs 398 ± 168 ; pg/mL; mean $\pm$ SD; $p < 0.0003$. Figure 1). When an ANCOVA analysis adjusted for sex and age is assessed, the same result is obtained (547 ± 25 vs 402 ± 25 , pg/mL; mean $\pm$ SEM; $p < 0.0001$). No genotype-related difference was observed in IL-18 concentrations regarding the -607C>A polymorphism. However, regarding the -137 G>C polymorphism, the IL-18 levels were significantly lower in patients with CC genotype than those with GC or GG (398 ± 73 , 440 ± 28 and 512 ± 24 ; pg/mL; mean $\pm$ SEM; $p = 0.02$. Figure 2), observed in a codominant model of ANCOVA analysis, adjusted for sex, age and HCV infection chronicity. Interestingly, when the analysis is performed by HCV infection, the association remains significantly only in the clearance group (CC: 303 ± 89 , GC: 383 ± 39 , GG: 433 ± 35 ; mean $\pm$ SEM; $p = 0.02$) while in the HCV chronic group no association is observed (CC: 520 ± 128 , GC: 497 ± 38 , GG: 591 ± 35 ; mean $\pm$ SEM; $p = 0.32$). No association was observed between haplotype and IL-18 serum levels (data not shown).

Discussion

HCV infection is the leading cause of chronic liver disease worldwide and may progress to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Among the host determinants of hepatitis C outcome the immune response and host genetic variations seen to play a major role. In HCV infection the IL-18 cytokine has been reported to be up-regulated in chronic patients [58, 74, 97] and another study showed the IL-18 as a marker of both inflammation and hepatic injury. Positive correlation between IL-18 level and the severity of inflammation in hepatitis C patients were also observed [54, 71, 94, 109].

Since cytokines production varies among individuals and is associated with certain variations within coding and regulatory regions, is important to evaluate the possible associations of -607 and -137 polymorphisms in the *IL18* gene with susceptibility to HCV infection. After comparing patients who either had a persistent HCV infection or had cleared HCV infection, the present study demonstrated that two functional variants (-607C>A and -137G>C) were not associated with clearance or chronic HCV infection. These findings are consistent with previous studies that reported no differences in -607C>A and -137 G>C genotype distributions and allele frequencies between patients and controls [54, 91]. However other studies have had a different opinion about this polymorphism and the infection of HCV [61, 110].

In a previous study, it was demonstrated that the -607A allele occurred more frequently in the clearance group than in chronic infection and the -137C allele was also more frequently observed in the clearance group than in chronic infection, but this difference was just observed in African American and was not observed in European American [61, 110].

To validate the up-regulation of the IL-18 level in hepatitis C patients, their IL-18 serum levels were measured and compared to those of clearance. To avoid bias of serum IL-18 levels resulting from the therapy influence just untreated patients infected were included. Compared to clearance group, patients with chronic infection presented a higher increased in plasma IL-18 concentration than patients that had clear the virus. These findings confirm previous results revealing that disease progression is accompanied by an increase in plasma IL-18 and strongly support the involvement of IL-18 in causing liver injury [58, 59].

A significantly increased of IL-18 levels as well as HCV-induced IL-18 production by peripheral blood mononuclear cells has been observed in the patients with chronic HCV infection [55]. Those evidences show that high IL-18 level may compromise the cellular immune response to chronic HCV infection [59].

Pro-inflammatory cytokines play a dual role in virus infection. In acute infection, these cytokines act as an antiviral and help to clear the infection. On the other hand, these cytokines may stimulate the inflammatory process in chronic infection. It was previously reported a positive correlation between higher levels of pro-inflammatory cytokines

secreted in response to HCV-related liver injury, an increased necroinflammatory activity and liver fibrosis or cirrhosis [91]. Since IL-18 is a pro-inflammatory cytokine, and plays an important role in combating the invading pathogen as part of the innate immune response it was observed that elevated levels of circulating IL-18 correlate with HCV infection [59, 67]. Also it was described that higher levels of IL-18 coincided with the detection of HCV RNA in the blood [109].

