

SARA TATIANA MOREIRA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E DE RECEPTORES DE
CITOCINAS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO E NO GRAU DO DANO HEPÁTICO EM
PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA**

**Influence of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms in response to
treatment and on the degree of liver damage in patients with chronic hepatitis C**

Curitiba

2012

SARA TATIANA MOREIRA

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E DE RECEPTORES DE
CITOCINAS NA RESPOSTA AO TRATAMENTO E NO GRAU DO DANO HEPÁTICO EM
PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho

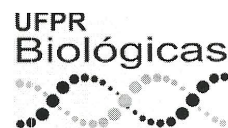
Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno

Curitiba

2012



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a qual se submeteu **SARA TATIANA MOREIRA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "B".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 30 de julho de 2012

Professor Doutor Eduardo Antonio Donadi
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Membro Titular

Professora Doutora Karin Braun-Prado
Dep. Patologia Básica/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Professora Doutora Valéria Maria Munhoz Sperandio Roxo
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

Professor Doutor Maria da Graça Bicalho
Dep. Genética/UFPR – Orientadora e Presidente da Banca

Visto

Professor Doutor Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética

Dedico este trabalho às futuras gerações de pesquisadores que desejam fazer ciência com honestidade e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A meus pais Maria e Antonio pelo incentivo e carinho, mas principalmente por me apoiarem em todos os momentos, não me deixando desistir.

Ao meu namorado Ricardo pela sua compreensão e por torcer sempre pelo meu sucesso.

A Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Bicalho pela orientação e confiança, mas acima de tudo, pelo senso de humanidade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno, pela co-orientação, paciência, compreensão, apoio em todos os momentos e principalmente pela amizade que desenvolvemos ao longo de sete anos.

Aos professores, técnicos e colegas do laboratório de Imunogenética da UEM, pelo auxílio e prestatividade em todas as circunstâncias que necessitei.

Ao pessoal do LIGH pela colaboração e companheirismo, por baixarem artigos para mim, pelas caronas e tudo mais.

Aos professores do departamento de genética da UFPR por me auxiliarem na construção de meus conhecimentos.

Ao Laboratório de Imunogenética da UEM pelo apoio financeiro e físico para a realização deste trabalho.

A divisão de gastroenterologia e ao laboratório de biologia molecular do hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho através da coleta e fornecimento do material biológico.

Aos doadores das amostras de sangue. Que nossos resultados somem-se a outros e reverta-se em benefícios a vocês e outros portadores de hepatite C crônica.

As demais pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Às agências financiadoras.

“Deus é o autor da ciência. As pesquisas científicas abrem vasto campo de idéias e informações, habilitando-nos a ver Deus em Suas obras criadas....A verdadeira ciência contribui com novas provas da sabedoria e do poder de Deus. Devidamente compreendidas, a ciência e a Palavra escrita concordam entre si, lançando luz uma sobre a outra. Juntas, conduzem-nos para Deus, ensinando-nos algo das sábias e benéficas leis por que Ele opera.”

Ellen Gold White

RESUMO

O vírus da hepatite C (HCV) é um patógeno capaz de causar infecção crônica em cerca de dois terços dos indivíduos infectados, conseqüência de suas habilidades em driblar tanto a imunidade inata quanto a adquirida. A fibrose é resultado de injúrias repetitivas causadas aos hepatócitos decorrente da infecção pelo HCV e da ação da resposta imunológica, que levam a uma falha no processo regenerativo e deposição de uma quantidade abundante de matriz extracelular. Citocinas regulam a resposta inflamatória à injúria interferindo também na fibrogênese. O protocolo padrão de tratamento para hepatite C crônica é baseado na combinação de interferon-alfa convencional ou peguillado e ribavirina, administrados por 24 ou 48 semanas, respectivamente. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) localizados em regiões reguladoras/codificadoras de genes de citocinas poderiam contribuir para a fibrogênese hepática, bem como influenciar a resposta ao tratamento, pois interferem na expressão e secreção de citocinas, importantes proteínas que participam da resposta imunológica contra o HCV. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi tipar 22 SNPs localizados em 13 genes de citocinas/receptores de citocinas visando avaliar a influência das variantes polimórficas no grau de dano hepático e na resposta ao tratamento em pacientes brasileiros cronicamente infectados apenas pelo genótipo 1 do HCV. Variantes polimórficas para as posições *TNFA*-308, *IL6*-174, *IL6*nt565 e *IL4RA*+1902 estão associadas ao grau de dano hepático. Variantes polimórficas para as posições *IL10*-819, *IL10*-592, *IL1A*-889, *IL1B*+3962, *IL1R1* pst1 1970 e *IL4RA*+1902 estão associadas à resposta ao tratamento. Concluímos que polimorfismos em genes de citocinas/receptores de citocinas parecem estar influenciando o dano hepático, bem como a resposta ao tratamento nos pacientes estudados.

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is a pathogen responsible for chronic infection in around two thirds of infected individuals, due to its ability to evade both innate as well as acquired immunity. Hepatic fibrosis may be the result of repetitive injury to the hepatocytes caused by HCV infection and the immune response to it, leading to a failure in the regenerative process and deposition of an abundant amount of extracellular matrix. Cytokines regulate the inflammatory response to injury also interfering in fibrogenesis. The current standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C is based on a combination of conventional or pegylated interferon alpha (pegIFN-alpha) and ribavirin administered for 24 or 48 weeks, respectively. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in regulatory/encoding regions of cytokine genes could influence hepatic fibrogenesis and treatment response, since they interfere with the expression and secretion of cytokines, which are important factors participating in the immune response against HCV. Therefore, the aim of this study was to determine the genotype of 22 SNPs found in 13 genes of cytokines/cytokine receptors to assess the influence of polymorphic variants in the degree of liver damage and in treatment response in Brazilian patients chronically infected with HCV genotype 1 only. Polymorphic variants for *TNFA*-308, *IL6*-174, *IL6*nt565 and *IL4RA*+1902 positions were associated with the degree of liver damage. Polymorphic variants for *IL10*-819, *IL10*-592, *IL1A*-889, *IL1B*+3962, *IL1R1* pst1 1970 and *IL4RA*+1902 positions were associated with treatment response. We conclude that gene variants of cytokines/receptors may influence liver damage and treatment response in studied patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organização do genoma do vírus da hepatite C (HCV).....	15
Figura 2 – Estrutura do vírus da hepatite C (HCV).....	15
Figura 3 – Árvore filogenética dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV).....	16
Figura 4 – Ciclo replicativo hipotético do vírus da hepatite C (HCV).....	17

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Programa para termociclador para amplificação pelo <i>Cytokine</i> <i>Genotyping kit</i> (Invitrogen®).....	101
Quadro 2 – Valores para cálculo de <i>Odds Ratio</i>	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de SNPs.....	37
Tabela 2 – Lista de SNPs e funcionalidade.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 HISTÓRICO.....	13
1.2 EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO.....	13
1.3 ETIOLOGIA.....	14
1.4 PATOGÊNESE.....	17
1.5 TRATAMENTO.....	18
1.6 IMUNOGENÉTICA DO HOSPEDEIRO.....	20
1.7 GENES DE CITOCINAS.....	25
1.7.1 INTERLEUCINA-1 α (IL-1 α) E O GENE <i>IL1A</i>	26
1.7.2 INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β) E O GENE <i>IL1B</i>	27
1.7.3 ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-1 (IL-1Ra) E O GENE <i>IL1RN</i>	28
1.7.4 RECEPTOR TIPO I DA INTERLEUCINA-1 (IL-1R1) E O GENE <i>IL1R1</i>	28
1.7.5 INTERLEUCINA-2 (IL-2) E O GENE <i>IL2</i>	29
1.7.6 INTERLEUCINA-4 (IL-4) E O GENE <i>IL4</i>	30
1.7.7 CADEIA ALFA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-4 (IL-4Ra) E O GENE <i>IL4RA</i>	31
1.7.8 INTERLEUCINA-6 (IL-6) E O GENE <i>IL6</i>	31
1.7.9 INTERLEUCINA-10 (IL-10) E O GENE <i>IL10</i>	32
1.7.10 CADEIA BETA DA INTERLEUCINA-12 (IL-12b) E O GENE <i>IL12B</i>	33
1.7.11 FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α) E O GENE <i>TNFA</i>	34
1.7.12 FATOR TRANSFORMANTE DE CRESCIMENTO- β 1 (TGF- β 1) E O GENE <i>TGFB</i>	35
1.7.13 INTERFERON- γ (IFN- γ) E O GENE <i>IFNG</i>	35
2. JUSTIFICATIVA.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4. CAPÍTULO I.....	43
5. CAPÍTULO II.....	68
6. DISCUSSÃO.....	94
7. CONCLUSÕES.....	96
APÊNDICE.....	97
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO.....	119

INTRODUÇÃO

1.1. HISTÓRICO

A hepatite C é uma inflamação hepática decorrente da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) que pode progredir para uma lesão necroinflamatória dos hepatócitos, de gravidade variável.

As hepatites são infecções antigas. Os primeiros relatos sobre uma icterícia epidêmica foram descritos por Hipócrates, no século V a.C.. Lurman, na Alemanha, em 1883, documentou o primeiro surto de uma forma de hepatite, posteriormente reconhecida como hepatite B. Inicialmente, um surto de varíola ocorreu em Bremen, acometendo trabalhadores de um estaleiro, que foram imunizados para varíola com vacina preparada a partir de linfa humana. Após semanas ou meses, alguns desses indivíduos apresentaram icterícia e foram diagnosticados como manifestando a hepatite do soro; aqueles que não manifestaram haviam sido inoculados com vacina proveniente de outro lote. No início do século XX, quando foi introduzido o uso de agulhas e seringas, também foram relatados outros casos, devido à esterilização inadequada das mesmas (MAHONEY, 1999).

Nas décadas de 30 e 40 também foram relatados casos de icterícia após imunização contra febre amarela, decorrente do uso de vacinas produzidas a partir de plasma humano. Durante a Segunda Guerra Mundial também houve diversos relatos, devido à intensa prática de transfusões sanguíneas (MS).

As infecções por HCV representaram um sério problema aos bancos de sangue e receptores na década de 1980, pois 2 a 10% das unidades de sangue transmitiam o vírus em países desenvolvidos (PRATI, 2006). A introdução de testes anti-HCV para doadores de sangue em meados de 1990 diminuiu drasticamente a transmissão do vírus por transfusão sanguínea nestes países (GONZALEZ et al., 1995). A partir de então, a transfusão de sangue passou a ser mais segura, porém ainda hoje existem indivíduos com hepatite C que adquiriram o vírus antes de 1992, por meio de transfusão sanguínea e/ou de hemoderivados (CDC, 2002).

1.2. EPIDEMIOLOGIA E TRANSMISSÃO

Antes da introdução de testes anti-HCV para doadores de sangue, em meados de 1990, a hepatite C representava a maior causa de hepatites associadas à transfusão (VAN DER POEL, 1999). Atualmente, devido a sua ampla distribuição mundial, a hepatite C representa um dos maiores problemas de saúde pública, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade (PAPATHEODORIDIS e PARASKEVIS, 2008).

A incidência mundial do HCV não é conhecida, pois a infecção aguda geralmente é assintomática, entretanto, estima-se que atualmente 3% da população mundial tenha sido infectada pelo HCV, que existam mais de 170 milhões de indivíduos infectados cronicamente com risco de desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) e ainda que ocorram de 3 a 4 milhões de novos casos ao ano (NIH, 1997; EASL, 1999). No Brasil, entre os anos de 1999 e 2010, foram registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 69.952 casos confirmados de hepatite C, destes, 47.830 provêm da região sudeste e 15.095 da região sul, que juntas concentram 90% dos casos confirmados no país (BRASIL, 2011a). A prevalência da doença é de 1,5% considerando-se todas as idades (6 meses a 98 anos) e 2,5% entre adultos (ZARIFE et al., 2006), classificando o país como de baixa endemicidade, apesar da OMS considerá-lo um país de endemicidade intermediária, com prevalência da infecção situada entre 2,5% e 10% (BRASIL, 2011b). Em outros países estima-se que a prevalência da doença seja de aproximadamente 0,3% no Canadá, 1,4 % nos Estados Unidos, 1,9% na Grécia, 3,0% na França, e 30,0% no Egito e África do Sul (MANESIS et al., 2009).

A transmissão da hepatite C ocorre predominantemente por via parenteral. Atualmente pertencem ao grupo de risco usuários de drogas injetáveis, indivíduos que se submetem a procedimentos que reutilizam materiais perfurocortantes (tatuagens, manicuros e *piercings*), alcoólatras, portadores do HIV, transplantados, hemodialisados, hemofílicos e presidiários. Dentre os casos notificados entre 1999 e 2009 no Brasil, observa-se que a maioria está relacionada ao uso de drogas (14,8%), à transfusão de sangue e/ou hemoderivados (14,9%) e à transmissão sexual (9%), com elevado percentual de ignorados (43%) (BRASIL, 2011a).

Desde a introdução de testes anti-HCV em bancos de sangue, a transmissão transfusional tornou-se praticamente ausente. A transmissão sexual também é pouco freqüente, sendo prevalente entre indivíduos sexualmente promíscuos. A transmissão vertical ocorre apenas quando a mãe apresenta altos níveis de RNA viral no soro, porém é rara quando comparada a hepatite B, sendo estimada em 2%, mas alcançando 20% em casos de co-infecção com HIV (FERREIRA e SILVEIRA, 2004; HUARTE e CASI, 2004).

1.3. ETIOLOGIA

O HCV foi identificado pela primeira vez em 1989, por Choo *et al.* (CHOO et al., 1989). É classificado como RNA-vírus, pertencente ao gênero *Hepacivirus* e à família *Flaviviridae*. É um vírus esférico, de aproximadamente 50 nm de diâmetro, com um RNA genômico formado por cerca de 9600 nucleotídeos organizados em fita única de sentido positivo (SIMMONDS et al., 2005).

O RNA codifica três proteínas estruturais (C - nucleocapsídeo, E1 e E2) e sete proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Figura 1). Ele está localizado dentro de um nucleocapsídeo icosaédrico protéico, envelopado por uma bicamada lipídica na qual um ou dois tipos de proteínas do envelope (E1 e E2) são ancoradas (Figura 2) (SIMMONDS et al., 2005; CHEVALIEZ e PAWLITSKY, 2006).

Figura 1 – Organização do genoma do vírus da hepatite C (HCV). NS: não estrutural

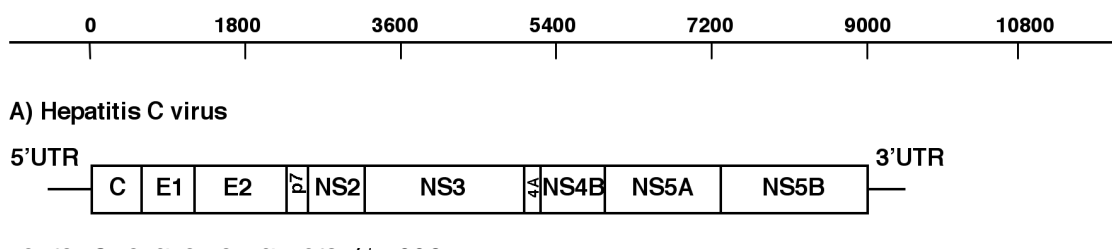
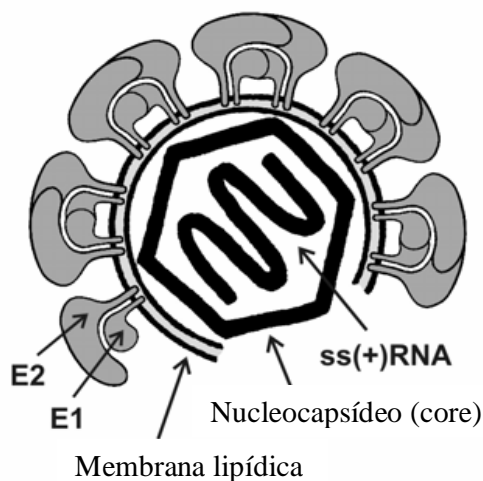


Figura 2 – Estrutura do vírus da hepatite C (HCV)

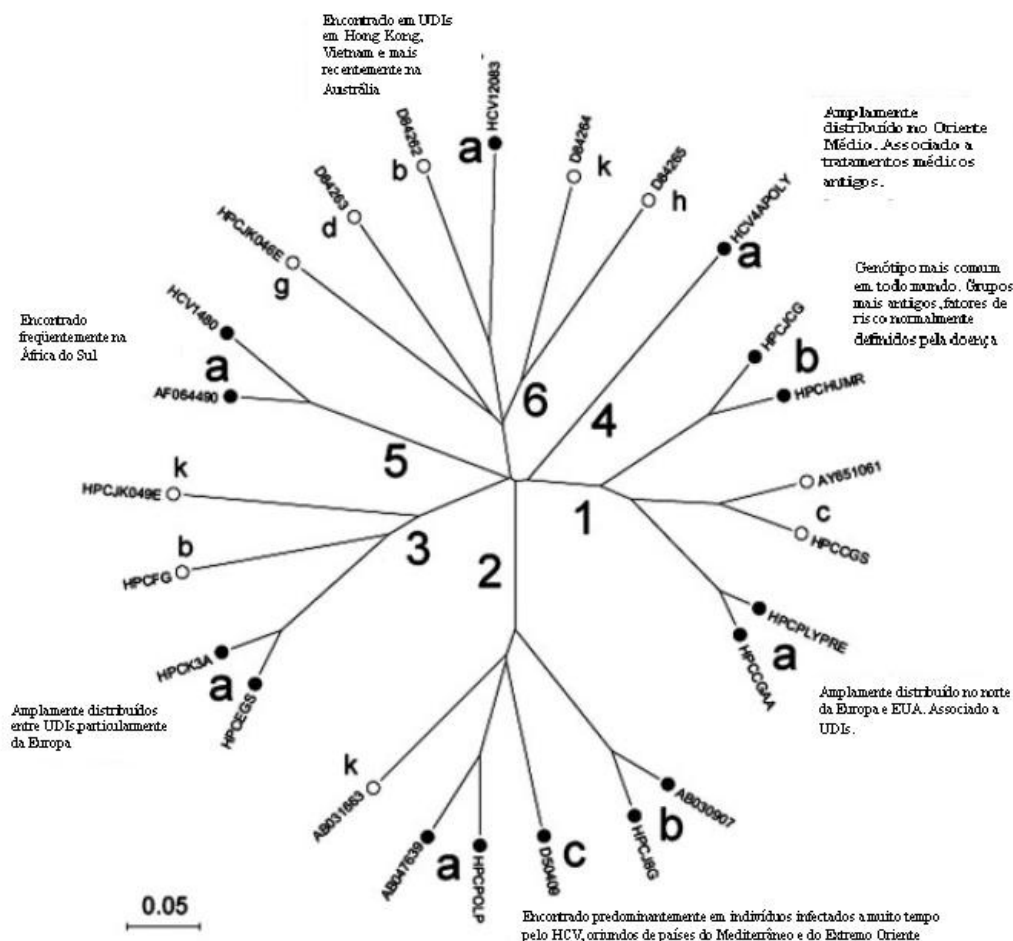


Fonte: Modificado de Chevaliez e Pawlitsky, 2006

Existem seis genótipos virais (denominados HCV 1 a 6) (Figura 3) e mais de 100 subtipos fortemente relacionados (FISHMAN e BRANCH, 2009). A classificação em genótipos e subtipos ocorreu com base nas diferenças entre suas seqüências nucleotídicas, sendo que os genomas diferem de 30 a 35% entre os genótipos e de 20 a 25% entre os subtipos (SIMMONDS, 2004; SIMMONDS et al., 2005). Os genótipos possuem distribuição geográfica distinta, sendo que os genótipos 1, 2 e 3 apresentam distribuição global enquanto os demais são encontrados somente em regiões específicas como África e Ásia (SIMMONDS et al., 1996; SIMMONDS, 1999; FARCI e PURCELL, 2000). No Brasil, o

genótipo 1 é o mais prevalente, seguido pelos genótipos 2 e 3 (SILVA et al., 2007; FREITAS et al., 2008).

Figura 3 – Árvore filogenética dos genótipos do vírus da hepatite C (HCV)



Fonte: Modificado de Simmonds et al., 2005. UDIs: Usuários de drogas intravenosas.

O HCV está em constante diversificação devido à rápida replicação viral, amplo tamanho das populações virais e altas taxas de mutação decorrentes da baixa fidelidade de sua RNA polimerase (DUARTE et al., 1994), permitindo assim a seleção ambiental dos exemplares melhor adaptados (PAWLOTSKY, 2006).

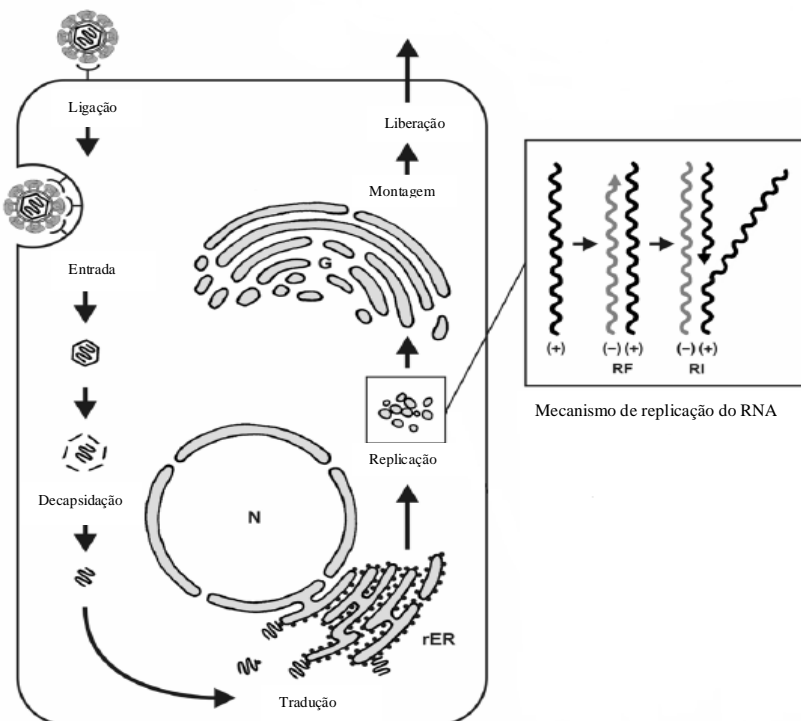
A determinação do genótipo viral previamente ao tratamento é uma importante ferramenta para o prognóstico e acompanhamento dos pacientes infectados, pois os genótipos virais comportam-se diferentemente durante o curso da infecção e a além de responderem de forma distinta ao tratamento antiviral (SIMMONDS et al., 1994).

1.4. PATOGÊNESE

A patogenia decorrente da infecção pelo HCV permanece não completamente esclarecida. A compreensão dos mecanismos através dos quais o HCV induz a resposta viral pelo hospedeiro, favorecendo na maior parte das vezes a persistência viral, além de esclarecer a patogenia da doença, permitiria o desenvolvimento de novas terapias imunomodulatórias para prevenir ou limitar as complicações decorrentes da infecção, o que inclui o transplante de fígado, um significativo problema de saúde pública (CHANDER et al., 2002; SHEPARD et al., 2005).

O HCV apresenta tropismo por células hepáticas. Ocorre a ligação a um ou mais receptores de membrana celular e internalização através de endocitose mediada por receptor. A fusão do envelope viral com a membrana plasmática permite a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Após a decapsidação ocorre a tradução, em nível citoplasmático, assim como a replicação. Posteriormente, novas estruturas virais são montadas e vírus maduros são liberados para o meio extracelular através de exocitose. As informações a respeito do ciclo de vida viral são limitadas em decorrência da incapacidade de cultivá-lo e da ausência de modelos animais (Figura 4) (CHEVALIEZ e PAWLITSKY, 2006).

Figura 4 – Ciclo replicativo hipotético do vírus da hepatite C (HCV)



Fonte: Modificado de Chevaliez e Pawlitsky, 2006

Embora a célula alvo para o HCV sejam os hepatócitos, o vírus também apresenta linfotropismo, pois fragmentos do genoma viral foram detectados em linfócitos B e T circulantes, bem como em células apresentadoras de antígenos, além do cérebro (MYRMEL et al., 2009).

A detecção viral pode ocorrer de uma a duas semanas após a infecção, pela presença de RNA viral no soro dos pacientes (HOOFNAGLE, 2002). O período de incubação é de aproximadamente sete semanas, porém a maioria dos indivíduos com infecção aguda não apresentam sintomas; por essa razão, a maioria das infecções é diagnosticada ao acaso em decorrência da elevação de transaminases ou em estágio avançado da doença quando as complicações já ocorrem (HOOFNAGLE, 2002; BLACKARD et al., 2008).

A infecção pode resultar em uma doença assintomática, culminando com a eliminação viral espontânea ou progredir para uma infecção crônica, que pode levar a cirrose, falha hepática ou carcinoma hepatocelular (SEEFF, 2002). Estima-se que em 20 a 50% dos infectados a resolução seja espontânea (BLACKARD et al., 2008). Pacientes com doença aguda sintomática e mulheres jovens têm uma taxa maior de resolução espontânea da infecção que outros grupos, e tendem a eliminar o RNA viral em até 12 semanas após início dos sintomas (BIALEK e TERRAULT, 2006; BRASIL, 2011b).

Na grande maioria dos casos, porém, não há eliminação viral espontânea, e o vírus persiste progredindo para infecção crônica. Aproximadamente 50 a 85% dos indivíduos infectados com o HCV irão desenvolver doença crônica (KENNY-WALSH, 1999; VILLANO et al., 1999). A doença crônica pode ser evidenciada por alterações histopatológicas, as quais iniciam com uma inflamação no fígado, que freqüentemente pode ser associada à fibrose, podendo evoluir em alguns casos para o hepatocarcinoma. (THOMAS e SEEFF, 2005). É estimado que 20% dos doentes crônicos evoluam para cirrose, principalmente em 20 anos após infecção, dentre os quais cerca de 3% desenvolverão hepatocarcinoma (NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002, 2002). O grau de dano é tradicionalmente verificado através da análise do tecido hepático obtido por biópsia, de acordo com escalas de graduação. Uma delas é a Metavir (BEDOSSA e POYNARD, 1996), que classifica o dano hepático em F0, F1, F2, F3 ou F4, sendo F0 correspondente a ausência de fibrose e F4 o grau mais avançado, ou seja, cirrose).

1.5. TRATAMENTO

O objetivo do tratamento é controlar a progressão da doença hepática por meio da inibição da replicação viral, sendo que a redução da atividade inflamatória impede a evolução para cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (REDDY et al., 2001). Antes de ser

iniciado o tratamento deve-se considerar o risco de progressão da doença, a probabilidade de resposta terapêutica, efeitos colaterais e a presença de comorbidades. No Brasil, o tratamento da hepatite C é realizado com interferon (IFN-alfa) ou peginterferon (pegIFN-alfa) associado à ribavirina, por 24 ou 48 semanas, respectivamente (GOTTO e DUSHEIKO, 2004; HADZIYANNIS et al., 2004; GHANY et al., 2009; BRASIL, 2011b). O IFN-alfa, administrado por via subcutânea, é uma citocina que faz parte da resposta inata do hospedeiro humano; a adição de uma molécula de polietilenoglicol a esta molécula prolonga sua ação, eleva a velocidade de absorção e aumenta sua meia-vida. Já a ribavirina é um análogo de nucleosídeo sintético administrado por via oral que apresenta ação antiviral e imunomodulatória (TSUBOTA et al., 2011).

Os interferons, além de exercerem um efeito antiviral, induzem uma resposta Th1 por parte do hospedeiro, sendo essa ação potencializada pelo uso combinado com a ribavirina (FANG et al., 2000; STITES et al., 2000). O tratamento com peginterferon e ribavirina desencadeia a mesma cascata de sinalizações que os IFN endógenos. Entretanto, apenas 55% dos indivíduos tratados apresentam resposta virológica sustentada (RVS), que indica sucesso no tratamento (MANNIS et al., 2001; FRIED et al., 2002). A RVS é obtida quando o RNA viral se torna indetectável no soro do paciente seis meses após o término do tratamento e é influenciada por fatores do hospedeiro, como etnia, idade, obesidade, resistência a insulina e variabilidade genética, assim como por mecanismos virais, como o genótipo e a carga viral previa ao tratamento e por fatores relacionados ao tratamento, como a dose do medicamento administrado (TAI e CHUNG, 2009; TSUBOTA et al., 2011).

A resposta ao tratamento pode ser classificada nas seguintes categorias: a) Resposta virológica rápida (RVR): quando o RNA viral se torna indetectável após 4 semanas de tratamento. Uma resposta rápida é um forte indicativo da ocorrência de RVS 24 semanas após o término do tratamento (TAI e CHUNG, 2009); b) Resposta virológica precoce (RVP): queda de ao menos duas escalas logarítmicas (2 Log) ou 100 vezes o valor do RNA viral pré-tratamento ou quando o mesmo se torna indetectável na 12ª semana de tratamento; c) Resposta virológica lenta: quando ocorre a diminuição do título de RNA viral para ao menos 2 \log_{10} após 12 semanas de tratamento, porém com eliminação viral até a 24ª semana; d) Resposta virológica sustentada (RVS): quando o RNA viral é indetectável na 24ª semana após o término do tratamento; e) Recidiva virológica (REC): quando o RNA viral é indetectável ao final do tratamento (48ª semana de tratamento), porém detectável na 12ª ou 24ª semana após o término do tratamento; f) Resposta nula (NR): quando o RNA viral é detectável na 48ª semana de tratamento (BRASIL, 2011b; JANG e CHUNG, 2011).

Avanços recentes na compreensão da estrutura e mecanismo de replicação viral permitiram o desenvolvimento de agentes que atuam diretamente nas enzimas envolvidas no ciclo de vida do HCV, denominados antivirais de ação direta (DAA). Estes se diferenciam

do IFN-alfa ou pegIFN-alfa associado à ribavirina, pois possuem ação direta enquanto os últimos apresentam ação antiviral inespecífica. Dois inibidores de proteases foram recentemente aprovados pelo “Food and Drug administration” (FDA), o Telaprevir e o Boceprevir, ambos indicados para o tratamento de hepatite C crônica decorrente da infecção pelo genótipo 1 do HCV. Eles devem ser administrados em combinação com o pegIFN-alfa. Ambos os medicamentos estão disponíveis na forma de comprimidos orais que devem ser ingeridos três vezes ao dia. A adição destes inibidores de proteases à terapia padrão aumentou intensamente as taxas de RVS em pacientes sem tratamento prévio, em recidivantes e em não respondedores. Outras drogas estão sendo testadas, como inibidores de polimerase viral, inibidores de NS5A e inibidores de fatores do hospedeiro, como a ciclofilina. A promessa é aumentar as taxas de RVS e diminuir a duração do tratamento (JESUDIAN et al., 2012).

1.6. IMUNOGENÉTICA DO HOSPEDEIRO

O HCV apresenta tropismo por hepatócitos, ocasionando sua infecção. A primeira via de defesa do hospedeiro consiste na imunidade inata, que é ativada por padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), reconhecidos por receptores Toll-like tipo 3 (TLR3) e gene indutível por ácido retinóico tipo I (RIG-I) das células infectadas, que reconhecem, respectivamente, RNAs fita dupla e RNAs fita dupla ou fita simples virais. Uma cascata de sinalizações é desencadeada, resultando na ativação e transcrição do gene *IFNB*. IFN- β age de modo autócrino e parácrino, estimulando receptores IFN- α e IFN- β , que induzem uma nova cascata de sinalização, que amplifica a transcrição dos genes *IFNA* e *IFNB*, gerando uma alça de retroalimentação positiva. Conseqüentemente, ocorre um aumento na expressão de interferons tipo I (IFNI), que agem diretamente no vírus, ou ativam de diversas maneiras a resposta imunológica adaptativa (WATHELET et al., 1998). IFNI estimula o processamento antigênico, a proliferação de linfócitos T de memória, a diferenciação de células dendríticas e o aumento na expressão de moléculas HLA classe I nos hepatócitos (TAI e CHUNG, 2009), além de inibir a replicação viral, induzir a apoptose de hepatócitos infectados (BIGGER et al., 2001), induzir a geração de proteossomos e conseqüente aumento da expressão de antígenos virais em hepatócitos infectados (SHIN et al., 2006).

Células dendríticas (CD) também participam da resposta imunológica frente ao HCV. A diferenciação das CDs é intensamente influenciada por proteínas estruturais e não estruturais do HCV *in vitro* (SZABO e DOLGANIUC, 2005). CDs plasmocitóides secretam altos níveis de IFN- α (assim como hepatócitos infectados), direcionando a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ para o fenótipo Th2, além de ativar macrófagos, linfócitos T CD8⁺ e células

natural killer (NK). O dano hepático causado pela destruição dos hepatócitos por células da imunidade inata/adquirida estimulam as CDs mielóides. CDs mielóides secretam principalmente IL-12 e TNF- α direcionando a diferenciação dos linfócitos TCD4⁺ para o fenótipo Th1 e promovendo a ativação de NKs e sua secreção de IFN- γ . IFN- γ ativa macrófagos hepáticos, aumentando a inflamação local (LIU, 2001; HIROISHI et al., 2008).

Como mencionado, NKs participam ativamente da resposta frente à infecção viral. Elas são necessárias para uma ação citolítica efetiva por parte dos linfócitos T citotóxicos, através da liberação de IFN- γ , além de induzir a apoptose de hepatócitos infectados (ocasionando a hepatite) e ativar células dendríticas (KAKIMI et al., 2000; LIU et al., 2000). Embora sejam abundantes no tecido hepático de indivíduos acometidos por hepatite C aguda, estudos demonstram uma diminuição da frequência de NKs no sangue periférico (MEIER et al., 2005; MORISHIMA et al., 2006) e fígado de pacientes com hepatite C crônica (DEIGNAN et al., 2002), talvez parcialmente associada a uma inibição funcional das NKs, observada *in vitro*, após a ligação da proteína viral E2 à molécula CD81 na NK (TSENG e KLIMPEL, 2002). Assim, uma resposta ineficiente das células NK poderia ocasionar a persistência viral (CORADO et al., 1997). Polimorfismos em genes codificadores de receptores das NKs (KIR) têm sido observados em pacientes infectados que manifestaram diferentes cursos da doença (KHAKOO et al., 2004; IVIC et al., 2007; PALADINO et al., 2007; MARANGON et al., 2011).

A conexão entre a imunidade inata e adaptativa é realizada pelas CDs. Observa-se que tanto a imunidade humoral quanto a celular participam da resposta imunológica, sendo esta última a que exerce maior participação. CDs apresentam epítomos virais, através de suas moléculas HLA classe II aos linfócitos T CD4⁺. Linfócitos T CD8⁺ reconhecem epítomos apresentados por moléculas HLA classe I na superfície de células infectadas (ACCAPEZZATO et al., 2005; BARTH et al., 2005). Através da secreção de citotoxinas, elimina células alvo infectadas, e por meio da secreção de citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , inibe a replicação viral sem morte celular (GUIDOTTI e CHISARI, 2001). Respostas de linfócitos T têm sido amplamente estudadas e são críticas para uma resposta imunológica efetiva. Estudos envolvendo infecções por HCV em humanos sugerem que respostas vigorosas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ favorecem a eliminação viral espontânea (REHERMANN et al., 1996), entretanto, ainda permanece não completamente definido o mecanismo através do qual isso ocorre.

A participação da imunidade humoral é, entretanto, menos preponderante. Anticorpos específicos são normalmente detectados de sete e oito semanas após a infecção por HCV, entretanto, a ação dos mesmos é muito questionável, uma vez que não previnem reinfeção (LAI et al., 1994) e não estão associados à resolução da infecção (CHEN et al., 1999). Kaplan *et al.* (KAPLAN et al., 2003) não identificaram respostas humorais específicas

em pacientes expostos ao HCV. Um estudo realizado com um grupo de mulheres acidentalmente expostas ao HCV revelou a presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ HCV-específicos circulantes, mesmo duas décadas após a infecção, enquanto anticorpos HCV-específicos permaneceram indetectáveis após o mesmo período (TAKAKI et al., 2000).

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 (VALIANTE et al., 2000), condizendo com a estimativa de que em 50 a 80% dos infectados progridam para a cronicidade (BLACKARD et al., 2008).

O HCV desenvolveu mecanismos sofisticados de evasão do sistema imunológico do hospedeiro. Após a infecção, o HCV produz proteínas estruturais ou não estruturais que suprimem a resposta imunológica inata. Através de suas proteínas não estruturais NS3-4A, o HCV bloqueia os TLR3 e os RIG-I das células infectadas, impedindo a ligação das moléculas de RNA e conseqüente produção e secreção de interferons. A proteína do nucleocapsídeo inibe a ativação da STAT1, além de promover a degradação deste transdutor de sinal. As proteínas E2 e NS5 inibem a atividade da proteína quinase R (PKR) (GALE e FOY, 2005; BODE et al., 2007; TAI e CHUNG, 2009).

Diversas observações têm sido feitas quanto ao mecanismo de escape frente à imunidade adaptativa. Em indivíduos acometidos por hepatite crônica, observam-se CDs imaturas (AUFFERMANN-GRETZINGER et al., 2001) e com capacidade estimulatória reduzida (KANTO et al., 1999). A proteína do nucleocapsídeo inibe a proliferação de linfócitos T *in vitro* (KITTLESEN et al., 2000) que, conseqüentemente, têm sua produção e secreção de IFN- γ comprometida. São observadas taxas de replicação viral que excedem a capacidade do sistema de defesa (FULLER et al., 2005), além de falhas na manutenção de níveis iniciais suficientes de linfócitos T CD4⁺ para o direcionamento adequado da resposta (GERLACH et al., 1999).

Outro importante mecanismo de escape viral consiste na intensa taxa de mutações em seu genoma. O HCV replica a uma taxa de 10¹⁰ a 10¹² novos vírus ao dia durante o período de infecção crônica (NEUMANN et al., 1998), o que somado à baixa fidelidade da RNA polimerase viral e ausência de mecanismos de reparo, resulta em freqüentes substituições de bases no genoma viral. Isso permite o surgimento de novas cepas, capazes inclusive de se evadir do sistema imunológico (BUKH et al., 1995). Mutações em epítomos apresentados por moléculas HLA classe I comprometem o processamento via proteossoma (SEIFERT et al., 2004), além de reduzir a afinidade pelas próprias moléculas HLA, o que, conseqüentemente, compromete o reconhecimento pelos linfócitos T CD8⁺ (TESTER et al., 2005).

Fatores como genótipo viral, idade e sexo do hospedeiro, obesidade, alcoolismo, assim como co-infecções, podem influenciar o curso da hepatite C, porém não explicam por

si mesmos a variabilidade das respostas à infecção desenvolvidas por diferentes indivíduos (SEEFF, 2002). Como observado, a resposta imunológica do hospedeiro envolve uma complexa interação entre o sistema imune inato e adaptativo que determinam os resultados da infecção por organismos patogênicos. Nesse contexto, a diversidade dos genes envolvidos na resposta imune pode explicar, em parte, a variabilidade da resposta às infecções (MARTIN e CARRINGTON, 2005).

Muitos estudos recentes têm investigado polimorfismos do gene HLA de classe II em relação à infecção pelo HCV, uma vez que a natureza e magnitude da resposta imunológica podem ser influenciadas pelo genótipo HLA. Da mesma forma, como os linfócitos T citotóxicos exercem papel crucial no controle da replicação viral e podem ser diretamente responsáveis pela lesão histológica na infecção crônica, também têm sido realizados estudos que investigam polimorfismos dos genes HLA de classe I em relação à infecção pelo HCV, resposta ao tratamento e grau de dano hepático (ROMERO-GOMEZ et al., 2011; MARANGON et al., 2012).

Linfócitos T, células *natural killer* e outras células da resposta imune secretam citocinas, contribuindo de forma eficaz para as diferenças entre subtipos de células T. Assim, a regulação da resposta humoral e celular pode ser explicada em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células Th1 e Th2 no decorrer de uma resposta imune. Dessa forma, as citocinas secretadas em resposta à lesão celular tem papel crucial na patogênese da fibrose hepática (DUSTIN e RICE, 2007).

A fibrose hepática é resultado de injúrias repetitivas causadas aos hepatócitos devido à infecção pelo HCV e à ação da resposta imunológica. Em casos de injúrias hepáticas agudas, o tecido necrótico é removido e substituído por novos hepatócitos, processo associado à resposta pró inflamatória e deposição limitada de matriz extracelular. Caso a injúria persista, o processo regenerativo falha e ocorre deposição de uma quantidade abundante de matriz extracelular, constituindo a fibrose. Esse processo é denominado fibrogênese, ao contrário da degradação da matriz extracelular, denominada fibrólise. A reincidência das injúrias induz diferentes graus de fibrose, que são classificadas em iniciais, F0, F1 e F2 e avançados, F3 e F4 (BATALLER e BRENNER, 2005).

TGF- β 1 exerce um papel chave dentre as citocinas no processo de fibrogênese, pois estimula a síntese de matriz extracelular e inibe a fibrólise, além de induzir a infiltração de neutrófilos no tecido hepático e promover a apoptose através de um estímulo mitocondrial. TNF- α também tem sido observado participando, porém menos intensamente, do processo de fibrogênese e seus níveis intra-hepáticos estão aumentados em indivíduos acometidos por hepatite C crônica (LIMA-CABELLO et al., 2011). Em contrapartida, IFN- α , IFN- γ e IL-10 têm sido observados desempenhando um efeito antifibrótico em casos de hepatite causadas por HCV (BATALLER e BRENNER, 2005). Há indícios de que os níveis

de RNAm para IL-8, IL-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-15 e TNF- α aumentam com o estágio de fibrose hepática (MAHMOOD et al., 2002).