The relation between IL-18 polymorphisms and serum levels was assessed. The results are consistent with previous studies concerning the link between -607C>A and -137G>C polymorphisms and the decreased expression of IL-18. Giedraitis et al (2001) showed that patients who are homozygous for C at position -607 and G at position -137 have higher levels of IL-18 mRNA compared to other genotypes. Arimitsu et al (2006) demonstrated that the monocytes from -137C carriers produce a lower amount of IL-18 than from -137G carriers [80, 111].

The greatest limitation of the study is the small sample size of our cohort, which might have, at least in part, affected our results. It was possible to observe an association with higher levels of IL-18 only in -137 G>C polymorphism, while no association was observed for the -607C>A. Regarding the -607C>A and the -137 G>C polymorphisms, for a minor allele frequency of 0.27 and 0.45, in the dominant model and a power of 0.80, the minimum OR detected for the prevalence of chronic HCV infection, in the present study, would be 3.2 and 3.7 respectively. So, we cannot exclude the possibility that we do not observe an association with the prevalence of chronic HCV infection, due to lack of power.

In our study although the -607 and -137 polymorphisms were not associated with the prevalence of chronic HCV infection, it was possible to observe that the polymorphism at position -137 in *IL18* gene was associated with serum levels of this cytokine. The CC genotype was observed commonly associated with individuals who have low production of the IL-18 cytokine, while individuals with GC and CC genotype were associated with intermediate and high production of IL-18. When individuals were separated by type of infection (clearance and chronic HCV infection), the association remains significantly only in clearance group. This might have occurred due to small sample size, and consequently lack of power of the study (as discussed above), or due to the fact that

individuals with chronic HCV infections had values of IL-18 so high that the polymorphism's effect is not so important. Indeed, in the ANCOVA analysis patients with the C allele had lower values of IL-18 cytokine in the chronic group (data not shown) but it was not enough to reach statistical significance.

In conclusion, our data suggest that -137 G>C polymorphism in *IL18* gene is associated with the IL-18 cytokine production in the serum of patients with HCV infection, more specifically with patients with clearance HCV infection. The data indicate that -137 G>C polymorphism associates with IL-18 serum levels in clearance HCV infection, but not in chronic HCV infection, probably, because the HCV infection is a multifactorial disease and other factors also affect protein levels. More studies with larger sample size are necessary to identify if this polymorphism might be involved in the progression of hepatitis C.

References

1. Sarvari, J., et al., *The Role of Interferon Gamma Gene Polymorphism (+874A/T, +2109A/G, and -183G/T) in Response to Treatment Among Hepatitis C Infected Patients in Fars Province, Southern Iran*. *Hepat Mon*, 2014. **14**(1): p. e14476.
2. Asselah, T., et al., *Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin*. *Liver Int*, 2010. **30**(9): p. 1259-69.
3. Poynard, T., et al., *A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases*. *J Hepatol*, 2003. **38**(3): p. 257-65.
4. Caldwell, S. and S.H. Park, *The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology*. *J Gastroenterol*, 2009. **44 Suppl 19**: p. 96-101.
5. Lavanchy, D., *The global burden of hepatitis C*. *Liver Int*, 2009. **29 Suppl 1**: p. 74-81.
6. Grebely, J., et al., *The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection*. *Hepatology*, 2014. **59**(1): p. 109-20.
7. Horner, S.M. and M. Gale, Jr., *Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 879-88.
8. Fallahi, P., et al., *Cytokines and HCV-related disorders*. *Clin Dev Immunol*, 2012. **2012**: p. 468107.

9. Park, S.H. and B. Rehermann, *Immune responses to HCV and other hepatitis viruses*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 13-24.
10. Rehermann, B., *Interaction between the hepatitis C virus and the immune system*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(2): p. 127-41.
11. Rehermann, B., *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1745-54.
12. Sugawara, I., *Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens*. Microbes Infect, 2000. **2**(10): p. 1257-63.
13. Alboni, S., et al., *Interleukin 18 in the CNS*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 9.
14. Dinarello, C.A., *Interleukin-18*. Methods, 1999. **19**(1): p. 121-32.
15. Dinarello, C.A., et al., *Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 289.
16. Thompson, S.R. and S.E. Humphries, *Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility*. Genes Immun, 2007. **8**(2): p. 91-9.
17. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
18. Novick, D., et al., *Interleukin-18, more than a Th1 cytokine*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 439-48.
19. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.

20. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 213-24.
21. Manohar, K., et al., *Association of IL-18 promoter polymorphism with liver disease severity in HCV-infected patients*. Hepatol Int, 2009. **3**(2): p. 371-7.
22. Novick, D., et al., *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
23. Okamura, H., et al., *Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity*. Adv Immunol, 1998. **70**: p. 281-312.
24. Haas, S.L., et al., *Interleukin 18 promoter variants (-137G>C and -607C>A) in patients with chronic hepatitis C: association with treatment response*. J Clin Immunol, 2009. **29**(5): p. 620-8.
25. Abbate, I., et al., *Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients*. J Med Virol, 2003. **70**(4): p. 581-7.
26. Falasca, K., et al., *Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(2): p. 144-50.
27. Mohran, Z.Y., F.A. Ali-Eldin, and H.A. Abdel Aal, *Serum interleukin-18: does it have a role in the diagnosis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma?* Arab J Gastroenterol, 2011. **12**(1): p. 29-33.
28. Sharma, A., et al., *Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e514-22.

29. Tsutsui, H., et al., *Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 192-209.
30. Hong, K., et al., *Recombinant Fc-IL-18BPc isoform inhibits IL-18-induced cytokine production*. Hybridoma (Larchmt), 2012. **31**(2): p. 99-104.
31. Kim, S.H., et al., *Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1190-5.
32. An, P., et al., *Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1159-65.
33. Giedraitis, V., et al., *Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation*. J Neuroimmunol, 2001. **112**(1-2): p. 146-52.
34. Huang, Y., et al., *A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 985-90.
35. Chen, C.F. and Y.Y. Gan, *Hardy-Weinberg disequilibrium of the IL-18 C-607A SNP suggesting selective advantage of heterozygotes*. Biochem Genet, 2012 **50**(1-2): p. 63-72.
36. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.

37. Vecchiet, J., et al., *Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease*. Ann Clin Lab Sci, 2005. **35**(4): p. 415-22.
38. Ludwiczek, O., et al., *Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease*. J Clin Immunol, 2002. **22**(6): p. 331-7.
39. Chattergoon, M.A., et al., *High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection*. J Infect Dis, 2011. **204**(11): p. 1730-40.
40. Bouzgarrou, N., et al., *Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection*. J Med Virol, 2008. **80**(4): p. 607-14.
41. Ksiaa Cheikhrouhou, L., et al., *Cytokine and apoptosis gene polymorphisms influence the outcome of hepatitis C virus infection*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011. **10**(3): p. 280-8.
42. Arimitsu, J., et al., *IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1413-6.

Table 1: Parameters and clinical laboratory measurements in the study populations

	Clearance	Chronic HCV infection	p-value
Male	22/51 (43%)	21/50 (42%)	
Age	48.5	48	0.535
ALT (U/L)	24 (16 - 28)	47 (60.5 – 66.5)	<0.0001
AST (U/L)	23 (20 - 28)	40 (28 – 47.7)	<0.0001
FA (U/L)	73 (60 - 101)	72.5(60.2 – 106.2)	0.986
GGT (U/L)	28 (18 - 39)	47 (25.7 – 73.2)	0.002
HCV-RNA (log)	ND	5.9	
HCV Genotype	---	1	

Laboratory data are presented in values medians and interquartile (25th-75th). Mann-Whitney test. HCV: hepatitis C virus; SD: standard deviation; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; FA: phosphatase alkaline; GGT: gamma glutamyl transferase; ND: not detectable

Table 2: Genotype frequencies by HCV chronicity

SNPs	Clearance	Chronic HCV infection	OR (95% CI)	p
N	51	50		
-607C>A			1.05 (0.43 – 2.58)	0.90
CC	0.275	0.260		
AC	0.549	0.580		
AA	0.176	0.160		
MAF	0.450	0.450		
-137G>C			0.87 (0.39 – 1.92)	0.74
GG	0.490	0.520		
GC	0.431	0.440		
CC	0.078	0.040		
MAF	0.293	0.260		

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are sorted in 5' to 3' order. OR (odds ratio) for the minor allele determined in logistic regression analyses adjusted for sex and age. MAF: minor allele frequency. p≤0.025 is significant.