Além da participação das citocinas no processo de fibrogênese, elas também atuam em outros âmbitos da resposta ao HCV. Níveis elevados de IL-6, tanto plasmáticos como intra-hepáticos, têm sido observados em indivíduos acometidos por hepatite C (FELDMANN et al., 2006; LIMA-CABELLO et al., 2011), assim como no sobrenadante de células estimuladas *in vitro* pela proteína do nucleocapsídeo viral, possivelmente via TLR2 (FELDMANN et al., 2006). Grungreiff *et al.* observaram a normalização da concentração sérica de IL-6 após a eliminação viral através do tratamento com interferon (GRUNGREIFF et al., 1999).

Genes de citocinas podem apresentar variações nucleotídicas em sítios específicos, denominadas polimorfismos de único nucleotídeo ou SNPs do inglês “single nucleotide polymorphisms”, que resultam em diferentes alelos para cada *locus* polimórfico. SNPs localizados em regiões reguladoras têm sido demonstrados como influenciando a expressão e secreção de citocinas, resultando em diferentes fenótipos de produção que podem ser classificados como alto, intermediários ou baixos produtores. A produção inapropriada dos níveis de citocinas parece contribuir para a persistência viral, fibrogênese hepática e até afetar a resposta à terapia na infecção pelo HCV (ROMERO-GOMEZ et al., 2011).

Neste sentido, alguns autores têm verificado a presença ou ausência de associações entre polimorfismos em genes de citocinas e dano hepático, bem como com a resposta ao tratamento (ROMERO-GOMEZ et al., 2011). Dai *et al.* (DAI et al., 2006) estudando indivíduos chineses acometidos por hepatite C crônica (diversos genótipos virais) observaram associação entre o alelo *TNFA*-308/A e estágios severos de fibrose hepática. Já Falletti *et al.* (FALLETI et al., 2010), estudando pacientes italianos, observaram associação entre o alelo *IL6*-174/G e a intensidade do dano hepático. Yee *et al.* ao estudar uma população inglesa, observaram os alelos *IL10*-592/A e -819/T, assim como os genótipos -819/T:T e -592/A:A e o haplótipo ATA (-1082; -819; -592) associados a SVR (YEE et al., 2000).

Em 2009, foram publicados três amplos estudos demonstrando que alguns SNPs próximos ao gene *IL28B*, que codifica o IFN- γ 3, estão fortemente associados à resolução espontânea da infecção pelo HCV e à RVS pós-tratamento com peginterferon- α e ribavirina (GE et al., 2009; SUPPIAH et al., 2009; TANAKA et al., 2009). Dentre eles, o SNP rs12979860 foi observado como o melhor na predição da resposta ao tratamento; o genótipo C:C está associado a maiores taxas de RVS em indivíduos infectados pelos genótipos 1 ou 4 do HCV, bem como à resolução espontânea da infecção pelo HCV. O SNP rs12979860 parece não interferir na expressão intra-hepática do gene *IL28B*, mas provavelmente interfere na expressão intra-hepática dos genes estimulados por interferon (ISGs) ou

modifica a interação protéica com outras moléculas na via do IFN- α (MACIAS et al., 2011). A determinação do genótipo dos pacientes portadores de hepatite C crônica permitirá a personalização do tratamento no contexto da escolha das drogas.

1.7. CITOCINAS: papel biológico, genes e polimorfismos genéticos

Citocinas são proteínas solúveis produzidas e secretadas por células do sistema imunológico, assim como outras células do organismo humano, em resposta a estímulos diferenciados. Agem mediante ligação a receptores específicos presentes na superfície de células alvo, que podem estar localizados na própria célula secretora (atuação autócrina), em uma célula próxima à secretora (atuação parácrina) ou em células alvo distantes da secretora, alcançadas via corrente sanguínea (atuação endócrina) (MIYAJIMA et al., 1992; KISHIMOTO et al., 1994).

De acordo com sua estrutura, as citocinas são agrupadas em famílias (hematopoiéticas, interferons e TNF) e de acordo com sua similaridade funcional e genética são redistribuídas em subfamílias. Seus receptores também seguem uma classificação similar (JANEWAY et al., 2001).

A ação das citocinas inicia-se pela ligação a seu receptor específico de membrana, desencadeando uma via de transdução de sinais que culmina com uma alteração da expressão gênica da célula alvo, influenciando seu crescimento, motilidade, diferenciação, função, secreção de outras citocinas, entre outros. De forma simplificada, as citocinas agem em uma rede complexa, na qual a produção de uma citocina influencia a síntese e ação de outras através de estímulos regulatórios promotores ou inibitórios. Assim, através de ações pleiotrópicas, redundantes, sinérgicas ou antagônicas elas participam de um sistema de indução em cascata (JANEWAY et al., 2001).

Atuando como agentes imunomodulatórios, as citocinas apresentam efeitos pró-inflamatórios (quando secretadas por linfócitos T CD4⁺ helper 1) ou anti-inflamatórios (quando secretadas por linfócitos T CD4⁺ helper 2) (HAUSER, 1995). De acordo com perfis de estímulos ainda não totalmente elucidados, linfócitos T CD4⁺ *naive* podem se diferenciar nos subtipos. A produção seletiva do primeiro grupo (Th1) induz, predominantemente, uma resposta imunológica mediada por células, particularmente apropriada para destruir células infectadas por patógenos intracelulares. Também é responsável pela hipersensibilidade tardia e ativação das células T citotóxicas, e ainda pela produção de anticorpos opsonizantes (STITES et al., 2000). Quando ativadas por antígenos/células apresentadoras de antígenos (APC), as células Th1 produzem interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN-g) e linfotóxina (LT) (MOSMANN et al., 1986; CHERWINSKI et al., 1987; COFFMAN et al., 1988). A produção seletiva do segundo grupo (Th2), induz uma resposta imunológica

humoral preponderante, promovendo a produção de quantidades relativamente elevadas de anticorpos IgM, IgE, e isótipos IgG não ativadores do complemento; também estimulam a ativação e diferenciação de eosinófilos e atuam nas reações alérgicas (STITES et al., 2000). Células Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 (CHERWINSKI et al., 1987; BROWN et al., 1989).

1.7.1. INTERLEUCINA-1 α (IL-1 α) E O GENE *IL1A*

A interleucina IL-1 α pertence à família de citocinas IL-1, juntamente com IL-1 β , o antagonista do receptor IL-1Ra, IL-18, IL-36Ra, IL-36 α , IL-37, IL-36 β , IL-36 γ , IL-38, IL-33 e os receptores para IL-1, IL-1R1 e IL-1R2 e mais sete co-receptores, proteínas de ligação e receptores inibitórios. A maioria dos genes codificadores dos membros da família de citocinas IL-1 está localizada no cromossomo 2, divididos em dois *clusters*: a) *IL1A*, *IL1B*, *IL1RN*, *IL-36RA*, *IL-36A*, *IL-37*, *IL-36B*, *IL-36G*, *IL-38* e b) *IL-1R1* e *IL-1R2* e mais sete co-receptores, proteínas de ligação e receptores inibitórios (SMITH e HUMPHRIES, 2009; DINARELLO, 2011).

O gene *IL1A* (3552) localiza-se na região 2q14, possui uma extensão de 10,5kb e é composto por sete éxons e seis íntrons. Seu RNAm possui 2943pb e origina um precursor de 33kDa, formado por 271 aminoácidos e sem peptídeo sinal, denominado pré-interleucina-1 α , que posteriormente é clivado por calpaína, resultando na interleucina-1 α de 17kDa e 159 aminoácidos (DINARELLO, 1991; WATANABE e KOBAYASHI, 1994).

O gene *IL1A* apresenta uma homologia de aproximadamente 45% com *IL1B*. O principal local ausente de homologia está dentro da região promotora, indicando que os altos níveis plasmáticos de IL-1 β quando comparado aos níveis de IL-1 α poderia ser devido a diferenças transcricionais (SMITH e HUMPHRIES, 2009). Dentre os polimorfismos em *IL1A*, foi descrito um na posição -889C>T (rs1800587) (TSENG e KLIMPEL, 2002). Um estudo em população italiana demonstrou que o alelo -889/T aumenta a taxa de transcrição do gene e conseqüentemente aumenta os níveis plasmáticos da IL-1 α (DOMINICI et al., 2002) e também da IL-1 β (KILPINEN et al., 2001), pois há evidências de um desequilíbrio de ligação entre os SNPs de *IL1A* e *IL1B* (GORE et al., 1998). O genótipo -889/T:T seria responsável por níveis de mRNA ligeiramente mais elevados em comparação com o genótipo CC ou CT (DOMINICI et al., 2002). Entretanto, recentemente outro estudo realizado em população japonesa, demonstrou que não existem diferenças estatisticamente significativas quanto à expressão gênica possivelmente induzida por este SNP. Parece que -889C>T seria apenas um marcador para o SNP +4845G>T (rs17561), pois estão em forte desequilíbrio de ligação, e indivíduos portadores do alelo +4845/T são mais eficientes no processamento da pré interleucina-1 α (KAWAGUCHI et al., 2007) (Tabelas 1 e 2).

A maior parte da IL-1 plasmática é IL-1 β , de modo que a IL-1 α é normalmente encontrada em baixíssimas concentrações na corrente sanguínea. A atividade biológica destas duas citocinas é indistinguível (DINARELLO, 1997). A IL-1 é secretada por monócitos, macrófagos ativados de diversos tecidos, queratinócitos, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, fibras musculares lisas, células de Langerhans, osteoclastos, linfócitos T e B e células *natural killer*. Apesar de ser uma citocina pró-inflamatória, seus efeitos não são limitados à inflamação, pois também atuam como imunoadjuvantes, são indutoras da febre, participam do processo de formação e remodelação óssea, dentre outras funções (DINARELLO, 1997; , 2011).

1.7.2. INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β) E O GENE *IL1B*

O gene *IL1B* (3553) localiza-se na região 2q14, possui uma extensão de 7,8kb e é composto por sete éxons e seis íntrons. Seu RNAm possui 1498pb e origina um precursor de 31kDa, formado por 269 aminoácidos e sem peptídeo sinal, denominado pré-interleucina-1 β , que posteriormente é clivado pela caspase-1, resultando na interleucina-1 β de 17kDa e 153 aminoácidos (MARCH et al., 1985; DINARELLO, 1991).

No gene *IL1B* existem ao menos três polimorfismos, um na posição -511C>T (rs16944), outro na posição -31T>C (rs1143627) e outro na posição +3962C>T (rs1143634) (WILSON et al., 1993; TSENG e KLIMPEL, 2002). A nomenclatura dos polimorfismos pode diferir amplamente entre os autores; é o caso do SNP *IL1B*+3962, também denominado +3953 (CONSTANTINI et al., 2002) ou +3954 (KSIAA CHEIKHROUHOU et al., 2011) por alguns autores, mas em todos os casos o *dbSNP number* dos mesmos é rs1143634 (SMITH e HUMPHRIES, 2009).

Os SNPs -511C>T e -31T>C apresentam forte desequilíbrio de ligação e estudos de associação envolvendo ambos tendem a apresentar resultados similares (SMITH e HUMPHRIES, 2009). A funcionalidade de ambos sempre foi um assunto controverso, mas um estudo de expressão gênica confirmou que o SNP -31T>C, ou outro em forte desequilíbrio de ligação com o mesmo (por exemplo -511C>T), é o mais funcional (DIXON et al., 2007). O alelo -31/T parece induzir uma maior expressão do gene IL-1 β em populações americanas, porém mais estudos são necessários (EL-OMAR et al., 2000). Existe pouca evidência de funcionalidade para o SNP +3962C>T e possivelmente o mesmo atue como marcador para um SNP funcional, como o -31T>C (SMITH e HUMPHRIES, 2009). Entretanto, foi evidenciado em algumas populações que indivíduos homozigotos para o alelo T produzem quatro vezes mais IL-1 β que indivíduos portadores de outros genótipos (HALL et al., 2000; BERGHOLDT et al., 2004) (Tabelas 1 e 2).

Como já mencionado, a atividade biológica das citocinas IL-1 α e IL-1 β é indistinguível (DINARELLO, 1997).

1.7.3. ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-1 (IL-1Ra) E O GENE *IL1RN*

O gene *IL1RN* (3557) localiza-se na região 2q14.2 e é composto por quatro éxons, embora já tenham sido identificadas variantes com cinco ou seis éxons (STEINKASSERER et al., 1992). Existem três variantes estruturais de IL-1Ra produzidas a partir deste gene: a) sIL-1Ra, uma molécula secretada, traduzida com peptídeo sinal e subseqüentemente processada, originando um peptídeo de 17kDa, glicosilada e secretada com 22kDa por monócitos, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos; b) icIL-1RaI, uma molécula intracelular de 18kDa, traduzida sem peptídeo sinal, não glicosilada e produzida por queratinócitos e outras células epiteliais, macrófagos e fibroblastos; c) icIL-1RaII, uma molécula intracelular de 16kDa, produzida por queratinócitos, neutrófilos, monócitos dentre outras (AREND, 1993; MALYAK et al., 1998). A sIL-1Ra liga-se ao receptor IL-1R1 ou IL-1R2, mas não induz uma transdução de sinal, e competitivamente inibe a ligação da IL-1 α e da IL-1 β . É necessário cerca de cem vezes mais sIL-1Ra que IL-1 α ou IL-1 β para inibir a resposta biológica (AREND, 1993).

Níveis elevados de IL-1Ra estão associados a marcadores de inflamação aguda, como fibrinogênio e proteína C-reativa (CRP) (MCDERMOTT et al., 2005). O fato da IL-1Ra inibir a transcrição do fator NF-kB12 dá suporte ao seu papel no controle da produção de uma série de marcadores inflamatórios e mediadores, incluindo a CRP, IL-6, TNF- α e IL-1 β (CAI et al., 2005).

Dentre os polimorfismos encontrados no gene *IL1RN* existe o mspa1 11100C>T (rs315952) que origina uma mutação sinônima (TSENG e KLIMPEL, 2002). Parece não existir relação entre as variantes polimórficas deste SNP e nível de IL-1Ra, entretanto, haplótipos de SNPs para o gene *IL1RN* apresentaram relação com o nível de IL-1Ra (RAFIQ et al., 2007) (Tabelas 1 e 2).

1.7.4. RECEPTOR TIPO I DA INTERLEUCINA-1 (IL-1R1) E O GENE *IL1R1*

O gene *IL1R1* (3554) localiza-se na região 2q12, apresenta 25933pb e 74kb. Possui 14 éxons, sendo, portanto um gene longo e complexo, além de três promotores distintos, o que gera três transcritos que diferem entre si por suas regiões 5'UTR (*untranslated region*) derivadas dos éxons 1A, 1B e 1C (YE et al., 1996). A glicoproteína transmembrana originada possui 80kDa e 552 aminoácidos, sendo que 213 destes pertencem ao domínio

intracitoplasmático (SIMS et al., 1989). A sinalização gerada após a ligação do ligante não é gerada pela molécula IL-1R1, mas por uma proteína acessória denominada IL-1RAcP que interage com o receptor (HUANG et al., 1997).

Em *IL1R1*, dentre outros, há o polimorfismo *pst1 1970C>T* (rs2234650) (BERGHOLDT et al., 2004). Há indícios que este SNP não afeta nenhuma seqüência de reconhecimento de fatores transcricionais conhecida ou a estrutura secundária do RNAm, permanecendo incerta a existência de funcionalidade (BERGHOLDT et al., 2004) (Tabelas 1 e 2).

O receptor tipo I da IL-1 é expresso por diversos tipos celulares, incluindo linfócitos T, astrócitos, condrócitos, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, neurônios, células beta pancreáticas e fibras musculares lisas e atua como receptor para IL-1 α , IL-1 β e IL1-Ra (DINARELLO, 1991; YE et al., 1996).

1.7.5. INTERLEUCINA-2 (IL-2) E O GENE *IL2*

O gene *IL2* (3558) está localizado no cromossomo 4, na região q26-q27. Contém quatro éxons separados por três íntrons, ocupando uma extensão total de aproximadamente 5kb (FUJITA et al., 1983). Seu RNA mensageiro maduro apresenta 1033pb e depois de traduzido, origina um polipeptídeo precursor de 153 aminoácidos, cujo peptídeo sinal é posteriormente removido, resultando na secreção de uma proteína madura globular com 133 resíduos de aminoácidos e massa molecular de 15,5kDa (JU et al., 1987).

Vários polimorfismos podem ser evidenciados no gene *IL2*, dentre os quais se destaca o *IL2-330T>G* (rs2069762) (JOHN et al., 1998). Parece não estar bem esclarecida a relação entre este polimorfismo e produção de IL-2. Estudos em população inglesa e americana demonstram que o genótipo GG seria responsável por uma produção aumentada de IL-2 quando comparados aos genótipos GT ou TT (JOHN et al., 1998; HOFFMANN et al., 2001). Entretanto, também foi observado em outro estudo em uma população espanhola, que o alelo G estaria relacionado à baixa expressão de *IL2* (MATESANZ et al., 2004), sugerindo a existência de outros polimorfismos que afetariam a regulação gênica. Todavia, parece ainda não ter sido verificado se o verdadeiro responsável pela alteração na expressão gênica é realmente este SNP ou outro em forte desequilíbrio de ligação com o mesmo (SMITH e HUMPHRIES, 2009) (Tabelas 1 e 2).

Outro polimorfismo presente no gene *IL2* é o *IL2+166G>T* (rs2069763), responsável por uma mudança que ocorre dentro do peptídeo sinal e, portanto não afeta seqüência de aminoácidos da IL-2 (JOHN et al., 1998) (Tabelas 1 e 2).

A IL-2 é uma citocina que participa no controle da proliferação e diferenciação de células do sistema imunológico. É produzida principalmente por linfócitos T CD4⁺ ativados e

induz o crescimento de linfócitos T *in vitro*, enquanto seu papel *in vivo* é controverso. A IL-2 também é produzida por linfócitos T CD8⁺, células dendríticas e linfócitos T regulatórios. É sintetizada após estimulação celular por antígenos, IL-1, aloantígenos ou mitógenos. A expressão do receptor de IL-2 em linfócitos T é estritamente dependente da ativação do receptor de linfócito T (TCR). A IL-2 afeta o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos e supressores, estimula a diferenciação e aumenta a atividade de células natural killer, e promove o crescimento e diferenciação de linfócitos B. Talvez o principal papel da IL-2 esteja relacionado a auto tolerância, uma vez que promove a homeostase e funcionamento de linfócitos T regulatórios (OLEJNICZAK e KASPRZAK, 2008).

1.7.6. INTERLEUCINA-4 (IL-4) E O GENE *IL4*

O gene *IL4* (3565) está localizado no cromossomo 5, em q31.1. Possui quatro éxons e três íntrons, abrangendo aproximadamente 10kb. *IL4* codifica um RNAm de 921 pb, que por sua vez traduz uma proteína de 153 aminoácidos, sendo que os primeiros 24 correspondem ao peptídeo sinal. A glicoproteína secretada possui 129 aminoácidos e peso molecular entre 15 e 19kDa. Há registros da ocorrência de um RNAm adicional que não possui 48pb que codifica os resíduos de aminoácidos de 22 a 37, originado através do *splicing* alternativo do éxon 2. Este RNAm origina a IL-4 delta 2, cuja expressão é tecido específica (CHOMARAT e BANCHEREAU, 1997).

Algumas variações polimórficas são observadas no gene *IL4*, incluindo -1098T>G (rs2243248), -590C>T (rs2243250) e -33C>T (rs2070874) (KABESCH et al., 2003). Há evidências em população americana e austríaca de que o alelo -590/T (ROSENWASSER e BORISH, 1997) bem como os haplótipos -590; -33/TT e -590; -33/TC estão associados a altos níveis de IL-4, enquanto os haplótipos -590; -33/CC e -590; -33/CT estão associados a baixos níveis de IL-4 (KLEINRATH et al., 2007), sugerindo que o SNP -590C>T seja o mais funcional. O SNP -1098T>G está em desequilíbrio de ligação com -590C>T e a funcionalidade do mesmo parece ainda não estar esclarecida (BRENNER et al., 2007) (Tabelas 1 e 2).

A IL-4 é produzida predominantemente por linfócitos Th2. Ela promove a proliferação e diferenciação de linfócitos B, a expressão de moléculas HLA classe II em linfócitos B com conseqüente apresentação antigênica para linfócitos T, regulando assim a expressão das classes de imunoglobulinas. Além disso, estimula a proliferação de timócitos e linfócitos T (PAUL, 1991).

1.7.7. CADEIA ALFA DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA-4 (IL-4Ra) E O GENE *IL4RA*

O gene *IL4RA* (3566) localiza-se no cromossomo 16, em p12.1–p11.2 e abrange aproximadamente 3,6kb. Origina um precursor de 825 aminoácidos, que após processado, resulta em uma proteína madura de 800 aminoácidos e peso molecular entre 140kDa (CHOMARAT e BANCHEREAU, 1997).