Table 3: Haplotype frequencies according to HCV chronicity

Haplotype	Clearance (n=51)	Chronic HCV infection (n=50)	OR (95% CI) Chronicity of HCV	p
CG	0.549	0.550	1.00	
CC	0.000	0.000	-	-
AG	0.157	0.190	1.18 (0.52 – 2.67)	0.69
AC	0.294	0.260	0.87 (0.44 – 1.74)	0.69

Haplotypes represent the alleles of -607C>A and -137G>C, respectively. Odds ratios (OR) for each haplotype as compared to the odds for the most frequent haplotype (CG) considered to be 1. Data represents the prevalence of HCV chronicity adjusted for age and sex. CI, confidence interval. p<0.05 is significant.

Figure 1 - Serum level (pg/mL) of IL-18 in Chronic HCV infection and HCV clearance groups. Comparison level of IL-18 cytokine in serum from HCV infected patients and HCV clearance patients.

Figure 2 - Impact of -137G>C polymorphisms on IL-18 levels in serum of HCV patients

Comparison level of IL-18 cytokine in serum from HCV infected patients, according to -137G>C genotypes. Codominant model of ANCOVA analysis, adjusted for sex, age and type of HCV infection; $p=0.02$)

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Asselah, T., et al., *Hepatitis C: viral and host factors associated with non-response to pegylated interferon plus ribavirin*. Liver Int, 2010. **30**(9): p. 1259-69.
2. Mauss, S., et al., *Short Guide to Hepatitis C*, F. Publisher, Editor. 2013.
3. Viso, A.T., et al., *Portal CD4+ and CD8+ T lymphocyte correlate to intensity of interface hepatitis in chronic hepatitis C*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2007. **49**(6): p. 371-8.
4. WHO, W.H.O., *Hepatitis C*. 2014.
5. Martins, T., J.L. Narciso-Schiavon, and L. Schiavon Lde, *[Epidemiology of hepatitis C virus infection]*. Rev Assoc Med Bras, 2011. **57**(1): p. 107-12.
6. Saúde, M.d., *Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais*, A.e.H.V. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Editor. 2012.
7. Bezerra, C.S., et al., *Viral Hepatitis C in a leading Brazilian hospital: epidemiological factors and genotyping*. Brazilian Journal of Microbiology, 2007. **38**.
8. Kang, W. and E.C. Shin, *Clinical implications of chemokines in acute and chronic hepatitis C virus infection*. Yonsei Med J, 2011. **52**(6): p. 871-8.
9. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. **345**(1): p. 41-52.
10. Caldwell, S. and S.H. Park, *The epidemiology of hepatocellular cancer: from the perspectives of public health problem to tumor biology*. J Gastroenterol, 2009. **44 Suppl 19**: p. 96-101.
11. Lavanchy, D., *The global burden of hepatitis C*. Liver Int, 2009. **29 Suppl 1**: p. 74-81.
12. Rychlowska, M. and K. Bienkowska-Szewczyk, *Hepatitis C--new developments in the studies of the viral life cycle*. Acta Biochim Pol, 2007. **54**(4): p. 703-15.
13. Sangiovanni, A., et al., *The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: A 17-year cohort study of 214 patients*. Hepatology, 2006. **43**(6): p. 1303-10.
14. Wiese, M., et al., *Low frequency of cirrhosis in a hepatitis C (genotype 1b) single-source outbreak in germany: a 20-year multicenter study*. Hepatology, 2000. **32**(1): p. 91-6.
15. Massard, J., et al., *Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2006. **44**(1 Suppl): p. S19-24.
16. de Vasconcelos, R.R., et al., *[Factors associated with severe evolutive forms of chronic infection with hepatitis C virus]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2006. **39**(5): p. 433-8.