Dentre os polimorfismos descritos para este gene está o -1902G>A (rs1801275) (CAGGANA et al., 1999), que resulta na mudança de glutamina para arginina na posição 576 do peptídeo (muitas vezes referido como posição 551 se o peptídeo sinal não for incluído na contagem). Apesar de um estudo recente em população holandesa envolvendo esclerose sistêmica mostrar que este polimorfismo não influencia a expressão gênica (BROEN et al., 2012), outros estudos demonstraram que devido a sua localização no domínio intracelular do peptídeo, essa alteração interfere na sinalização intracelular (MITSUYASU et al., 1998; NELMS et al., 1999), sendo o alelo *IL4RA*+1902/G associado a um aumento na sinalização do receptor (HERSHEY et al., 1997) e conseqüente aumento da expressão dos genes regulados por IL-4 e IL-13, uma vez que apresenta estas citocinas como ligantes (KELLY-WELCH et al., 2003) (Tabelas 1 e 2).

O receptor da IL-4 (IL-4RA) é formado por duas subunidades, a α que se liga com alta afinidade ao ligante e a γ T, comum a outros receptores de citocinas, que amplifica o sinal da subunidade α (IZUHARA e SHIRAKAWA, 1999; NELMS et al., 1999). A subunidade α também faz parte do receptor da IL-13, juntamente com a proteína de ligação IL13R α 1 (SMITH e HUMPHRIES, 2009).

1.7.8. INTERLEUCINA-6 (IL-6) E O GENE *IL6*

O gene *IL6* (3569) está localizado no cromossomo 7, em p21. Possui cinco éxons e quatro íntrons distribuídos em uma região de aproximadamente 5kb (YASUKAWA et al., 1987; TANABE et al., 1988). *IL6* codifica um RNA mensageiro de 1,3kb que traduz um polipeptídeo precursor de 212 aminoácidos. Após processamento para remoção do peptídeo sinal, é produzida uma proteína de 186 aminoácidos, que sofre alterações pós transcricionais, originando cinco isoformas de massas moleculares variando entre 21 e 28kDa (MAY et al., 1988).

Algumas variações polimórficas são observadas no gene *IL6*, incluindo os SNPs *IL6*-174G>C (rs1800795) (FISHMAN et al., 1998) e *IL6*nt565 (rs1800797) (TERRY et al., 2000). Existe pouco consenso quanto à relação polimorfismo e produção de IL-6 (ENDLER et al., 2004; HEGEDUS et al., 2007). Kilpinen *et al.* (KILPINEN et al., 2001) estudando a

população da Finlândia, observaram associação entre este polimorfismo e a produção *in vivo* ou *in vitro* de IL-6 apenas em neonatos verdadeiramente “naive”, enquanto nos adultos o contato prévio com antígenos exógenos modificaria sua resposta. Entretanto, um estudo em americanos demonstrou o envolvimento do polimorfismo *IL6-174G>C* na transcrição do gene *IL6*. O alelo -174/G induz a expressão de IL-6 em níveis 60% maiores que os induzidos pelo alelo -174/C. Indivíduos homocigotos para o alelo G ou heterocigotos são caracterizados como alto produtores de IL-6 e apresentam altos níveis plasmáticos desta citocina. Já indivíduos homocigotos para o alelo C são baixos produtores de IL-6 (FISHMAN e BRANCH, 2009). Em dois estudos recentes realizados em população húngara e alemã não foram observadas associações entre o polimorfismo *IL6-174* e níveis de IL-6 (KISZEL et al., 2007; HUTH et al., 2009), indicando que talvez exista outro loci polimórfico que esteja afetando a expressão de IL-6 (SMITH e HUMPHRIES, 2009). Outros autores sugerem que para o gene *IL6* sítios polimórficos distintos não interferem na produção de IL-6 independentemente um do outro, e um polimorfismo influencia o efeito funcional de outros (TERRY et al., 2000). O genótipo nt565/A:A apresenta evidências em população romena de estar associado a alta produção de IL-6, enquanto os genótipos nt565/G:A e G:G parecem estar associados a produção intermediária e baixa, respectivamente (STOICA et al., 2010) (Tabelas 1 e 2).

IL-6 é uma citocina pleiotrópica, produzida por células da resposta imune inata e adaptativa como linfócitos T e B, macrófagos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais, além de algumas células tumorais (MATSUDA e HIRANO, 1990; VAN SNICK, 1990). Não é constitutivamente expressa, mas indutível em resposta a estímulos inflamatórios diversos como IL-1, TNF- α e infecções virais (TERRY et al., 2000). Suas atividades biológicas incluem a participação nas respostas imunológicas, hematopoiese e reações de fase aguda. IL-6 é geralmente considerada uma citocina pró inflamatória, mas estudos como o de XING et al. (XING et al., 1998) evidenciam sua propriedade antiinflamatória. A expressão desregulada de IL-6 tem sido associada a enfermidades como plasmocitoma, mieloma e doenças inflamatórias crônicas proliferativas (NAKA et al., 2002).

1.7.9. INTERLEUCINA-10 (IL-10) E O GENE *IL10*

O gene *IL10* (3586) está localizado no cromossomo 1, em q31-32. Possui cinco éxons separados por quatro íntrons, dispostos ao longo de 4,7kb. Encontra-se situado próximo aos genes *IL-19* e *IL-20* (ESKDALE et al., 1997). O gene *IL10* codifica inicialmente um polipeptídeo de 178 aminoácidos, sendo dezoito destes constituintes do peptídeo sinal. Após processamento, a proteína madura apresenta 160 aminoácidos e um peso molecular

de aproximadamente 18kDa, organizada na forma de um homodímero (VIEIRA et al., 1991; WINDSOR et al., 1993).

Vários polimorfismos têm sido observados no gene *IL10*, incluindo os SNPs -1082G>A (rs1800896), -819C>T (rs1800871) e -592C>A (rs1800872) (ESKDALE et al., 1997; TURNER et al., 1997) localizados na região promotora. Eles parecem estar associados a diferentes níveis de expressão gênica, pois possivelmente alteram sítios específicos de reconhecimento de fatores transcricionais, afetando assim os níveis de produção da citocina (JOHN et al., 1998; POWELL et al., 2000). Em indivíduos americanos e ingleses, os alelos -1082/G, -819/C e -592/C estariam associados à alta produção de IL-10, enquanto seus respectivos alelos estariam relacionados à baixa produção (ROSENWASSER e BORISH, 1997; JOHN et al., 1998). Baixos níveis de IL-10 foram observados em indivíduos brasileiros portadores dos genótipos -592/C:A ou -592/A:A (CLAUDINO et al., 2008) (Tabelas 1 e 2).

IL-10 é expressa por linfócitos T e B, células NK, monócitos, assim como por diversas outras células do sistema imunológico ou não e age em células alvo hematopoiéticas ou de outra natureza. Apresenta importante função regulatória, pois sua expressão afeta as respostas imunológica e inflamatória. Suprime a produção de citocinas pro inflamatórias por monócitos e neutrófilos e age como fator desativador de macrófagos. Estimula a proliferação de linfócitos B e mastócitos e pode estimular ou inibir linfócitos T, dependendo do subgrupo em questão (MOORE et al., 2001).

1.7.10. CADEIA BETA DA INTERLEUCINA-12 (IL-12b) E O GENE *IL12B*

O gene *IL12B* (3593) está localizado no cromossomo 5, na região q31.1-q33.1 ocupando uma extensão de 15,7kb. Origina a subunidade β da interleucina-12 e da interleucina-23, também denominada p40, que possui 40kDa e é composta por 306 aminoácidos (BRUNDA, 1994). p40 forma heterodímeros com p35 (originada pelo gene *IL12A*) para formar a IL-12 e com p19 (originada pelo gene *IL23A*) para formar a IL-23 (TRINCHIERI et al., 2003).

Dentre os polimorfismos presentes no gene *IL12B* está o -1188C>A (rs3212227) (HALL et al., 2000). Embora este polimorfismo esteja localizado na região 3'UTR e não altere a seqüência de aminoácidos da proteína originada, é útil como marcador genético para o gene em questão, cujo produto é um dos maiores reguladores da direção da resposta imunológica (Th1/Th2) em humanos (GATELY et al., 1998). Em algumas populações, incluindo a americana, indivíduos -1188/A:A são considerados baixo produtores de IL-12, enquanto heterozigotos são produtores intermediários e indivíduos -1188/C:C são alto produtores de IL-12 (SEEGERS et al., 2002; BERGHOLDT et al., 2004) (Tabelas 1 e 2).

1.7.11. FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α) E O GENE *TNFA*

O gene *TNFA* (7124) está localizado no cromossomo 6 humano, em p21.3. Possui quatro éxons e três íntrons dispostos em um segmento de 3,6kb. Encontra-se na região classe III do MHC, 210kb a montante do locus HLA-B, além de ser flanqueado pelos genes LTB e LTA, codificadores da linfotóxina- β e linfotóxina- α , respectivamente (NEDWIN et al., 1985; RINK e KIRCHNER, 1996). O RNA mensageiro codifica inicialmente um polipeptídeo de 26kDa com 233 aminoácidos, sendo que os primeiros 76 aminoácidos correspondem a um peptídeo sinal envolvido na secreção da proteína. Este peptídeo é clivado por enzimas específicas após ser ancorado na membrana celular, resultando em uma proteína madura de 157 aminoácidos, com 17kDa, que pode então ser secretada. Em condições biológicas, TNF- α apresenta-se como um homotrímero, de peso molecular aproximado de 50kDa, (PENNICA et al., 1984; AGGARWAL et al., 1985; NEDWIN et al., 1985).

Dentre os SNPs observados no gene *TNFA* existem o -238G>A (rs361525) e o -308G>A (rs1800629) (KIM et al., 2003; LU et al., 2005). Alguns estudos demonstram o alelo -238/A associado à baixa secreção de TNF- α , enquanto outros não verificaram relação entre este polimorfismo e o nível de citocina secretado (SMITH e HUMPHRIES, 2009). Já o alelo *TNFA*-308/A tem sido demonstrado em indivíduos australianos e do Reino Unido, aumentando cerca de duas vezes a expressão do gene *TNFA* e, conseqüentemente, os níveis plasmáticos da citocina TNF- α , possivelmente por originar um sítio de ligação diferente para proteínas nucleares (KROEGER et al., 1997; WILSON et al., 1997). O número de alelos -308/A que um indivíduo possui também influencia os níveis plasmáticos de TNF- α , estando os genótipos -308/A:A e -308/G:A associados à alta produção da citocina e o genótipo -308/G:G associado à baixa produção da mesma, em indivíduos americanos e do Reino Unido (WILSON et al., 1997; PERREY et al., 1998; TAMBUR et al., 2001) (Tabelas 1 e 2).

TNF é uma citocina pró inflamatória, com efeitos quimiotáticos para neutrófilos e monócitos. As principais células produtoras de TNF são os monócitos e os macrófagos ativados, mas também pode ser sintetizado por mastócitos, basófilos, eosinófilos, células NK, linfócitos T e B. Há indícios de que exerça proteção contra infecções bacterianas, fúngicas, parasíticas e virais ou outros estímulos (MCDERMOTT, 2001). A deleção do gene *TNF* em camundongos não interfere no desenvolvimento destes animais, exceto pelo comprometimento da arquitetura do baço (MARINO et al., 1997). Talvez esse fato esteja relacionado com a participação do TNF na organização e organogênese de tecidos linfóides secundários, tais como o baço e placas de Peyer (GUO et al., 1999).

1.7.12.FATOR TRANSFORMANTE DE CRESCIMENTO- β 1 (TGF- β 1) E O GENE *TGFB1*

TGF- β 1, juntamente com outras 40 proteínas, faz parte da superfamília TNF- β . Em humanos são expressas três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, codificadas por genes únicos localizados em diferentes cromossomos (KINGSLEY, 1994). O gene *TGFB1* (7040) está localizado no cromossomo 19 humano, na região q13.1. Possui sete éxons distribuídos em uma extensão de 100kb (ROBERTS e SPORN, 1992). TGF- β 1 é inicialmente traduzido como um polipeptídeo de 390 resíduos de aminoácidos, que apresenta uma seqüência sinal, e é processada por uma endoprotease que a converte na forma biologicamente ativa, de 112 aminoácidos (BLANCHETTE et al., 1997).

Dentre os SNPs identificados no gene *TGFB1* encontram-se dois localizados no primeiro éxon, +869T>C (rs1800470), +915G>C (rs1800471) (CAMBIEN et al., 1996). Estes polimorfismos resultam na mudança do aminoácido leucina para prolina e do aminoácido arginina para prolina, nos respectivos produtos protéicos. A combinação genotípica das posições +869T>C e +915G>C permite classificar os indivíduos em baixo (CG/CC, CC/CC, TC/TC, TC/CC), médio (TG/CC, CG/CG, TG/TC) ou alto (TG/TG, TG/CG) produtores de TGF- β 1, conforme estudo realizado em indivíduos do Reino Unido (PERREY et al., 1998) (Tabelas 1 e 2).

TGF- β 1 é produzida e secretada por diversas células, como plaquetas, macrófagos, fibroblastos, linfócitos T e B, em resposta a estresse, injúria e ação viral, além de participar da resposta imunológica durante a carcinogênese (MASSAGUE, 1990; ROBERTS e SPORN, 1992). TGF- β 1 também estimula a resposta inflamatória localizada através do aumento da capacidade de adesão leucocitária ao endotélio vascular e à matriz extracelular (WAHL, 1992), assim como através da quimiotaxia de neutrófilos, monócitos, linfócitos e mastócitos e indução destas células a secretar citocinas inflamatórias, como IL-1, TNF e IL-6. Dentre os tecidos e órgãos do corpo é expressa em níveis mais elevados por células da medula óssea e do baço, além de apresentar níveis plasmáticos consideráveis (5ng/ml), indicando sua possível ação endócrina (REIBMAN et al., 1991).

1.7.13.INTERFERON- γ (IFN- γ) E O GENE *IFNG*

O gene *IFNG* (3458) está localizado no cromossomo 12, em q14. Ocupa uma região de 5961pb e é composto por quatro éxons e três íntrons (GRAY e GOEDDEL, 1982). O RNA mensageiro transcrito pelo gene traduz um polipeptídeo de 166 aminoácidos, que após processamento para remoção do peptídeo sinal, passa a apresentar 143 aminoácidos. A

forma biologicamente ativa do IFN- γ consiste em um homodímero de 34kDa (GRIGGS et al., 1992).

Vários SNPs são encontrados no gene *IFNG*, dentre os quais está o +874A>T (rs2430561), sendo os genótipos T/T, T/A e A/A associados à alta, intermediária e baixa produção de IFN- γ , respectivamente, conforme estudo realizado em indivíduos do Reino Unido (PERREY et al., 1998) (Tabelas 1 e 2).

IFN- γ é produzido e secretado principalmente por linfócitos T e células NK. É constitutivamente expresso em baixas quantidades. Diante de estímulos como trauma, infecções virais, câncer e manifestações auto-imunes, maiores quantidades são produzidas. Alterações no mecanismo de ação do IFN- γ diminuem a resistência contra infecções virais e bacterianas, principalmente quando estas são eliminadas por macrófagos ativados. Apesar de ser considerada uma citocina pró inflamatória, em algumas circunstâncias pode exercer papel antiinflamatório (MUHL e PFEILSCHIFTER, 2003; BILLIAU e MATTHYS, 2009).

Tabela 1. Lista de SNPs.

Gene de citocina	Localização gênica no cromossomo	Número de identificação do SNP	Posição cromossômica do SNP (referência)	Referência	Localização
<i>IL1A</i>	2q14	rs1800587	113259431	(TSENG e KLIMPEL, 2002)	5'-UTR
<i>IL1B</i>	2q14	rs16944	113311338	(DI GIOVINE et al., 1992)	Promoter
		rs1143634	113306861	(TSENG e KLIMPEL, 2002)	Coding/ synonymous
<i>IL1R1</i>	2q12	rs2234650	102124759	(BERGHOLD T et al., 2004)	Distal promoter
<i>IL1RN</i>	2q14.2	rs315952	113606775	(TSENG e KLIMPEL, 2002)	Coding/ synonymous
<i>IL4RA</i>	16p12.1–p11.2	rs1801275	27281901	(CAGGANA et al., 1999)	Coding/ missense
<i>IL12B</i>	5q31.1–33.1	rs3212227	158675528	(HALL et al., 2000)	3'-UTR
<i>IFNG</i>	12q14	rs2430561	66838787	(PERREY et al., 1998)	Intron
<i>TGFB1</i>	19q13.1	rs1800470	46550761	(CAMBIEN et al., 1996)	Coding/ missense
		rs1800471	46550716	(CAMBIEN et al., 1996)	Coding/ missense
<i>TNF</i>	6p21.3	rs1800629	31651010	(LU et al., 2005)	Promoter
		rs361525	31651080	(YEE et al., 2001)	Promoter
<i>IL2</i>	4q26-27	rs2069762	123597430	(JOHN et al., 1998)	Promoter
		rs2069763	123596932	(JOHN et al., 1998)	Coding/ synonymous
<i>IL4</i>	5q31.1	rs2243248	132036543	(KABESCH et al., 2003)	Promoter
		rs2243250	132037053	(KABESCH et al., 2003)	Promoter
		rs2070874	132037609	(KABESCH et al., 2003)	5'-UTR
<i>IL6</i>	7p21	rs1800795	22733170	(FISHMAN et al., 1998)	Promoter
		rs1800797	22732746	(TERRY et al., 2000)	Promoter
<i>IL10</i>	1q31–q32	rs1800896	205013520	(TURNER et al., 1997)	Promoter
		rs1800871	205013257	(TURNER et al., 1997)	Promoter
		rs1800872	205013030	(ESKDALE et al., 1997)	Promoter

Fonte: A autora, baseando-se em dados do Cytokine Genotyping kit (Dynal Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA) e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Tabela 2. Lista de SNPs e funcionalidade.

Gene de citocina	SNP	Número de identificação do SNP	Alelo, genótipo ou haplótipo	Expressão gênica	Referência
<i>IL1A</i>	-889C>T	rs1800587	T:T	Aumentada	(DOMINICI et al., 2002)
<i>IL1B</i>	-511T>C	rs16944	-	Sem efeito	(DIXON et al., 2007)
	+3962C>T	rs1143634	T:T	Aumentada	(HALL et al., 2000) (BERGHOLDT et al., 2004)
<i>IL1R1</i>	pst1 1970C>T	rs2234650	-	Sem efeito	(BERGHOLDT et al., 2004)
<i>IL1RN</i>	mspa1 11100C>T	rs315952	-	Sem efeito	(TSENG e KLIMPEL, 2002)
<i>IL4RA</i>	+1902G>A	rs1801275	G	Aumento na sinalização do receptor	(HERSHEY et al., 1997)
<i>IL12B</i>	-1188A>C	rs3212227	C:C	Produção de IL-12 aumentada	(SEEGERS et al., 2002) (BERGHOLDT et al., 2004)
<i>IFNG</i>	+874T>A	rs2430561	T:T T:A A:A	Aumentada Intermediária Baixa	(PERREY et al., 1998)
<i>TGFB1</i>	codon 10C>T	rs1800470	T:T/G:G T:C/G:G	Aumentada	(PERREY et al., 1998)
	codon 25G>C	rs1800471	T:C/G:C C:C/G:G T:T/G:C	Intermediária	
<i>TNF</i>	-308G>A	rs1800629	A:A G:A	Aumentada	(PERREY et al., 1998)
	-238G>A	rs361525	A	Diminuída	(SMITH e HUMPHRIES, 2009)
<i>IL2</i>	-330T>G	rs2069762	G:G	Aumentada	(JOHN et al., 1998)
	+166G>T	rs2069763	-	Sem efeito	(JOHN et al., 1998)
<i>IL4</i>	-1098T>G	rs2243248	-	Sem efeito	(BRENNER et al., 2007)
	-590C>T	rs2243250	-590; -33/TT -590; -33/TC	Aumentada	(KLEINRATH et al., 2007)
	-33T>C	rs2070874	-590; -33/CC -590; -33/CT	Diminuída	
<i>IL6</i>	-174G>C	rs1800795	G:G G:C	Aumentada	(FISHMAN e BRANCH, 2009)
	nt565G>A	rs1800797	A:A G:A G:G	Aumentada Intermediária Baixa	(STOICA et al., 2010)

<i>IL10</i>	-1082A>G	rs1800896	G	Aumentada	(ROSENWASSER e BORISH, 1997)
	-819C>T	rs1800871	C	Aumentada	(ROSENWASSER e BORISH, 1997)
	-592C>A	rs1800872	C	Aumentada	(ROSENWASSER e BORISH, 1997)

Fonte: A autora.

JUSTIFICATIVA

Suscetibilidade ou resistência a diversas doenças infecciosas envolvem mecanismos complexos, nos quais genes polimórficos da resposta imunológica estão envolvidos (MARTIN e CARRINGTON, 2005). No caso da hepatite C, há indícios de que a genética do hospedeiro pode afetar não apenas a taxa de progressão da doença, como também a resposta ao tratamento e o dano hepático (PAPATHEODORIDIS e PARASKEVIS, 2008).

A infecção crônica pelo HCV tornou-se um problema tanto em nível global como em nível individual, devido, em parte, ao alto custo do tratamento padrão com pegIFN-alfa e ribavirina, aos efeitos colaterais e à baixa taxa de RVS, observada principalmente em pacientes infectados pelo genótipo viral 1 (40–50%). Dentre os pacientes, muitos não serão curados por meio de tratamento, principalmente aqueles de ascendência africana quando comparados aos de ascendência europeia, que possuem probabilidade significativamente maior de serem curados. Além disso, o tratamento é muitas vezes mal tolerado por causa dos efeitos colaterais, que incluem anemia, leucopenia, trombocitopenia e sintomas neuropsiquiátricos, o que impede alguns pacientes de completarem o tratamento. Por estas razões, a identificação dos determinantes genéticos da resposta ao tratamento possui alta prioridade (ASSELAH, 2010). O único SNP cuja genotipagem é aceita até o presente momento como preditora de resposta ao tratamento é o *IL28B* rs12979860; seu genótipo C:C apresenta associação bem estabelecida com maiores taxas (duas vezes maior) de RVS em indivíduos infectados pelos genótipos 1 ou 4 do HCV, bem como à resolução espontânea da infecção pelo HCV (MACIAS et al., 2011). Atualmente, existem testes comerciais disponíveis para a determinação do genótipo, que já começa a ser incorporada na discussão informada sobre o tratamento com os pacientes.

Entretanto, a determinação de outros marcadores poderá oferecer alternativas para predição da resposta ao tratamento. A caracterização de variantes polimórficas em genes de citocinas de uma população com hepatite C crônica tratada com pegIFN-alfa e ribavirina permitirá avaliar quais estão associadas à resposta positiva ou neutra ao tratamento, uma vez que pouco se sabe quanto aos fatores que contribuem para a resposta do paciente frente ao tratamento.

Prever o grau de dano hepático que o paciente desenvolverá também é uma ferramenta eficaz nas mãos do clínico, porém atualmente não existem mecanismos suficientemente eficazes para fazer essa predição. O conhecimento dos marcadores em genes de citocinas associados ao grau de dano hepático apresenta uma significância prognóstica em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, permitindo dirigir a terapia de forma mais agressiva para aqueles com aumento do risco de progressão da doença.

Embora existam estudos que relacionem variantes polimórficas em genes de citocinas e intensidade do dano hepático ou resposta ao tratamento na hepatite C crônica (ROMERO-GOMEZ et al., 2011), alguns trabalhos têm apresentado resultados contraditórios, devido ao mau delineamento do estudo. A maioria dos estudos utiliza amostras heterogêneas quanto ao genótipo do HCV, com ou sem infecção concomitante pelo vírus da hepatite B (HBV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV). Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer o real papel de variantes genéticas no processo de fibrose hepática, bem como na resposta ao tratamento (BATALLER e BRENNER, 2005). Além disto, não foram encontrados estudos com este enfoque realizados na população brasileira, limitando-se apenas a estudos caso-controle que envolve apenas pacientes com hepatite crônica e/ou pacientes com eliminação viral espontânea. Portanto, o presente trabalho apresenta informações inéditas sobre a relação entre variantes polimórficas em genes de citocinas *IL1A*, *IL1B*, *IL1R1*, *IL1RN*, *IL4RA*, *IL12B*, *IFNG*, *TGFB*, *TNFA*, *IL2*, *IL4*, *IL6*, *IL10* e dano hepático/resposta ao tratamento da hepatite C na população brasileira, uma vez que esses genes participam ativamente da resposta imunológica frente ao HCV.

OBJETIVOS

1.8. OBJETIVO GERAL

Investigar a existência de associações entre variantes polimórficas em genes de citocinas e de receptores de citocinas na resposta ao tratamento de pacientes infectados com o HCV, assim como no grau do dano hepático.

1.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os genótipos e estimar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas (quando possível) de variantes polimórficas em genes de citocinas para as posições - 889C>T (rs1800587) do gene *IL1A*, -511T>C (rs16944) e +3962C>T (rs1143634) do gene *IL1B*, pst1 1970C>T (rs2234650) do gene *IL1R1*, mspa1 11100C>T (rs315952) do gene *IL1RN*, +1902G>A (rs1801275) do gene *IL4RA*, -1188A>C (rs3212227) do gene *IL12B*, +874T>A (rs2430561) do gene *IFNG*, códon 10C>T (rs1800470) e códon 25G>C (rs1800471) do gene *TGFB*, -308G>A (rs1800629) e -238G>A (rs361525) do gene *TNFA*, +166G>T (rs2069763) e -330T>G (rs2069762) do gene *IL2*, -1098T>G (rs2243248), -590C>T (rs2243250) e -33T>C (rs2070874) do gene *IL4*, -174G>C (rs1800795) e nt565G>A (rs1800797) do gene *IL6*, -1082A>G (rs1800896), -819C>T (rs1800871) e -592C>A (rs1800872) do gene *IL10* em uma amostra de indivíduos com hepatite C crônica, através da técnica de PCR-SSP;
- Verificar estatisticamente a existência de possíveis associações entre as variantes polimórficas em genes de citocinas com a resposta ao tratamento e grau de dano hepático.

4. CAPÍTULO I

Influence of cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms on the degree of liver damage in patients with chronic hepatitis C

Sara Tatiana Moreira¹, Giovanni Faria Silva², Camila Fernanda Verdichio de Moraes³, Rejane Maria Tomasini Grotto³, Maria Inês de Moura Campos Pardini³, Ricardo Alberto Moliterno¹, Maria da Graça Bicalho⁴

¹Immunogenetics Laboratory, Basic Sciences of Healthy Department, Maringá State University, UEM, Maringá, Paraná, Brazil.

²Gastroenterology Division, Internal Medicine Department, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³Molecular Biology Laboratory of Blood Transfusion Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴Immunogenetics and Histocompatibility Laboratory, Genetics Department, Paraná Federal University, UFPR, Curitiba, Paraná, Brazil

Correspondence to:

Dr. Ricardo Alberto Moliterno

Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel: v 3011 4864

Fax: (+55 44) 3011 4931

e-mail: ramoliterno@uem.br

ABSTRACT

Hepatic fibrosis may be the result of repetitive injury to the hepatocytes caused by HCV infection and the immune response to it, leading to a failure in the regenerative process and deposition of an abundant amount of extracellular matrix. Cytokines regulating the inflammatory response to injury modulate hepatic fibrogenesis *in vivo* and *in vitro*. Single nucleotide polymorphisms located in the regulating/encoding regions of cytokines genes may influence both the expression and secretion of cytokines, resulting in different phenotypes of production, which may contribute to hepatic fibrogenesis in HCV infection. Therefore, the aim of this study was to determine the genotype of 22 SNPs found in 13 genes of cytokines/cytokine receptors to assess the influence of polymorphic variants in the degree of liver damage in Brazilian patients chronically infected with HCV genotype 1 only. Polymorphic variants for *TNFA*-308, *IL6*-174, *IL6*+565 and *IL4RA*+1902 were associated with the degree of liver damage. We conclude that gene variants of cytokines/receptors may influence liver damage in patients chronically infected by HCV genotype 1.

Keywords: hepatitis C, liver fibrosis, hepatic cirrhosis, cytokine, polymorphism

INTRODUCTION

The hepatitis C virus (HCV) is a pathogen responsible for the chronic infection in around two thirds of infected individuals, due to its ability to evade both the innate as well as acquired immunity [1]. Chronic infection may be evidenced by the liver histopathological changes, which begin with an inflammatory process often associated with fibrosis, may progress to cirrhosis and, in some cases, to hepatocellular carcinoma [2]. Fibrosis is the result of repetitive injuries caused to the hepatocytes by HCV infection and the immune response to it, leading to a failure in the regenerative process and deposition of an abundant amount of extracellular matrix. The progressive accumulation of matrix originates nodules, causing injury and hepatic cirrhosis, which are responsible for a high rate of morbidity and mortality worldwide [3, 4]. Although an inflammatory process precedes fibrogenesis, studies have shown that it is not always characterized by a persistent inflammation. Therefore, the mechanisms controlling fibrogenesis are partially different from those regulating inflammation [5]. There is strong evidence that cytokines regulate the inflammatory response to injury and modulate hepatic fibrogenesis both *in vivo* and *in vitro* [4, 6, 7].

The intensity of liver damage is highly variable among individuals and may be influenced by viral, environmental and host-related factors [8]. The diversity of genes involved in the immune response could partly explain the variability in the response to infection by the same etiological agent [9]. Single nucleotide polymorphisms (SNPs), located in regulatory/coding regions of cytokine genes, might influence the expression and secretion of cytokines, resulting in the production of different phenotypes [10, 11]. Furthermore, changes in the levels of different cytokines seem to contribute to hepatic fibrogenesis in HCV infection [12-14].

Although there are studies relating polymorphic variants in cytokine genes to the severity of liver damage in chronic hepatitis C [15], some studies have yielded contradictory results due to poor study design. Most studies apply heterogeneous HCV genotype samples, with or without concurrent hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV) viral infections. So, further research is required to clarify the current role of genetic variants in liver fibrosis [16]. Moreover, no studies using this approach were carried out in Brazil yet. Therefore, the objective of this study was to evaluate the influence of polymorphic variants in cytokine genes and cytokine receptor genes in the degrees of liver damage in Brazilian patients chronically infected with HCV genotype 1 only.

METHODOLOGY

Casistry

Seven hundred and sixty one patients were seen at the Division of Gastroenterology, University Hospital at Botucatu's Medicine School, Brazil and diagnosed as infected with HCV, between September 2004 and January 2009. Of these, 141 unrelated patients were included in this study, according to the following criteria: infection only by HCV genotype 1, diagnosis based on the presence of viral RNA confirmed by molecular tests, chronicity characterized by liver biopsy and persistence of viral RNA in serum, liver biopsy performed prior to the beginning of antiviral treatment,

and signing the consent form. Individuals with risk factors such as alcohol or drug users during treatment, patients with positive serology for hepatitis B and/or human immunodeficiency virus, or hemophiliac patients with other liver diseases were excluded since they could compromise the course of hepatitis C and lead to wrong conclusions. Clinical data were obtained from medical records. Patients were regarded as a mixed ethnic group (excluding Oriental and African ancestry), given that phenotypic evaluations based on physical characteristics such as skin color are not good predictors of genomic African ancestry in Brazilian populations [17]. The study protocol was approved by the Ethics Committee in Human Research, Botucatu's Medicine School, Universidade Estadual Paulista.

Liver biopsy

The degree of fibrosis was determined by histological liver assessment. Percutaneous biopsies were performed by a pathologist with the use of Tru Cut or Menghini needles. The fragment analysis was only performed when at least eight portal areas could be seen. Tissues were stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and reticulin stain and analyzed by the Metavir scale system [18], which classifies the liver sample from zero to four (F0 - no fibrosis, F1 - portal fibrosis without septa, F2 - portal fibrosis with few septa, F3 - portal fibrosis with many septa, F4 - cirrhosis).

Patients were grouped according to their degree of fibrosis: the absence of fibrosis or patients with initial degrees of fibrosis (F0-F2, n=84), patients with advanced degrees of fibrosis or cirrhosis (F3-F4, n=57), without cirrhosis (F0-F3, n=103), and cirrhosis (F4, n=38).

Viral genotyping

HCV genotyping was defined through reverse line probe assay technique (INNOLIPA® v.1.0, Innogenetics, Ghent, Belgium), according to the manufacturer's instructions. This genotyping was preceded by the extraction of total RNA present in patient's plasma, followed by reverse-transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), using the Amplicor HCV test version 2.0 kit (Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, USA).

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from whole blood obtained from an initial volume of 10 mL, collected into tubes containing EDTA. The extraction was performed through *Salting-out* technique [19] or *BioPur* commercial kit (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Pr, Brasil).

Genotyping of polymorphic variants in cytokine genes

The genotyping of the polymorphic variants of cytokine genes was performed with 75-125 ng/μl of DNA, by PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) using the *Cytokine Genotyping kit* (DynaL Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA) according to manufacturer's instructions. It were determined the alleles, genotypes and haplotypes for 22 SNPs located in 13 cytokine genes (Table 01). The amplified fragments were separated on 2% agarose gel in a horizontal electrophoresis system. The results interpretation was performed according to standard forms provided by the manufacturer of the *Cytokine Genotyping kit*.

Statistical analysis

The allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting. Haplotype frequencies were estimated based on the genotype frequencies observed, through the likelihood method using the EM algorithm (expectation maximization), which is part of an integrated software package available in the Arlequin version 3.5 [20]. Convert software was used to prepare the input file for the Arlequin package [21].

The comparison of frequencies in each sub-sample was performed by 2x2 contingency tables using the chi-square or Fisher's exact test, when $n \leq 5$ in any cell. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$. The association strength was assessed by Odds Ratio (OR) obtained with a confidence interval (CI) of 95% [22]. Haldane correction was employed when $n \leq 5$ in any cell [23]. Statistical analyzes were performed using the Vassar Stats software (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). The parameters of linkage disequilibrium D , r^2 and ρ were performed using the Arlequin 3.5 software package [20]. Stepwise logistic regression was used to assess associations between cirrhosis or fibrosis and categorical explanatory variables, such as gender, age and estimated duration of HCV infection. Analysis was conducted using the SPSS 20.0 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Demographic and clinical information of patients

Demographic and clinical information of patients are shown in Table 02. According to Metavir score, 59.6% of patients presented no or mild fibrosis (F0-F2) and 73.1% presented no cirrhosis (F0-F3) (5.0% were F0, 31.2% F1, 23.4% F2, 13.5% F3 and 26.9% F4). The mean age and duration of infection of patients with advanced fibrosis or cirrhosis (F3-F4) was higher than for the patients with no or mild fibrosis (F0-F2) (49.0±9.2 years vs 40.1±9.6 years, $P < 0.05$ and 26.0±9.0 years vs 19.0±6.9 years, $P < 0.05$, respectively). The same trend was observed for patients with cirrhosis (F4), when compared to non-cirrhosis patients (F0-F3) (50.1±9.5 years vs 41.3±9.7 years, $P < 0.05$ and 27.9±9.7 years vs 19.8±7.1 years, $P < 0.05$, respectively). Multivariate logistic regression adjusting for the simultaneous contributions of independent variables (gender, age and estimated duration of HCV infection) indicated that age ($P = 0.010$; $P = 0.047$) and duration of infection ($P = 0.023$; $P = 0.016$) conferred increased risk of fibrosis and cirrhosis (Table 03).

Allele frequencies

Allele frequencies of polymorphic variants in the assessed cytokine genes are shown in Table 04. For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed. The frequency of *IL4RA*+1902/A allele was higher in patients with advanced degrees of hepatic fibrosis (80.7% vs 69.6%, $P = 0.0374$; OR= 1.8228; IC= 1.0312 – 3.2222). The *TNFA*-308/A allele was also more frequent in patients with advanced degrees of hepatic fibrosis (20.0% vs 10.1% $P = 0.0203$; OR= 2.2206; IC= 1.1190 – 4.4066), as well as in patients with cirrhosis (22.2% vs 11.2% $P = 0.0200$; OR= 2.2733; IC=

1.1235 – 4.5998). Accordingly, reciprocal association (protection) was also observed for the *TNFA*-308/G allele.

Genotype frequencies

The genotype frequencies of polymorphic variants in cytokine genes are shown in Table 05. The following genotypes were more frequent in patients with less severe degrees of fibrosis (F0-F2): *TNFA*-308/G:G (82.1% vs 60.0%; $P= 0.0038$; OR=0.326; IC=0.15 – 0.7088) and *IL6*-174/G:G (58.0% vs 40.4%; $P= 0.0409$; OR= 0.489; IC=0.2457 – 0.9747). Genotypes *TNFA*-308/G:A (15.5% vs 40.0%; $P= 0.0011$; OR=3.641; IC=1.6354 – 8.1065), *IL6*-174/G:C (33.3% vs 52.6%; $P= 0.0233$; OR=2.222; IC=1.1085 – 4.455) and *IL6*-565/G:A (30.9% vs 50.9%; $P= 0.0176$; OR=2.32; IC=1.1505 – 4.6784) were more frequent in patients with more severe degrees of liver fibrosis (F3-F4).

Genotypes *IL4RA*+1902/G:G (15.5% vs 2.6%; $P= 0.0414$; OR=0.147; IC= 0.0188 – 1.1491) and *TNFA*-308/G:G (79.7% vs 55.6%; $P= 0.0049$; OR=0.3201; IC= 0.1419 – 0.7222) were more frequent in patients without liver cirrhosis (F0-F3), while genotype *TNFA*-308/G:A (18.4% vs 44.4%; $P= 0.0019$; OR= 3.5368; IC= 1.5505 – 8.0681) was more frequent in the cirrhosis patients (F4).

Haplotype frequencies

The haplotype frequency of polymorphic variants in cytokine genes are shown in Table 06. The haplotype *TNFA*-308; -238/GG was more frequent in patients with less severe degrees of liver fibrosis as well as in the no cirrhosis group (F0-F2 vs F3-F4: 85.1% vs 74.5%; $P= 0.0281$; OR=0.512; IC=0.2799 – 0.9365 and F0-F3 vs F4: 84.5% vs 70.8%; $P= 0.0112$; OR=0.4466; IC=0.2372 – 0.8409, respectively). The haplotype *TNFA*-308; -238/AG was more frequent in patients with a more severe degree of fibrosis, as well as in the group with cirrhosis (F0-F2 vs F3-F4: 10.1% vs 20.0%; $P= 0.0203$; OR= 2.2206; IC= 1.119 – 4.4066 and F0-F3 vs F4: 11.1% vs 22.2%; $P= 0.0200$; OR=2.2733; IC=1.1235 – 4.5998).

The summary of all positive (susceptible) and negative (protective) polymorphic variants are presented on Table 07.

DISCUSSION

The genotype frequencies for the all analyzed SNPs but *IL4RA*+1902 position ($P= 0.0017$) are as expected for a population in Hardy-Weinberg equilibrium. It is not uncommon to find SNP frequencies not in Hardy-Weinberg equilibrium in patient samples (control free). Esser e Tomluk (2005) comment that if the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium occurs only in the group of patients, this provides further evidence of the real existence of possible associations with disease observed for the marker in question [24].

The influence of genetic factors in the natural history of HCV infection has been demonstrated in the last years. Polymorphisms in genes encoding immunoregulatory proteins, proinflammatory cytokines, and fibrogenic factors may affect the production of these factors and influence disease

progression in patients with chronic liver disease such as hepatitis C [16]. Several allelic variants of SNPs located in cytokine genes have been associated with the degree of liver damage [15]. However, some studies have yielded contradictory results due to poor study design [3]. Seeking to contribute to the clarification of inconsistent results, this study carefully selected patients in order to form a homogeneous sample group regarding the HCV genotype and the absence of viral co-infections; they were also evaluated for the influence of polymorphic variants in cytokine genes and cytokine receptors genes regarding the degree of liver damage during chronic infection by HCV genotype 1 only.

An association between the *TNFA*-308/A allele and more severe degrees of liver fibrosis/cirrhosis has been observed; individuals carrying this allele are about twice as likely to develop more advanced degrees of liver fibrosis/cirrhosis than non-carriers. Our results are in agreement with the literature. Dai et al. [25] noticed an association between the *TNFA*-308/A allele and severe stages of liver fibrosis when studying Chinese individuals suffering from chronic hepatitis C (different viral genotypes). Yu et al. [26], despite not obtaining a significant difference, observed a higher frequency of *TNFA*-308/A allele in Chinese patients suffering from chronic hepatitis C with a high degree of hepatic fibrosis. Yee et al. [27] and Hohler et al. [28] found an association between the *TNFA*-308/A allele and liver cirrhosis in an American and German population with chronic hepatitis C, respectively. Jeng et al. [29], studying a Chinese population with hepatocellular carcinoma, found that the greater the degree of hepatic fibrosis, the higher the frequency of *TNFA*-308/A allele. Kusumoto et al. [30] found an association between the *TNFA*-308/A allele and high levels of serum markers of hepatic fibrosis in Japanese patients.

Nevertheless, other authors did not observe this association, or observed an inverse one. Goyal et al. [31], when studying an Indian population chronically infected by HCV of different genotypes, found no association between the polymorphic variants of SNP *TNFA*-308 and the degree of liver damage. Bouzgarrou et al. [32], Barret et al. [33] and Powell et al. [34] also found no association between alleles, genotypes and phenotypes of cytokine production and fibrosis when studying a population of Tunisia, Ireland and Australia, respectively. Similarly, Bahr et al. [35] found no association between alleles and genotypes and liver cirrhosis in a German population. Goncharova et al. [36] on the other hand, reported a higher frequency of the *TNFA*-308/A allele in Russian patients with a lower degree of liver fibrosis/cirrhosis.

We also found *TNFA*-308G>A genotypic associations, which were not found by any of the mentioned authors. The *TNFA*-308/G:G genotype showed a negative association with liver damage, while the *TNFA*-308/G:A genotype was positively associated, increasing by 3.6 times the susceptibility to liver damage. The conflict between the results could be partially explained by ethnic differences among patients. Furthermore, most studies show heterogeneity of the sample groups, which are formed, for example, by individuals infected with different viral genotypes, and in some cases, with unrepresentative sample size.