17. Liu, L., et al., *Spontaneous clearance of primary acute hepatitis C virus infection correlated with high initial viral RNA level and rapid HVR1 evolution*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1684-91.
18. Grebely, J., et al., *The effects of female sex, viral genotype, and IL28B genotype on spontaneous clearance of acute hepatitis C virus infection*. Hepatology, 2014. **59**(1): p. 109-20.
19. Horner, S.M. and M. Gale, Jr., *Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus*. Nat Med, 2013. **19**(7): p. 879-88.
20. Pearlman, B.L., C. Ehleben, and S. Saifee, *Treatment extension to 72 weeks of peginterferon and ribavirin in hepatitis c genotype 1-infected slow responders*. Hepatology, 2007. **46**(6): p. 1688-94.
21. Butt, A.A. and F. Kanwal, *Boceprevir and telaprevir in the management of hepatitis C virus-infected patients*. Clin Infect Dis, 2012. **54**(1): p. 96-104.
22. FDA, U.S.F.a.D.A. *Approval of Incivek (telaprevir), a direct acting antiviral drug (DAA) to treat hepatitis C (HCV)*. 2011 [cited 2014 29 de janeiro]; Available from: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ByAudience/ForPatientAdvocates/ucm256328.html>.
23. SUS, P.d.S. *SUS amplia lista de medicamentos ofertados*. 2012 [cited 2014 29 de maio].
24. Wendt, A., et al., *Chronic hepatitis C: future treatment*. Clin Pharmacol, 2014. **6**: p. 1-17.
25. Choo, Q.L., et al., *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. Science, 1989. **244**(4902): p. 359-62.
26. Heller, T., et al., *An in vitro model of hepatitis C virion production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2579-83.
27. Wakita, T., et al., *Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome*. Nat Med, 2005. **11**(7): p. 791-6.
28. Yu, X., et al., *Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles*. Virology, 2007. **367**(1): p. 126-34.
29. Bartenschlager, R., et al., *Assembly of infectious hepatitis C virus particles*. Trends Microbiol, 2011. **19**(2): p. 95-103.
30. Simmonds, P., et al., *Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes*. Hepatology, 2005. **42**(4): p. 962-73.
31. Jackowiak, P., et al., *Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus*. Infect Genet Evol, 2014. **21**: p. 67-82.

32. Smith, D.B., et al., *Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment Web resource*. Hepatology, 2013. **59**(1): p. 318-27.
33. Bartenschlager, R., V. Lohmann, and F. Penin, *The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(7): p. 482-96.
34. Griffin, S.D., et al., *A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 2): p. 451-61.
35. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
36. Sakai, A., et al., *The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11646-51.
37. Suzuki, T., et al., *Molecular biology of hepatitis C virus*. J Gastroenterol, 2007. **42**(6): p. 411-23.
38. Fallahi, P., et al., *Cytokines and HCV-related disorders*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 468107.
39. Park, S.H. and B. Rehermann, *Immune responses to HCV and other hepatitis viruses*. Immunity, 2014. **40**(1): p. 13-24.
40. Rehermann, B., *Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence*. J Clin Invest, 2009. **119**(7): p. 1745-54.
41. Lloyd, A.R., et al., *Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(1): p. 24-32.
42. Sklan, E.H., et al., *Mechanisms of HCV survival in the host*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(4): p. 217-27.
43. Wathélet, M.G., et al., *Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 507-18.
44. Tai, A.W. and R.T. Chung, *Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response*. J Hepatol, 2009. **50**(2): p. 412-20.
45. Bigger, C.B., K.M. Brasky, and R.E. Lanford, *DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection*. J Virol, 2001. **75**(15): p. 7059-66.
46. Rehermann, B., *Interaction between the hepatitis C virus and the immune system*. Semin Liver Dis, 2000. **20**(2): p. 127-41.

47. Liu, Z.X., et al., *NK cells cause liver injury and facilitate the induction of T cell-mediated immunity to a viral liver infection*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6480-6.
48. Meier, U.C., et al., *Shared alterations in NK cell frequency, phenotype, and function in chronic human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections*. J Virol, 2005. **79**(19): p. 12365-74.
49. Zeromski, J., et al., *NK cells prevalence, subsets and function in viral hepatitis C*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(6): p. 449-55.
50. Nellore, A. and J.A. Fishman, *NK cells, innate immunity and hepatitis C infection after liver transplantation*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(3): p. 369-77.
51. Tseng, C.T. and G.R. Klimpel, *Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 43-9.
52. Thimme, R., et al., *Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15661-8.
53. Dinarello, C.A., *Interleukin-18*. Methods, 1999. **19**(1): p. 121-32.
54. Manohar, K., et al., *Association of IL-18 promoter polymorphism with liver disease severity in HCV-infected patients*. Hepatol Int, 2009. **3**(2): p. 371-7.
55. Sims, J.E. and D.E. Smith, *The IL-1 family: regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 89-102.
56. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 213-24.
57. Liew, F.Y., *The role of innate cytokines in inflammatory response*. Immunol Lett, 2003. **85**(2): p. 131-4.
58. Sharma, A., et al., *Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e514-22.
59. Tsutsui, H., et al., *Pathophysiological roles of interleukin-18 in inflammatory liver diseases*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 192-209.
60. Dinarello, C.A., et al., *Interleukin-18 and IL-18 Binding Protein*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 289.
61. An, P., et al., *Regulatory polymorphisms in the interleukin-18 promoter are associated with hepatitis C virus clearance*. J Infect Dis, 2008. **198**(8): p. 1159-65.
62. Novick, D., et al., *Interleukin-18, more than a Th1 cytokine*. Semin Immunol, 2013. **25**(6): p. 439-48.
63. Chen, C.F. and Y.Y. Gan, *Hardy-Weinberg disequilibrium of the IL-18 C-607A SNP suggesting selective advantage of heterozygotes*. Biochem Genet, 2012