A possible biological explanation for the associations found in this study is the influence of the *TNFA*-308/A allele in gene transcription. Despite some controversy [37], there is evidence that the *TNF* transcription is highly influenced by polymorphism -308G>A. In the promoter region at position -308, are described a guanine (*TNF*-308/G allele or *TNF**1) to adenine (*TNF*-308/A allele or *TNF**2)

substitution. The *TNFA*-308/A allele has been shown to almost double the *TNFA* gene expression and, thus, the plasma levels of the TNF- α cytokine, possibly due to originating a different binding site for nuclear proteins [38, 39]. The number of -308/A alleles that an individual possess also plays a role in the plasma levels of TNF- α with genotypes -308/A:A and -308/G:A being associated with high production of the cytokine [10, 11, 39]. Although we did not measure the plasma levels of TNF- α , it would be plausible to assume that the high plasma [12, 40-42] and intrahepatic levels [43] of this cytokine seen in patients with high degrees of fibrosis or cirrhosis, could be the result of a higher expression of the *TNFA*-308/A allele in these patients. The high plasma levels of TNF- α would be likely to intensify its pro-inflammatory action in the fibrotic process and would increase its stimulus on Ito cells, protagonists of the fibrogenesis process [44, 45]. Connolly et al. [46], using mouse models, investigated the contribution of dendritic cells in the fibrotic environment and reported that the TNF- α would be the means by which dendritic cells control liver inflammation and fibrogenesis. It has been found that dendritic cells doubled the production of TNF- α and IL-6 after the induction of hepatic fibrosis, and the secretion of TNF- α allowed them to stimulate natural killer cells, T lymphocytes and Ito cells.

Our results showed that the haplotype GG (*TNFA*-308G/-238G) was negatively associated with liver damage. However, haplotype AG (*TNFA*-308A/-238G) was positively associated with it, increasing by 2.3 times the chance of developing more advanced degrees of liver fibrosis/cirrhosis. Since there was no change of allele to the -238 position in both haplotypes, these haplotype associations were influenced by allelic variants of the -308 position and they can be explained by taking into consideration the influence of alleles of this position in gene expression.

Another hypothesis to explain the association obtained by the -308/A allele would be that it was in linkage disequilibrium with the real susceptibility allele. Since it is located in the region of the MHC class III, nearby HLA-B and DR regions, this allele has strong linkage disequilibrium with HLA alleles, being part of the HLA-A1,-B8 -DR3 -DQ2 haplotype [39, 47]. However, Marangon et al. studying class I and II HLA alleles in the same population of this study, found no association between the severity of liver damage with either the above haplotype or any of the haplotype alleles [48].

Studies assessing *IL6*-174 polymorphisms in chronically infected HCV patients according to the severity of liver fibrosis/cirrhosis are extremely scarce. Barrett et al. [33] found no association between the production of genotypes and phenotypes and the severity of fibrosis in an Irish population. However, Falletti et al. [49], when studying Italian patients, found an association between the *IL6*-174/G allele and the intensity of liver damage and Cussigh et al. [50] found an association between the GG haplotype (*IL6*-597G/-174G) and liver damage. In this study, the *IL6*-174/G allele was not associated with liver damage, but the *IL6*-174/G:G genotype was negatively associated with the degree of hepatic fibrosis, while the *IL6*-174/G:C genotype was positively associated with it, increasing about 2.2 times the chance of developing higher degrees of liver fibrosis.

The IL-6 is a pleiotropic cytokine that stimulates several cell types, including hepatocytes [51, 52]. The pathophysiological role of IL-6 in acute or chronic liver disease has been intensively studied [53], however both its clinical relevance and molecular function in the pathogenesis of liver disease are not fully understood [54]. It is known, however, that it plays an important role in the development of

fibrosis, for besides its pro-inflammatory nature, IL-6 deficient mice develop attenuated liver fibrosis [55]. Moreover, IL-6 is expressed along with TNF- α by dendritic cells, modulating the hepatic cytokine and chemokine milieu in fibrosis [46]. In the liver, IL-6 is upregulated in human cirrhosis [56]. High plasma levels of IL-6 have been observed in individuals affected by chronic hepatitis C and these levels tend to increase proportionally to the degree of liver fibrosis as well as in the presence of cirrhosis [54, 57-59].

IL-6 serum levels are regulated at the level of gene expression, since they remain in plasma for a short period [60]. Gene transfection studies showed that the -174/G allele is expressed at approximately 60% higher levels than the -174/C allele. Homozygous individuals for the G allele or heterozygous were characterized as high producers of IL-6 and have high plasma levels of this cytokine. On the other hand, homozygous individuals for the C allele would be low producers of IL-6 [61]. Nonetheless, in the present work both protection against liver damage and enhancing liver damage were observed in high IL-6-producer genotype patients (protection *IL6-174/G:G* and susceptibility *IL6-174/G:A*). Nevertheless, *IL6* gene expression may not only dependent on the -174 genotype, but also on the cell that produces IL-6; different genotypes may influence differently the cytokine level depending on the type of the cell that produces it [62].

Moreover, there seems to be no consensus on the functionality of polymorphisms at *IL6* gene. Two recent studies did not observe any association between the *IL6-174* polymorphism and IL-6 levels [63, 64], indicating that there may be other polymorphic loci affecting the IL-6 expression [37]. It seems that *IL6* gene regulation is also controlled by an element present between positions -5307 and -5202, at the distal portion of the promoter region [65], which has no polymorphisms, but is close to a polymorphic region. A study evaluating the functionality of positions *IL6-174G>C* and *IL6-6331T>C* observed that the -6331/T allele increased the IL-6 expression regardless the -174 allele. The -6331/T allele (but not the -6331/C allele) creates an Oct-1 binding site that probably alters the chromatin structure, bringing the distal regulatory element in close proximity to the transcription start site [66].

Polymorphisms may also directly or indirectly affect the binding of transcriptional limiting factors, consequently increasing or decreasing the production of mRNA, thus regulating cytokine production. Polymorphism at *IL6-174* could affect the *IL6* gene transcription rate, and therefore, also IL-6 inflammatory diseases such as hepatitis C, by the action of the glucocorticoid receptor, a transcription factor involved in regulation of this gene. When the glucocorticoid and its receptor bind to the promoter region of the *IL6* gene, they down regulate IL-6 expression [67]. Experiments suggest that the region between positions -180 and -123 in the promoter region of the *IL6* gene is crucial for the transcription induction [68, 69] and that the gene repression promoted by steroid hormones, such as glucococorticoid, apparently does not involve a high affinity binding to DNA [67, 70, 71]. Since the *IL6-174* polymorphism is located near the binding site of the glucocorticoid receptor to DNA, a nucleotide substitution could cause a potential binding site for the NF-1 transcription factor [33, 62].

No studies in the literature about the *IL6nt565* polymorphism and the severity of fibrosis/cirrhosis were found. In this study, the *IL6nt565/G:A* genotype was associated positively to the degree of hepatic fibrosis, while genotype *IL6nt565/G:G* showed a tendency to negative association (60.5% vs 43.9%; $P= 0.0537$). The *nt565/A:A* genotype presents evidence of being associated to the

high production of IL-6, while nt565/G:A and G:G genotypes seem to be associated with medium and low production, respectively [72]. In this context, the positive association of the genotype GA with a high degree of fibrosis could be related to the IL-6 plasma levels induced by it, a fact consistent with the evidence of higher plasma levels of IL-6 in individuals infected with hepatitis C [54, 57, 58]. Since the nt565 SNP is in strong linkage disequilibrium with the -174 SNP, and their nt565/G and -174/G alleles tend to be found together, as well as nt565/A and -174/C alleles (supplementary material), perhaps the associations found solely for the position -174 are due to this linkage disequilibrium, for no other possible coherently biological explanation was found for the results of SNP *IL6*-174.

Other authors suggest that distinct polymorphic sites do not act independently of one another for the *IL6* gene, and one polymorphism influences the functional effect of variation at other polymorphic sites [62]. Therefore, further investigations involving several SNPs within the *IL6* gene besides *IL6*-174 and nt565 are necessary.

The IL-4 receptor (IL4R) is composed of two subunits, the α , which binds with high affinity to the ligand, and the γ , common to other cytokine receptors, which amplifies the signal from the α -subunit [73, 74]. The α -subunit is also part of the receptor of IL-13 together with the IL-13 binding protein, IL13R α 1 [37]. The α subunit is encoded by the *IL4RA* gene, located in 16p12.1. Among the polymorphisms described for this gene is the -1902G>A [75], resulting in change of glutamine for arginine at position 576 of the peptide (often referred to as position 551 if the signal peptide is not included in counting). Although a recent study of systemic sclerosis showed that this polymorphism does not influence gene expression [76], other studies have demonstrated that this change interferes with intracellular signaling [74, 77], due to its location in the peptide intracellular domain, and that the *IL4RA*+1902/G allele is associated with enhanced signaling of the receptor [78] and, consequently, enhance expression of *IL4* and *IL13* regulated genes, since it presents IL-4 and IL-13 as ligand [79].

The present work showed that the *IL4RA*+1902/A allele was positively associated to the degree of hepatic fibrosis, while the G allele and the *IL4RA*+1902/G:G genotype are associated negatively to development of fibrosis and cirrhosis, respectively. Avdoshina et al. [80] observed a higher frequency of the +1902/G:G genotype in patients infected with HCV compared to healthy volunteers. Vasakova et al. [81], observed an association between the +1902/A:G and idiopathic lung fibrosis when studying a population in the Czech Republic. However, there appear to have been no previous studies assessing the relationship between position +1902 and liver damage.

The presence of the *IL4RA*+1902/G:G genotype enhance signaling of both IL4R and IL13R and, consequently, increases the action of IL-4 and IL-13 [79]. As IL-4 and IL-13 are anti-inflammatory cytokines, which would block the effect of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6, which seems to be involved in the development of fibrosis and cirrhosis in the present work. Thus, patients with the G:G genotype would be protected against the development of cirrhosis by its anti-inflammatory activity.

CONCLUSION

Our results show that polymorphic variants for the *TNFA*-308, *IL6*-174, *IL6*nt565 and *IL4RA*+1902 positions are associated with the degree of liver damage during chronic infection with

HCV genotype 1. Some of our data confirmed the results of previous studies conducted in other populations, while others were novel and require replication to confirm. In this study, patients were thoroughly characterized with respect to the degree of liver damage, time of infection, among other possible non-genetic interfering factors, forming a homogeneous group. These efforts may have more clearly characterized the host's genetic interfering factors leading to liver damage of chronically HCV-1 infected patients. We are aware, however, that polymorphisms in cytokines genes and cytokine receptors are obviously not the only factors that influence the degree of liver damage and that polymorphisms in other genes certainly contribute to the process. Therefore, the conclusion is that the hepatic damage in chronically HCV 1 infected patients seems to be under the influence of polymorphisms of genes for both cytokine and cytokine receptors; the knowledge of these markers may have prognostic significance in patients chronically infected with HCV, allowing a more aggressive therapy for those with increased risk of evolving to more severe forms of the disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the individuals who donated blood samples and made this work possible. We would also like to thank our lab and PhD colleagues for their help in several tasks. This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

The funding sources had no role in the study design, collection, analysis and interpretation of the data, in the writing or decision to submit the paper for publication.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Dustin, L.B. and C.M. Rice, *Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C*. *Annu Rev Immunol*, 2007. **25**: p. 71-99.
2. Thomas, D.L. and L.B. Seeff, *Natural history of hepatitis C*. *Clin Liver Dis*, 2005. **9**(3): p. 383-98, vi.
3. Bataller, R. and D.A. Brenner, *Liver fibrosis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 209-18.
4. Zimmer, V. and F. Lammert, *Genetics and epigenetics in the fibrogenic evolution of chronic liver diseases*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011. **25**(2): p. 269-80.
5. Wynn, T.A., *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(8): p. 583-94.
6. Marra, F., *Chemokines in liver inflammation and fibrosis*. *Front Biosci*, 2002. **7**: p. d1899-914.
7. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
8. Ghany, M.G., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update*. *Hepatology*, 2009. **49**(4): p. 1335-74.
9. Martin, M.P. and M. Carrington, *Immunogenetics of viral infections*. *Curr Opin Immunol*, 2005. **17**(5): p. 510-6.
10. Perrey, C., et al., *Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report*. *Transpl Immunol*, 1998. **6**(3): p. 193-7.

11. Tambur, A.R., et al., *Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients*. *Transplantation*, 2001. **71**(10): p. 1475-80.
12. Andersen, E.S., et al., *Twelve potential fibrosis markers to differentiate mild liver fibrosis from cirrhosis in patients infected with chronic hepatitis C genotype 1*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011. **30**(6): p. 761-6.
13. Morgan, T.R., et al., *DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: results from the HALT-C trial*. *J Hepatol*, 2008. **49**(4): p. 548-56.
14. Guo, W., et al., *Ligation of MHC class II molecules differentially upregulates TNF beta gene expression in B cell lines of different MHC class II haplotypes*. *Hum Immunol*, 1999. **60**(4): p. 312-22.
15. Romero-Gomez, M., et al., *Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment*. *Liver Int*, 2011. **31**(4): p. 443-60.
16. Bataller, R., K.E. North, and D.A. Brenner, *Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal*. *Hepatology*, 2003. **37**(3): p. 493-503.
17. Parra, F.C., et al., *Color and genomic ancestry in Brazilians*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(1): p. 177-82.
18. Asselah, T., et al., *Gene expression and hepatitis C virus infection*. *Gut*, 2009. **58**(6): p. 846-58.
19. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. *Nucleic Acids Res*, 1991. **19**(19): p. 5444.
20. Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. *Evol Bioinform Online*, 2005. **1**: p. 47-50.
21. Glaubitz, J.C., *CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages*. *Molecular Ecology Notes*, 2004(4): p. 309-310.
22. Woolf, B., *On estimating the relation between blood group and disease*. *Ann Hum Genet*, 1955. **19**(4): p. 251-3.
23. Svejgaard, A. and L.P. Ryder, *HLA and disease associations: detecting the strongest association*. *Tissue Antigens*, 1994. **43**(1): p. 18-27.
24. Esser, C. and J. Tomluk, *Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: reasons for caution but not for panic reactions*. *J Invest Dermatol*, 2005. **124**(5): p. 1082-3.
25. Dai, C.Y., et al., *Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C*. *J Viral Hepat*, 2006. **13**(11): p. 770-4.
26. Yu, M.L., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha*. *Antiviral Res*, 2003. **59**(1): p. 35-40.
27. Yee, L.J., et al., *Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection*. *Genes Immun*, 2000. **1**(6): p. 386-90.
28. Hohler, T., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position -238 is associated with chronic active hepatitis C infection*. *J Med Virol*, 1998. **54**(3): p. 173-7.
29. Jeng, J.E., et al., *Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma*. *Neoplasia*, 2007. **9**(11): p. 987-92.
30. Kusumoto, K., et al., *Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan*. *Cytokine*, 2006. **34**(1-2): p. 24-31.
31. Goyal, A., et al., *Association of TNF-beta polymorphism with disease severity among patients infected with hepatitis C virus*. *J Med Virol*, 2004. **72**(1): p. 60-5.
32. Bouzgarrou, N., et al., *Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha -308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients*. *Gastroenterol Clin Biol*, 2010. **34**(4-5): p. 297-304.
33. Barrett, S., et al., *Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection*. *J Med Virol*, 2003. **71**(2): p. 212-8.
34. Suppiah, V., et al., *IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy*. *Nat Genet*, 2009. **41**(10): p. 1100-4.
35. Bahr, M.J., et al., *Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. *Liver Int*, 2003. **23**(6): p. 420-5.

36. Goncharova, I.A., et al., *Genetics factors determining predisposition to chronic course of virus hepatitis and fibrosis in liver*. Mol Biol (Mosk), 2008. **42**(2): p. 238-41.
37. Smith, A.J. and S.E. Humphries, *Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(1): p. 43-59.
38. Kroeger, K.M., K.S. Carville, and L.J. Abraham, *The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription*. Mol Immunol, 1997. **34**(5): p. 391-9.
39. Minton, E.J., et al., *Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes*. Hum Immunol, 2005. **66**(2): p. 127-32.
40. Neuman, M.G., et al., *Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis*. J Viral Hepat, 2002. **9**(2): p. 134-40.
41. Zylberberg, H., et al., *Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity*. J Hepatol, 1999. **30**(2): p. 185-91.
42. Crespo, J., et al., *Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(7): p. 1604-10.
43. Mahmood, S., et al., *Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients*. Hepatol Res, 2002. **24**(4): p. 413-419.
44. Ruuls, S.R. and J.D. Sedgwick, *Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(2): p. 294-301.
45. Albanis, E. and S.L. Friedman, *Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy*. Clin Liver Dis, 2001. **5**(2): p. 315-34, v-vi.
46. Connolly, M.K., et al., *In liver fibrosis, dendritic cells govern hepatic inflammation in mice via TNF-alpha*. J Clin Invest, 2009. **119**(11): p. 3213-25.
47. Nedwin, G.E., et al., *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(17): p. 6361-73.
48. Marangon, A.V., et al., *Influence of HLA alleles in response to treatment with pegylated interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C*. Int J Immunogenet, 2012.
49. Falletti, E., et al., *Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C*. Hum Immunol, 2010. **71**(10): p. 999-1004.
50. Cussigh, A., et al., *Interleukin 6 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C*. Immunogenetics, 2011. **63**(1): p. 33-41.
51. Hirano, T., *Interleukin 6 and its receptor: ten years later*. Int Rev Immunol, 1998. **16**(3-4): p. 249-84.
52. Barton, B.E., *IL-6: insights into novel biological activities*. Clin Immunol Immunopathol, 1997. **85**(1): p. 16-20.
53. Galun, E. and J.H. Axelrod, *The role of cytokines in liver failure and regeneration: potential new molecular therapies*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 345-58.
54. Migita, K., et al., *Serum levels of interleukin-6 and its soluble receptors in patients with hepatitis C virus infection*. Hum Immunol, 2006. **67**(1-2): p. 27-32.
55. Natsume, M., et al., *Attenuated liver fibrosis and depressed serum albumin levels in carbon tetrachloride-treated IL-6-deficient mice*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 601-8.
56. Napoli, J., G.A. Bishop, and G.W. McCaughan, *Increased intrahepatic messenger RNA expression of interleukins 2, 6, and 8 in human cirrhosis*. Gastroenterology, 1994. **107**(3): p. 789-98.
57. Malaguarnera, M., et al., *Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus*. J Gastroenterol, 1997. **32**(2): p. 211-5.
58. Malaguarnera, M., et al., *Interleukin-6 in hepatitis C cirrhosis*. Panminerva Med, 1996. **38**(4): p. 207-10.
59. Gonzalez, A., et al., *Efficacy of screening donors for antibodies to the hepatitis C virus to prevent transfusion-associated hepatitis: final report of a prospective trial*. Hepatology, 1995. **22**(2): p. 439-45.
60. Castell, J.V., et al., *Plasma clearance, organ distribution and target cells of interleukin-6/hepatocyte-stimulating factor in the rat*. Eur J Biochem, 1988. **177**(2): p. 357-61.
61. Fishman, S.L. and A.D. Branch, *The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(6): p. 1158-67.
62. Terry, C.F., V. Loukaci, and F.R. Green, *Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18138-44.
63. Kiszal, P., et al., *Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells*. Cytokine, 2007. **40**(1): p. 17-22.

64. Huth, C., et al., *Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index*. Ann Med, 2009. **41**(2): p. 128-38.
65. Samuel, J.M., et al., *Identification of a novel regulatory region in the interleukin-6 gene promoter*. Cytokine, 2008. **42**(2): p. 256-64.
66. Smith, A.J., et al., *Association of serum interleukin-6 concentration with a functional IL6 -6331T>C polymorphism*. Clin Chem, 2008. **54**(5): p. 841-50.
67. Ray, A., K.S. LaForge, and P.B. Sehgal, *On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(11): p. 5736-46.
68. May, L.T., et al., *Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes*. J Biol Chem, 1988. **263**(16): p. 7760-6.
69. Isshiki, H., et al., *Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(6): p. 2757-64.
70. Ray, A., K.S. LaForge, and P.B. Sehgal, *Repressor to activator switch by mutations in the first Zn finger of the glucocorticoid receptor: is direct DNA binding necessary?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(16): p. 7086-90.
71. Ray, A., K.E. Prefontaine, and P. Ray, *Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(17): p. 12940-6.
72. Stoica, A.L., et al., *Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphism, endothelial dysfunction, and postoperative prognosis in patients with peripheral arterial disease*. J Vasc Surg, 2010. **52**(1): p. 103-9.
73. Izuhara, K. and T. Shirakawa, *Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy*. Int J Mol Med, 1999. **3**(1): p. 3-10.
74. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
75. Caggana, M., et al., *Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups*. Genet Med, 1999. **1**(6): p. 267-71.
76. Broen, J.C., et al., *Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 13, and corresponding receptor genes are not associated with systemic sclerosis and do not influence gene expression*. J Rheumatol, 2012. **39**(1): p. 112-8.
77. Mitsuyasu, H., et al., *Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 119-20.
78. Hershey, G.K., et al., *The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor*. N Engl J Med, 1997. **337**(24): p. 1720-5.
79. Kelly-Welch, A.E., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1527-8.
80. Avdoshina, V.V., et al., *[Alleles distribution of polymorphic promoter region C-590T in interleukin-4 genes and Q-576r and Ile-50Val regions in IL-4 receptor gene IL-4RA in patients with HCV-infection]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2007(1): p. 43-6.
81. Vasakova, M., et al., *Cytokine gene polymorphisms and high-resolution-computed tomography score in idiopathic pulmonary fibrosis*. Respir Med, 2007. **101**(5): p. 944-50.