50(1-2): p. 63-72.

64. Thompson, S.R. and S.E. Humphries, *Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility*. Genes Immun, 2007. **8**(2): p. 91-9.
65. Alboni, S., et al., *Interleukin 18 in the CNS*. J Neuroinflammation, 2010. **7**: p. 9.
66. Sugawara, I., *Interleukin-18 (IL-18) and infectious diseases, with special emphasis on diseases induced by intracellular pathogens*. Microbes Infect, 2000. **2**(10): p. 1257-63.
67. Mohran, Z.Y., F.A. Ali-Eldin, and H.A. Abdel Aal, *Serum interleukin-18: does it have a role in the diagnosis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma?* Arab J Gastroenterol, 2011. **12**(1): p. 29-33.
68. Novick, D., et al., *Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response*. Immunity, 1999. **10**(1): p. 127-36.
69. Hong, K., et al., *Recombinant Fc-IL-18BPc isoform inhibits IL-18-induced cytokine production*. Hybridoma (Larchmt), 2012. **31**(2): p. 99-104.
70. Kim, S.H., et al., *Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1190-5.
71. Ludwiczek, O., et al., *Plasma levels of interleukin-18 and interleukin-18 binding protein are elevated in patients with chronic liver disease*. J Clin Immunol, 2002. **22**(6): p. 331-7.
72. Platanias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
73. Savan, R., *Post-Transcriptional Regulation of Interferons and Their Signaling Pathways*. J Interferon Cytokine Res, 2014.
74. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
75. Larkin, J., 3rd, et al., *Regulation of Interferon Gamma Signaling by Suppressors of Cytokine Signaling and Regulatory T Cells*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 469.
76. Billiau, A. and P. Matthys, *Interferon-gamma: a historical perspective*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 97-113.
77. Muhl, H. and J. Pfeilschifter, *Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma*. Int Immunopharmacol, 2003. **3**(9): p. 1247-55.
78. George, P.M., et al., *Pharmacology and therapeutic potential of interferons*. Pharmacol Ther, 2012. **135**(1): p. 44-53.
79. Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, D.o.M.a.H.G., et al., *The International HapMap Project*. Nature, 2003. **426**(6968): p. 789-96.

80. Giedraitis, V., et al., *Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation*. J Neuroimmunol, 2001. **112**(1-2): p. 146-52.
81. Huang, Y., et al., *A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 985-90.
82. Mosbruger, T.L., et al., *Large-scale candidate gene analysis of spontaneous clearance of hepatitis C virus*. J Infect Dis, 2010. **201**(9): p. 1371-80.
83. Griggs, N.D., et al., *The N-terminus and C-terminus of IFN-gamma are binding domains for cloned soluble IFN-gamma receptor*. J Immunol, 1992. **149**(2): p. 517-20.
84. Pravica, V., et al., *A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production*. Hum Immunol, 2000. **61**(9): p. 863-6.
85. Dai, C.Y., et al., *Polymorphism of interferon-gamma gene at position +874 and clinical characteristics of chronic hepatitis C*. Transl Res, 2006. **148**(3): p. 128-33.
86. Novaes, C.M. and M.P. Alves, *PCR em tempo real*, B.C. Desenvolvimento, Editor. 2004.
87. Blackard, J.T., et al., *Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 321-31.
88. Valiante, N.M., et al., *Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 77-89.
89. Boonstra, A., A.M. Woltman, and H.L. Janssen, *Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infections*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2008. **22**(6): p. 1049-61.
90. Romero-Gomez, M., et al., *Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment*. Liver Int, 2011. **31**(4): p. 443-60.
91. Bouzgarrou, N., et al., *Association of interleukin-18 polymorphisms and plasma level with the outcome of chronic HCV infection*. J Med Virol, 2008. **80**(4): p. 607-14.
92. Puren, A.J., et al., *Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF-alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells*. J Clin Invest, 1998. **101**(3): p. 711-21.
93. Bouzgarrou, N., et al., *Combined effect of pro- and anti-inflammatory cytokine gene polymorphisms on susceptibility to liver cirrhosis in Tunisian HCV-infected patients*. Hepatol Int, 2011. **5**(2): p. 681-7.
94. Falasca, K., et al., *Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(2): p. 144-50.

95. Neuman, M.G., et al., *Cytokine--chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C*. Transl Res, 2007. **149**(3): p. 126-36.
96. Schvoerer, E., et al., *Production of interleukin-18 and interleukin-12 in patients suffering from chronic hepatitis C virus infection before antiviral therapy*. J Med Virol, 2003. **70**(4): p. 588-93.
97. Vecchiet, J., et al., *Association between plasma interleukin-18 levels and liver injury in chronic hepatitis C virus infection and non-alcoholic fatty liver disease*. Ann Clin Lab Sci, 2005. **35**(4): p. 415-22.
98. McGuinness, P.H., et al., *Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection*. Gut, 2000. **46**(2): p. 260-9.
99. Barbulescu, K., et al., *IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 1998. **160**(8): p. 3642-7.
100. Smith, N.L. and D.W. Denning, *Clinical implications of interferon gamma genetic and epigenetic variants*. Immunology, 2014.
101. Mandour, M., et al., *Impact of the IL-18 gene polymorphism in response to antiviral therapy in chronic HCV genotype 4 patients*. Rev Soc Bras Med Trop, 2013. **47**(2): p. 137-42.
102. Sarvari, J., et al., *The Role of Interferon Gamma Gene Polymorphism (+874A/T, +2109A/G, and -183G/T) in Response to Treatment Among Hepatitis C Infected Patients in Fars Province, Southern Iran*. Hepat Mon, 2013. **14**(1): p. e14476.
103. Teixeira, A.C., et al., *Alleles and genotypes of polymorphisms of IL-18, TNF-alpha and IFN-gamma are associated with a higher risk and severity of hepatocellular carcinoma (HCC) in Brazil*. Hum Immunol, 2013. **74**(8): p. 1024-9.
104. Malta, F.M., *Perfil de células natural killer e dendríticas em casos de soroconversão espontânea e infecção crônica pelo vírus da Hepatite C* 2013: São Paulo.
105. Malta, F.M., et al., *HCV viremia drives an increment of CD86 expression by myeloid dendritic cells*. J Med Virol, 2013. **85**(11): p. 1919-24.
106. Okamura, H., et al., *Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity*. Adv Immunol, 1998. **70**: p. 281-312.
107. Haas, S.L., et al., *Interleukin 18 promoter variants (-137G>C and -607C>A) in patients with chronic hepatitis C: association with treatment response*. J Clin Immunol, 2009. **29**(5): p. 620-8.

108. Abbate, I., et al., *Endogenous levels of mRNA for IFNs and IFN-related genes in hepatic biopsies of chronic HCV-infected and non-alcoholic steatohepatitis patients*. J Med Virol, 2003. **70**(4): p. 581-7.
109. Chattergoon, M.A., et al., *High plasma interleukin-18 levels mark the acute phase of hepatitis C virus infection*. J Infect Dis, 2011. **204**(11): p. 1730-40.
110. Ksiai Cheikhrouhou, L., et al., *Cytokine and apoptosis gene polymorphisms influence the outcome of hepatitis C virus infection*. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2011. **10**(3): p. 280-8.
111. Arimitsu, J., et al., *IL-18 gene polymorphisms affect IL-18 production capability by monocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **342**(4): p. 1413-6.