Table 01. List of the investigated cytokine SNPs.

Cytokine gene	Gene chromosome location	SNP designation in the kit	dbSNP-ID	SNP chromosome position (reference)	Location
<i>IL1A</i>	2q14	-889C>T	rs1800587	113259431	5'-UTR
<i>IL1B</i>	2q14	-511T>C	rs16944	113311338	Promoter
		+3962C>T	rs1143634	113306861	Coding/synonymous
<i>IL1R1</i>	2q12	pst1 1970C>T	rs2234650	102124759	Distal promoter
<i>IL1RN</i>	2q14.2	m spa1 11100C>T	rs315952	113606775	Coding/synonymous
<i>IL4RA</i>	16p12.1–p11.2	+1902G>A	rs1801275	27281901	Coding/missense
<i>IL12B</i>	5q31.1–33.1	-1188A>C	rs3212227	158675528	3'-UTR
<i>IFNG</i>	12q14	+874T>A	rs2430561	66838787	Intron
<i>TGFB1</i>	19q13.1	codon 10C>T	rs1800470	46550761	Coding/missense
		codon 25G>C	rs1800471	46550716	Coding/missense
<i>TNF</i>	6p21.3	-308G>A	rs1800629	31651010	Promoter
		-238G>A	rs361525	31651080	Promoter
<i>IL2</i>	4q26-27	-330T>G	rs2069762	123597430	Promoter
		+166G>T	rs2069763	123596932	Coding/synonymous
<i>IL4</i>	5q31.1	-1098T>G	rs2243248	132036543	Promoter
		-590C>T	rs2243250	132037053	Promoter
		-33T>C	rs2070874	132037609	5'-UTR
<i>IL6</i>	7p21	-174G>C	rs1800795	22733170	Promoter
		nt565G>A	rs1800797	22732746	Promoter
<i>IL10</i>	1q31–q32	-1082A>G	rs1800896	205013520	Promoter
		-819C>T	rs1800871	205013257	Promoter
		-592C>A	rs1800872	205013030	Promoter

Table 02. Demographic and clinical information of patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C classified according to the degree of fibrosis by the Metavir scale.

Characteristics	Patients (n=141)	F0-F2 (n=84)	F3-F4 (n=57)	F0-F3 (n=103)	F4 (n=38)
Age (years, mean \pm)	43.7 \pm 10.4	40.1 \pm 9.6	49.0 \pm 9.2	41.3 \pm 9.7	50.1 \pm 9.5
Gender n (%)					
Male	108 (76.6)	65 (77.4)	43 (75.4)	81 (78.6)	27 (71.0)
Female	33 (23.4)	19 (22.6)	14 (24.6)	22 (21.4)	11 (28.0)
Duration of infection (years, mean \pm SD) ^{*†}	21.8 \pm 8.5	19.0 \pm 6.9	26.0 \pm 9.0	19.8 \pm 7.1	27.9 \pm 9.7
METAVIR Stage n (%) ^{**}					
F0	7 (5.0)	7 (8.3)	- -	7 (6.8)	- -
F1	44 (31.2)	44 (52.4)	- -	44 (42.7)	- -
F2	33 (23.4)	33 (39.3)	- -	33 (32.0)	- -
F3	19 (13.5)	- -	19 (33.3)	19 (18.5)	- -
F4	38 (26.9)	- -	38 (66.7)	- -	38 (100.0)

* $P < 0,05$ when comparing F0-F2 vs F3-F4 and F0-F3 vs F4.

†Duration of infection was calculated only for 87 patients (F0=4, F1=25, F2=23, F3=14, F4=21). The duration of infection for 54 patients is unknown.

**METAVIR score: F0 – no fibrosis, F1 – portal fibrosis without septa, F2 – portal fibrosis and few septa, F3 – numerous septa without cirrhosis, F4 – cirrhosis.

Table 03. Multivariate analysis of predictors of fibrosis or cirrhosis among patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C classified according to the degree of fibrosis by the Metavir scale.

Response variable	Independent variable	Coefficient	P	OR
Degree of fibrosis (F0-F2 and F3-F4)	Gender (M/F)	-0.393	0.545	0.675
	Age (years)	0.083	0.010	1.087
	Duration of infection (years)	0.087	0.023	1.091
Presence or absence of cirrhosis	Gender (M/F)	-0.457	0.532	0.633
	Age (years)	0.069	0.047	1.072
	Duration of infection (years)	0.095	0.016	1.100

METAVIR score: F0 – no fibrosis, F1 – portal fibrosis without septa, F2 – portal fibrosis and few septa, F3 – numerous septa without cirrhosis, F4 – cirrhosis.

Table 04. Distribution of allele frequencies of polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according to their degree of fibrosis by the Metavir scale.

Polymorphism	Alleles	F0-F2 (n=84)		F3-F4 (n=57)		F0-F3 (n=103)		F4 (n=38)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
<i>IL1A-889</i>	C	123	(74.1)	79	(74.5)	151	(74.0)	51	(75.0)
	T	43	(25.9)	27	(25.5)	53	(26.0)	17	(25.0)
<i>IL1B-511</i>	C	99	(61.1)	74	(64.9)	123	(61.5)	50	(65.8)
	T	63	(38.9)	40	(35.1)	77	(38.5)	26	(34.2)
<i>IL1B+3962</i>	C	131	(79.9)	88	(77.2)	160	(79.2)	59	(77.6)
	T	33	(20.1)	26	(22.8)	42	(20.8)	17	(22.4)
<i>IL1R1 pst1 1970</i>	T	57	(34.3)	28	(24.6)	64	(31.4)	21	(27.6)
	C	109	(65.7)	86	(75.4)	140	(68.6)	55	(72.4)
<i>IL1RA mspa1 11100</i>	T	121	(72.0)	87	(76.3)	150	(72.8)	58	(76.3)
	C	47	(28.0)	27	(23.7)	56	(27.2)	18	(23.7)
<i>IL4RA+1902</i>	A^a	117	(69.6)	92	(80.7)	147	(71.4)	62	(81.6)
	G	51	(30.4)	22	(19.3)	59	(28.6)	14	(18.4)
<i>IL12B-1188</i>	A	120	(75.0)	76	(70.4)	146	(73.7)	50	(71.4)
	C	40	(25.0)	32	(29.6)	52	(26.3)	20	(28.6)
<i>IFNG+874</i>	A	91	(54.2)	56	(50.9)	109	(52.9)	38	(52.8)
	T	77	(45.8)	54	(49.1)	97	(47.1)	34	(47.2)
<i>TGFB1 cdn10</i>	C	80	(47.6)	51	(45.5)	96	(46.6)	35	(47.3)
	T	88	(52.4)	61	(54.5)	110	(53.4)	39	(52.7)
<i>TGFB1 cdn25</i>	C	9	(5.4)	8	(7.1)	12	(5.8)	5	(6.7)
	G	159	(94.6)	104	(92.9)	194	(94.2)	69	(93.3)
<i>TNFA-308</i>	G	151	(89.9)	88	(80.0)	183	(88.8)	56	(77.8)
	A^b	17	(10.1)	22	(20.0)	23	(11.2)	16	(22.2)
<i>TNFA-238</i>	G	160	(95.2)	104	(94.6)	197	(95.6)	67	(93.0)
	A	8	(4.8)	6	(5.5)	9	(4.4)	5	(7.0)
<i>IL2-330</i>	G	51	(31.1)	30	(26.8)	62	(30.7)	19	(25.7)
	T	113	(68.9)	82	(73.2)	140	(69.3)	55	(74.3)
<i>IL2+166</i>	G	110	(67.1)	72	(64.3)	134	(66.3)	48	(64.9)
	T	54	(32.9)	40	(35.7)	68	(33.7)	26	(35.1)
<i>IL4-1098</i>	T	121	(76.6)	86	(79.6)	152	(78.4)	55	(76.4)
	G	37	(23.4)	22	(20.4)	42	(21.6)	17	(23.6)
<i>IL4-590</i>	C	120	(76.0)	87	(80.5)	148	(76.3)	59	(81.9)
	T	38	(24.0)	21	(19.5)	46	(23.7)	13	(18.1)
<i>IL4-33</i>	T	35	(22.2)	18	(16.7)	41	(21.1)	12	(16.7)
	C	123	(77.8)	90	(83.3)	153	(78.9)	60	(83.3)
<i>IL6-174</i>	G	121	(74.7)	76	(66.7)	146	(73.0)	51	(67.1)
	C	41	(25.3)	38	(33.3)	54	(27.0)	25	(32.9)
<i>IL6nt565</i>	G	123	(75.9)	79	(69.3)	149	(74.5)	53	(69.7)
	A	39	(24.1)	35	(30.7)	51	(25.5)	23	(30.3)
<i>IL10-1082</i>	G	67	(39.9)	41	(37.3)	81	(39.7)	27	(36.5)
	A	101	(60.1)	69	(62.7)	123	(60.3)	47	(63.5)
<i>IL10-819</i>	C	114	(67.9)	79	(71.8)	143	(70.1)	50	(67.6)
	T	54	(32.1)	31	(28.2)	61	(29.9)	24	(32.4)
<i>IL10-592</i>	C	114	(67.9)	79	(71.8)	143	(70.1)	50	(67.6)
	A	54	(32.1)	31	(28.2)	61	(29.9)	24	(32.4)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed, so N is variable depending on the SNP.

P obtained through Chi-square test or Fisher's test.
n= number of alleles; F%= allele relative frequency.

F0-F2, early degree of liver fibrosis; F3-F4, advanced degrees of liver fibrosis or cirrhosis; F0-F3, no cirrhosis; F4, cirrhosis.

^a F3-F4 vs F0-F2: 92 (80.7%) vs 117 (69.6%). $P= 0.0374$; OR= 1.8228; IC= 1.0312 – 3.2222

^b F3-F4 vs F0-F2: 22 (20.0%) vs 17 (10.1%) $P= 0.0203$; OR= 2.2206; IC= 1.1190 – 4.4066

^b F4 vs F0-F3: 16 (22.2%) vs 23 (11.2%) $P= 0.0200$; OR= 2.2733; IC= 1.1235 – 4.5998

Table 05. Distribution of genotype frequencies of polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according with the fibrosis degree by the Metavir scale.

Polymorphism	Genotypes	F0-F2 (n=84)		F3-F4 (n=57)		F0-F3 (n=103)		F4 (n=38)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
IL1A-889	C:C	45	(54.2)	31	(58.5)	56	(54.9)	20	(58.8)
	C:T	33	(39.8)	17	(32.1)	39	(38.2)	11	(32.4)
	T:T	5	(6.0)	5	(9.4)	7	(6.9)	3	(8.8)
IL1B-511	C:C	32	(39.5)	23	(40.4)	41	(41.0)	14	(36.8)
	C:T	35	(43.2)	28	(49.1)	41	(41.0)	22	(57.9)
	T:T	14	(17.3)	6	(10.5)	18	(18.0)	2	(5.3)
IL1B+3962	C:C	52	(63.4)	34	(59.7)	63	(62.3)	23	(60.5)
	T:C	27	(32.9)	20	(35.1)	34	(33.7)	13	(34.2)
	T:T	3	(3.7)	3	(5.3)	4	(4.0)	2	(5.3)
IL1R1 pst1	T:T	8	(9.6)	3	(5.3)	8	(7.8)	3	(7.9)
	C:T	41	(49.4)	22	(38.6)	48	(47.1)	15	(39.5)
1970	C:C	34	(41.0)	32	(56.1)	46	(45.1)	20	(52.6)
IL1RA mspa1	T:T	44	(52.4)	33	(57.9)	56	(54.4)	21	(55.3)
	T:C	33	(39.3)	21	(36.8)	38	(36.9)	16	(42.1)
11100	C:C	7	(8.3)	3	(5.3)	9	(8.7)	1	(2.6)
IL4RA+1902	A:A	46	(54.8)	39	(68.4)	60	(58.3)	25	(65.8)
	G:A	25	(29.8)	14	(24.6)	27	(26.2)	12	(31.6)
	G:G^a	13	(15.4)	4	(7.0)	16	(15.5)	1	(2.6)
IL12B-1188	A:A	44	(55.0)	26	(48.2)	53	(53.5)	17	(48.6)
	C:A	32	(40.0)	24	(44.4)	40	(40.4)	16	(45.7)
	C:C	4	(5.0)	4	(7.4)	6	(6.1)	2	(5.7)
IFNG+874	A:A	22	(26.2)	17	(30.9)	28	(27.2)	11	(30.6)
	A:T	47	(56.0)	22	(40.0)	53	(51.5)	16	(44.4)
	T:T	15	(17.8)	16	(29.1)	22	(21.3)	9	(25.0)
TGFB1 cdn10	C:C	22	(26.1)	11	(19.6)	25	(24.3)	8	(21.6)
	C:T	36	(42.9)	29	(51.8)	46	(44.7)	19	(51.4)
	T:T	26	(31.0)	16	(28.6)	32	(31.0)	10	(27.0)
TGFB1 cdn25	C:C	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
	C:G	9	(10.7)	8	(14.3)	12	(11.7)	5	(13.5)
	G:G	75	(89.3)	48	(85.7)	91	(88.3)	32	(86.5)
TNFA-308	G:G^{bc}	69	(82.1)	33	(60.0)	82	(79.7)	20	(55.6)
	G:A^{de}	13	(15.5)	22	(40.0)	19	(18.4)	16	(44.4)
	A:A	2	(2.4)	0	(0.0)	2	(1.9)	0	(0.0)
TNFA-238	G:G	76	(90.5)	49	(89.1)	94	(91.3)	31	(86.1)
	G:A	8	(9.5)	6	(10.9)	9	(8.7)	5	(13.9)
	A:A	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
IL2-330	G:G	9	(11.0)	4	(7.1)	11	(10.9)	2	(5.4)
	G:T	33	(40.2)	22	(39.3)	40	(39.6)	15	(40.5)
	T:T	40	(48.8)	30	(53.6)	50	(49.5)	20	(54.1)
IL2+166	G:G	38	(46.3)	24	(42.9)	46	(45.5)	16	(43.2)
	G:T	34	(41.5)	24	(42.9)	42	(41.6)	16	(43.2)
	T:T	10	(12.2)	8	(14.2)	13	(12.9)	5	(13.6)
IL4-1098	T:T	44	(55.7)	34	(63.0)	58	(59.8)	20	(55.5)
	T:G	33	(41.8)	18	(33.3)	36	(37.1)	15	(41.7)
	G:G	2	(2.5)	2	(3.7)	3	(3.1)	1	(2.8)
IL4-590	C:C	46	(58.2)	36	(66.7)	56	(57.7)	26	(72.3)
	C:T	28	(35.4)	15	(27.8)	36	(37.1)	7	(19.4)
	T:T	5	(6.4)	3	(5.5)	5	(5.2)	3	(8.3)

IL4-33	T:T	4 (5.1)	2 (3.7)	4 (4.1)	2 (5.6)
	T:C	27 (34.2)	14 (26.0)	33 (34.0)	8 (22.2)
	C:C	48 (60.7)	38 (70.3)	60 (61.9)	26 (72.2)
IL6-174	G:G^f	47 (58.0)	23 (40.4)	54 (54.0)	16 (42.1)
	G:C^g	27 (33.3)	30 (52.6)	38 (38.0)	19 (50.0)
IL6nt565	C:C	7 (8.7)	4 (7.0)	8 (8.0)	3 (7.9)
	G:G	49 (60.5)	25 (43.9)	56 (56.0)	18 (47.4)
	G:A^h	25 (30.9)	29 (50.9)	37 (37.0)	17 (44.7)
IL10-1082	A:A	7 (8.6)	3 (5.2)	7 (7.0)	3 (7.9)
	G:G	14 (16.7)	9 (16.4)	16 (15.7)	7 (18.9)
	G:A	39 (46.4)	23 (41.8)	49 (48.0)	13 (35.2)
IL10-819	A:A	31 (36.9)	23 (41.8)	37 (36.3)	17 (45.9)
	C:C	36 (42.9)	30 (54.6)	48 (47.0)	18 (48.7)
	C:T	42 (50.0)	19 (34.5)	47 (46.1)	14 (37.8)
IL10-592	T:T	6 (7.1)	6 (10.9)	7 (6.9)	5 (13.5)
	C:C	36 (42.9)	30 (54.6)	48 (47.0)	18 (48.7)
	C:A	42 (50.0)	19 (34.5)	47 (46.1)	14 (37.8)
	A:A	6 (7.1)	6 (10.9)	7 (6.9)	5 (13.5)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed, so N is variable depending on the SNP.

P obtained through the Chi-square test or Fisher's test.

n= number of genotype; F%= relative frequency of genotypes.

F0-F2: early stages of liver fibrosis; F3-F4, advanced stages of liver fibrosis or cirrhosis; F0-F3, no cirrhosis; F4, cirrhosis.

^a F0-F3 vs F4: 16 (15.5%) vs 1 (2.6%) *P*=0.0414; OR=0.147; IC=0.0188 – 1.1491

^b F0-F2 vs F3-F4: 69 (82.1%) vs 33 (60.0%) *P*= 0.0038; OR=0.326; IC=0.15 - 0.7088

^c F0-F3 vs F4: 82 (79.7%) vs 20 (55.6%) *P*= 0.0049; OR=0.3201; IC=0.1419 – 0.7222

^d F0-F2 vs F3-F4: 13 (15.5%) vs 22 (40.0%) *P*= 0.0011; OR=3.641; IC=1.6354 - 8.1065

^e F0-F3 vs F4: 19 (18.4%) vs 16 (44.4%) *P*= 0.0019; OR=3.5368; IC=1.5505 – 8.0681

^f F0-F2 vs F3-F4: 47 (58.0%) vs 23 (40.4%) *P*= 0.0409; OR=0.489; IC=0.2457 - 0.9747

^g F0-F2 vs F3-F4: 27 (33.3%) vs 30 (52.6%) *P*= 0.0233; OR=2.222; IC=1.1085 - 4.455

^h F0-F2 vs F3-F4: 25 (30.9%) vs 29 (50.9%) *P*= 0.0176; OR=2.32; IC=1.1505 - 4.6784

Table 06. Distribution of haplotype frequencies of polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according with the fibrosis degree by the Metavir scale.

Polymorphism	Haplotypes	F0-F2 (n=84)		F3-F4 (n=57)		F0-F3 (n=103)		F4 (n=38)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
TGFBβ1 (cdn10 ; cdn25)	CG	71	(42.2)	43	(38.3)	84	(40.8)	30	(40.5)
	TG	88	(52.4)	61	(54.5)	110	(53.4)	39	(52.7)
	CC	9	(5.4)	8	(7.2)	12	(5.8)	5	(6.8)
TNFA (-308; -238)	GG^{ab}	143	(85.1)	82	(74.5)	174	(84.5)	51	(70.8)
	GA	8	(4.8)	6	(5.5)	9	(4.4)	5	(6.9)
IL2 (-330; +166)	AG^{cd}	17	(10.1)	22	(20.0)	23	(11.1)	16	(22.2)
	TG	59	(36.0)	42	(37.5)	72	(35.6)	29	(39.2)
	GG	51	(31.1)	30	(26.8)	62	(30.7)	19	(25.7)
IL4 (-1098; -590; -33)	TT	54	(32.9)	40	(35.7)	68	(33.7)	26	(35.1)
	GCC	35	(22.2)	21	(19.4)	40	(20.6)	16	(22.2)
	TCC	85	(53.8)	66	(61.1)	108	(55.7)	43	(59.7)
	TTT	34	(21.5)	18	(16.7)	40	(20.6)	12	(16.7)
	TTC	2	(1.3)	2	(1.9)	4	(2.1)	0	(0.0)
IL6 (-174; nt565)	GTT	1	(0.6)	0	(0.0)	1	(0.5)	0	(0.0)
	GTC	1	(0.6)	1	(0.9)	1	(0.5)	1	(1.4)
	GG	121	(74.7)	76	(66.7)	146	(73.0)	51	(67.1)
IL10 (-1082; -819; -592)	CA	39	(24.1)	35	(30.7)	51	(25.5)	23	(30.3)
	CG	2	(1.2)	3	(2.6)	3	(1.5)	2	(2.6)
	ATA	54	(32.1)	31	(27.7)	61	(29.6)	24	(32.4)
	ACC	47	(28.0)	39	(34.8)	63	(30.6)	23	(31.1)
	GCC	67	(39.9)	42	(37.5)	82	(39.8)	27	(36.5)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed, so N is variable depending on the SNP.

P obtained through the Chi-square test or Fisher's test.

n= number of haplotype; F%= relative frequency of haplotype.

F0-F2: early stages of liver fibrosis; F3-F4, advanced stages of liver fibrosis or cirrhosis; F0-F3, no cirrhosis; F4, cirrhosis.

^a F0-F2 vs F3-F4: 143 (85.1%) vs 82 (74.5%) $P= 0.0281$; OR=0.512; IC=0.2799 – 0.9365

^b F0-F3 vs F4: 174 (84.5%) vs 51 (70.8%) $P= 0.0112$; OR=0.4466; IC=0.2372 – 0.8409

^c F0-F2 vs F3-F4: 17 (10.1%) vs 22 (20.0%) $P= 0.0203$; OR=2.2206; IC=1.119 - 4.4066

^d F0-F3 vs F4: 23 (11.1%) vs 16 (22.2%) $P= 0.0200$; OR=2.2733; IC=1.1235 – 4.5998

Table 07. Summary of all positive (susceptible) and negative (protective) polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according with the fibrosis degree by the Metavir scale.

Polymorphisms		Positive Association with hepatic damage	Negative Association with hepatic damage
<i>TNFA-308</i>	A	F3-F4 and F4	
	G:G		F0-F2 and F0-F3
	G:A	F3-F4 and F4	
<i>TNFA (-308; -238)</i>	GG		F0-F2 and F0-F3
	AG	F3-F4 and F4	
<i>IL6-174</i>	G:G		F0-F2
	G:A	F3-F4	
<i>IL6nt565</i>	G:A	F3-F4	
<i>IL4RA+1902</i>	A	F3-F4	
	G:G		F0-F3

* $P < 0.05$ when comparing F0-F2 vs F3-F4 and F0-F3 vs F4.

Supplementary material

Values of p , D' and r^2 for linkage disequilibrium between pairs of cytokine gene SNPs in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C.

Polimorphisms	Variants Pairs	p	D'	r^2
<i>TGFB1</i> (cdn10; cdn25)	TG	0.0000	1.0000	0.0735
	CC			
<i>TNFA</i> (-308; -238)	GG	0.1209	1.0000	0.0087
	AA			
<i>IL2</i> (-330; +166)	TT	0.0000	1.0000	0.2145
	GG			
<i>IL4</i> (-1098; -590)	GC	0.0003	0.7708	0.0483
	TT			
<i>IL4</i> (-1098 -33)	GC	0.0001	0.9149	0.0594
	TT			
<i>IL4</i> (-590; -33)	CC	0.0000	1.0000	0.8730
	TT			
<i>IL6</i> (-174; nt565)	GG	0.0000	1.0000	0.9135
	CA			
<i>IL10</i> (-1082; -819)	AT	0.0000	1.0000	0.2779
	GC			
<i>IL10</i> (-1082; -592)	AA	0.0000	1.0000	0.2779
	GC			
<i>IL10</i> (-819; -592)	TA	0.0000	1.0000	1.0000
	CC			

5. CAPÍTULO II

Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms in response to treatment with pegylated interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C

Sara Tatiana Moreira¹, Giovanni Faria Silva², Camila Fernanda Verdichio de Moraes³, Rejane Maria Tomasini Grotto³, Maria Inês de Moura Campos Pardini³, Ricardo Alberto Moliterno¹, Maria da Graça Bicalho⁴

¹Immunogenetics Laboratory, Basic Sciences of Healthy Department, Maringá State University, UEM, Maringá, Paraná, Brazil.

²Gastroenterology Division, Internal Medicine Department, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

³Molecular Biology Laboratory of Blood Transfusion Center, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

⁴Immunogenetics and Histocompatibility Laboratory, Genetics Department, Paraná Federal University, UFPR, Curitiba, Paraná, Brazil

Correspondence to:

Dr. Ricardo Alberto Moliterno

Laboratório de Imunogenética, Departamento de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, PR, Brasil

Tel: 011 4864

Fax: (+55 44) 3011 4931

e-mail: ramoliterno@uem.br

ABSTRACT

The current standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C is based on a combination of conventional or pegylated interferon alpha (pegIFN-alpha) and ribavirin administered for 24 or 48 weeks, respectively. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in regulatory/encoding regions of cytokine genes could influence the treatment response, since they interfere with the expression and secretion of cytokine, which are important factors participating in the immune response against HCV. Therefore, the aim of this study was to determine the genotype of 22 SNPs found in 13 genes for both cytokines and cytokine receptors to assess the influence of polymorphic variants in response to treatment in Brazilian patients chronically infected only with HCV genotype 1. Polymorphic variants at positions *IL10*-819, *IL10*-592, *IL1A*-889, *IL1B*+3962, *IL1R1* pst1 1970 and *IL4RA*+1902 showed association with the treatment response. It was concluded that cytokine and cytokine receptor genes seem to influence the treatment response of chronically infected HCV 1 patients.

Keywords: hepatitis C, interferon-alpha, ribavirin, cytokine, polymorphism

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV), a hepatotropic positive-strand RNA virus that belongs to the *Flaviviridae* family, has become the major cause of liver disease worldwide and a potential cause of substantial morbidity and mortality in the future [1]. Nearly 80% of the infected patients fail to spontaneously clear the virus and progress to chronic hepatitis, a major public health concern worldwide [2]. Chronic HCV disease may cause liver histopathological changes, beginning with an inflammation often associated with fibrosis, which may progress to cirrhosis and, in some cases, to hepatocellular carcinoma [3].

The current standard-of-care (SOC) treatment for chronic hepatitis C is based on a combination of conventional or pegylated interferon alpha (pegIFN-alpha) plus ribavirin given for 24 or 48 weeks, respectively [4-6]. However, the rate of treatment response varies widely among individuals. Efficacy of therapy has been shown to be at least partly related to virological and host genetic determinants. Among virus-related factors, viral genotype seems to be the most important and a predictor of response [7]. In patients infected with HCV genotype 1, the most frequent HCV genotype worldwide, treatment is successful in only 40-50% of cases, versus approximately 80% in patients infected with HCV genotypes 2 and 3 [8]. Among host genetic factors, single nucleotide polymorphisms (SNPs), located in regulatory and encoding regions of cytokine genes could influence the treatment response by interfering with expression and secretion of cytokines, important factors that participate in the immune response against HCV [8-10].

Some allelic variants of SNPs from cytokine genes have been associated with HCV treatment response [11]. Among them, the *IL28B* rs12979860 C:C genotype is associated with a two-fold increase in the sustained virological response (SVR) rate in patients with chronic infection by HCV genotype 1 or 4. This SNP has been recommended as single predictor of treatment response [12, 13]. However, some other studies have yielded contradictory results due to poor study design. Most studies apply heterogeneous HCV genotype samples, with or without concurrent hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV) infections as well as various treatment protocols. So, further research is required to clarify the current role of cytokine genetic variants in the treatment outcome response. Moreover, we found that no studies with this approach were carried out in Brazil. In this context, the objective of this study was to assess the influence of polymorphic variants in cytokine genes and cytokine receptor genes in the treatment response with pegIFN-alpha and ribavirin combined therapy in Brazilian patients chronically infected only with HCV genotype 1. The results may lead to refinements in the pharmacogenomic prediction of antiviral response and will provide alternatives to the use of *IL28B* rs12979860 SNP for predicting response to treatment.

METHODOLOGY

Casuistry

Seven hundred and sixty-one patients infected with HCV were seen and assisted monthly, between September 2004 and January 2009, by a multidisciplinary team at the Gastroenterology

Division of the University Hospital, Botucatu's Medicine School, SP, Brazil. Of these, 136 unrelated patients were carefully selected and included in this study, according to the following criteria: infection only by HCV genotype 1, diagnosis based on the presence of viral RNA confirmed by molecular tests, chronicity characterized by liver biopsy and persistence of viral RNA in serum, liver biopsy performed prior to initiation of antiviral treatment, signing of the consent form. The study excluded patients with factors that compromise the course of hepatitis C and could lead to wrong conclusions: alcohol or drug users during treatment, patients with positive serology for HBV and/or HIV, hemophiliacs or patients with other liver diseases, patients infected on the other viral genotype, patients who did not adhere to treatment protocol. Clinical data were obtained from medical records. The patients were regarded as a mixed ethnic group (excluding Oriental and African ancestry), given that phenotypic evaluations based on physical characteristics such as skin color are not good predictors of genomic African ancestry in Brazilian populations [14]. The study protocol was approved by the Ethics Committee in Human Research of the Medicine School of Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Treatment protocol

Patients were treated with 1.5 µg/kg/week of pegIFN-alpha along with 1000 mg (if the patient's weight is less than 75kg) or 1250mg (if the patient's weight is more than 75kg) of ribavirin for 48 weeks. Patients were followed for more 24 weeks after the end of treatment to confirm the elimination of the virus [15]. Adherence to treatment protocol was monitored by medical records. HCV RNA was performed in the 12th, 24th and 48th week of treatment and later in the 12th and 24th week after the end of treatment. The patients were grouped according to treatment outcome: SVR - patients with sustained virological response (with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment); NRS - non-responsive patients (with detectable viral RNA on the 48th week of treatment), REL - so-called relapser patients (with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment).

Viral genotyping

HCV genotyping was defined through reverse line probe assay technique (INNOLIPA® v.1.0, Innogenetics, Ghent, Belgium), according to manufacturer instructions. This genotyping was preceded by the extraction of total RNA present in patient's plasma, followed by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), using the amplicor HCV test version 2.0 kit (Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, USA).

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from whole blood obtained from an initial volume of 10 mL, collected into tubes containing EDTA. The extraction was performed either through the *Salting-out* technique [16] or *BioPur* commercial kit (Diagnostic Biometrix, Curitiba, PR, Brazil).

Genotyping of polymorphic variants in cytokine genes

The genotyping of polymorphic variants of cytokine genes was performed with 75-125 ng/μl of DNA, by PCR-SSP (polymerase chain reaction with sequence-specific primers) using the *Cytokine Genotyping kit* (DynaL Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA) according to manufacturer's instructions. It were determined the alleles, genotypes and haplotypes for 22 SNPs located in 13 cytokine genes (Table 01). The amplified fragments were separated on 2% agarose gel in a horizontal electrophoresis system. The results interpretation was performed according to standard forms provided by the manufacturer of the *Cytokine Genotyping kit*.

Statistical analysis

The allelic and genotypic frequencies were obtained by direct counting. Haplotype frequencies were estimated based on the genotype frequencies observed, through the likelihood method using the EM algorithm (expectation maximization), which is part of an integrated software package available in the Arlequin version 3.5 [17]. Convert software was used to prepare the input file for the Arlequin package [18].

The comparison of frequencies in each sub-sample was performed by 2x2 contingency tables using the chi-square or Fisher's exact test, when $n \leq 5$ in any cell. Differences were considered statistically significant when $P \leq 0.05$. The association strength was assessed by Odds Ratio (OR) obtained with a confidence interval (CI) of 95% [19]. Haldane correction was employed when $n \leq 5$ in any cell [20]. Statistical analyzes were performed using the Vassar Stats software (<http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>). The parameters of linkage disequilibrium D' and r^2 were performed using the Haploview 4.2 software [21]. Stepwise logistic regression was used to assess associations between treatment response and categorical explanatory variables, such as gender, age and estimated duration of HCV infection. Analysis was conducted using the SPSS 20.0 statistical package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Firstly, non-responsive and relapsers patients were analyzed as a single group (NRS+REL=84 patients) and compared to SVR group ($n=52$). Later on, the three groups were compared separated (NRS vs SVR, REL vs SVR and NRS vs REL), since genetic factors could influence differently the NRS and REL groups. For technical reasons, a few patients had not all their SNPs genotyped.

Demographic and clinical information of patients

Demographic and clinical information of patients are presented in Table 02. According to the treatment outcome, 52 (38.2%) patients presented SVR (with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment), 59 (43.4%) were NRS (with detectable viral RNA on the 48th week of treatment) and 25 (18.4%) were REL (with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment). These percentages are consistent with the epidemiological data, where 40-50% of patients infected with HCV genotype 1 had

SVR [8]. The mean age of the NRS group was higher than for the SVR and REL groups. When the groups were compared to one another, NRS vs SVR (46.2±10.0 years vs 40.6±10.3 years, $P<0.05$) and NRS+REL vs SVR (45.1±10.0 years vs 40.6±10.3 years, $P<0.05$) presented a statistically significant difference. The same trend was observed for the mean duration of infection (NRS vs SVR: 24.7±9.4 years vs 18.9±7.9 years, $P<0.05$ and NRS+REL vs SVR: 23.7±8.4 years vs 18.9±7.9 years, $P<0.05$, respectively). Multivariate logistic regression adjusting for the simultaneous contributions of independent variables (gender, age and estimated duration of HCV infection) indicated that none of them interferes with response to treatment (Table 03).

Allele frequencies

Table 04 shows the polymorphic allelic variants in the assessed cytokine and cytokine receptor genes. When comparing NRS vs REL, it was seen in the REL group a higher frequency of both the *IL1R1/T* allele (25.9% vs 44.0%; $P= 0.0208$; OR= 2.2524; IC= 1.1229 – 4.5180) and the *IL4RA+1902/G* allele (21.2% vs 36.0%; $P= 0.0441$; OR= 2.0925; IC= 1.0115 – 4.3288). There were no statistically significant differences between alleles for the other cytokines or groups.

Genotype frequencies

Genotype frequencies are shown in Table 05. When comparing groups NRS+REL vs SVR, we observed a higher frequency of the *IL1B+3962/T:C* genotype in the SVR group (26.5% vs 45.1%; $P= 0.0268$; OR= 2.2776; IC= 1.0909 – 4.755). When comparing REL vs SVR, the genotypes *IL1A-889/C:C* (76.0% vs 50.0%; $P= 0.0310$; OR= 0.3158; IC= 0.1081 – 0.9227) and *IL1R1/C:T* (72.0% vs 40.4%; $P= 0.0093$; OR= 0.2634; IC= 0.0937 – 0.7408) were more frequent in REL group. In contrast, genotypes *IL1A-889/C:T* (20.0% vs 44.0%; $P= 0.0461$; OR= 3.1429; IC= 1.0174 – 9.7091) and *IL1R1/C:C* (20.0% vs 50.0%; $P= 0.0140$; OR= 4; IC= 1.3042 – 12.2677) were more frequent in the SVR group. Comparisons between NRS vs SVR showed a higher frequency of the genotypes *IL10-819/C:T* and *IL10-592/C:A* in the SVR group (32.8% vs 52.9%; $P= 0.0333$; OR= 2.3092; IC= 1.0622 – 5.0202; identical values for both genotypes). As for the NRS vs REL, genotypes *IL4RA+1902/G:G* (5.1% vs 20.0%; $P= 0.0472$; OR= 4.6667; IC= 1.0209 – 21.331) and *IL1R1/C:T* (37.9% vs 72.0%; $P= 0.0043$; OR= 4.2078; IC= 1.515 – 11.6871) were more frequent in the REL group, while genotype *IL1R1/C:C* had a higher frequency in the NRS group (55.2% vs 20.0%; $P= 0.0038$; OR= 0.2031; IC= 0.0671 – 0.6153).

Haplotype frequencies

Haplotype frequencies are shown in Table 06. There were no statistically significant differences when comparing groups.

The summary of all positive (susceptible) and negative (protective) polymorphic variants are presented on Table 07.

DISCUSSION

The prediction of response to treatment is very useful. Predictors of response include host factors such as gender, age and degree of fibrosis and viral factors such as viral genotypes, viral load and early disappearance of HCV RNA after initiation of therapy [22, 23]. Recently, much research has been directed to the study of genetic polymorphisms and their relationship with different outcomes after the treatment with pegIFN-alpha and ribavirin. Several SNPs allelic variants from cytokine genes have been associated with treatment response [11]. Most studies apply heterogeneous HCV genotype samples, with or without concurrent hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV) infections, and also various treatment protocols. Therefore, further research is required to clarify the current role of genetic variants in the treatment response. The aim of this study was to assess the influence of polymorphic variants in cytokine genes and cytokine receptor genes in the treatment response with pegIFN-alpha and ribavirin combined therapy in Brazilian patients chronically infected only with HCV genotype 1.

The current hepatitis C SOC treatment is based on a combination of conventional or pegylated interferon alpha (pegIFN-alpha) and ribavirin administered for 24 or 48 weeks, respectively [4-6]. Soon after its subcutaneous administration, the alpha-pegIFN binds to receptors present on the surface of various cells, including hepatocytes, activating the transcription factor ISGF3 (IFN-stimulated gene factor 3), which in turn induces the expression of various IFN-stimulated genes (ISG), whose products are responsible for antiviral and immunomodulatory effects of pegIFN-alpha. Besides acting in the ISGs [24], ribavirin is believed to act increasing the rate of viral mutation and/or playing an immunomodulatory role, also preventing relapses in the combined treatment [8, 25].

Considering that the medication interferes directly in gene regulation, a differentiated gene expression between patient groups could explain the variation in the treatment response. However, it seems that nonresponders and sustained virological responders have different gene expression profiles prior to treatment. A higher expression of ISGs by endogenous IFN has been reported in nonresponders (nonresponders + relapsers) before the start of induced-treatment [25-27]. Maybe ISGs are already maximally induced in nonresponders, thus, pre-activation of the IFN system in these patients appears to limit the antiviral effect of IFN therapy. It is important to note that pre-activation of ISGs was not observed in the PBMCs from patients, indicating that baseline ISG preactivation in nonresponders is specific to the liver [24], although some authors have not confirmed this observation [28, 29]. Many of the genes found to be upregulated differentially between non-responders and responders encode cytokines [26, 30] and are excellent candidate genes in search of genetic markers as predictors of response to treatment.

The literature presents conflicting results regarding the association between polymorphic variants of *IL10* and response to treatment. Yee et al., when studying a British population, observed the alleles *IL10*-592/A and -819/T, the genotypes -819/T:T and -592/A:A and the ATA haplotype (-1082; -819; -592) associated to SVR [31]. The same association was observed by Edward-Smith et al. for alleles and haplotype in an Australian population [32]. Knapp et al., when studying an European population infected by various viral genotypes [33] observed an association between the genotype -

1082/G:G and the haplotype GCC and SVR. Morgan et al. found an association between the diplotype ACC/ACC and SVR in a North-American population infected with HCV genotype 1 [34]. However, other authors found no associations when studying different populations [35-39]. The present study found an association between the genotypes *IL10*-819/C:T and *IL10*-592/C:A with SVR. The conflict between the results may be a reflection of several factors such as sample size, sample heterogeneity, differences between the parameters of analysis, genetic heterogeneity due to population mixing, different gene-gene and gene-environment interaction. The small sample size can be found in the study of Edward-Smith et al. [32]. The grouping of NRS with REL in a same group was reported in all the above mentioned studies but Knapp et al. [33], which in turn worked with patients infected by different viral genotypes.

Three SNPs located in the promoter region of the *IL10* gene, -1082G>A, -819C>T and -592C>A [40, 41] seem to be associated to different levels of gene expression, since they possibly alter specific recognition sites for transcription factors, thus affecting the levels of cytokine production [32, 42]. The alleles -1082/G, -819/C and -592/C could be associated with high production of IL-10, while their respective alleles would be related to the low production [42, 43]. Lower levels of IL-10 were observed in individuals with the -592/C:A or -592/A:A genotype [44]. Although the present study shows a higher frequency of the genotypes -819/C:T and -592/C:A for the SVR group, both positions are in absolute linkage disequilibrium (supplementary material) and there is more evidence of functionality to the *IL10*-592 position [44, 45]. Therefore, we believe that the SVR would be associated to the low levels of IL-10 produced by patients with the genotype -592/C:A.

As a potent immune modulator, interleukin-10 may exert a profound impact on the overall therapeutic outcome. IL-10 is a potent anti-inflammatory Th2 cytokine mainly produced by monocytes, macrophages and T cells, that down-regulates the expression of the major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules as well as the production of Th1 cytokines [46] and consequently leads to a weaker T CD8 response [47]. High plasma and liver levels of this cytokine have been observed in individuals chronically infected with HCV, being a negative prognostic marker of response to hepatitis C treatment [48-51]. Patients with high levels of IL-10 are less favorable to develop SVR after treatment [49, 52-54], whereas low levels are associated with SVR [55]. Also, non-responder individuals have high production of IL-10 by their peripheral blood dendritic cells [56]. The mechanism by which IL-10 limits the IFN effects are likely to involve the inhibition of IFN-activated STAT1 in the liver [57]. Evidence suggests that ribavirin itself decreases the IL-10 levels, polarizing the immune response to Th1, allowing the action of IFN and the consequent attainment of an SVR [10, 53, 58].

The presence of genotypes related to poor production of IL-10 possibly results in an insufficient liver concentration of this cytokine to polarize the immune response towards Th2, thus resulting in viral clearance due to a Th1 response [59, 60]. Generally, patients who successfully clear the virus (either spontaneously or after treatment) also express strong Th1 responses and increased IFN- γ production in response to HCV antigens [61, 62]. Although not all studies favor such effects of *IL10* polymorphisms, it is worth noticing that many of them present heterogeneous sample of patients. This is the case of Knapp et al. [33], who observed an association between SVR and the genotype -

1082/G:G and haplotype GCC, which might be expected to have the highest production of IL-10, when working with a sample of individuals infected with different viral genotypes.

Interleukin-1 is an important cytokine for the generation of an inflammatory response and, therefore, of interest in studies on hepatitis C. The IL-1 gene family consists of, among others, the following members: *IL1A* e *IL1B* genes, which encode two antagonists of interleukin-1, IL-1 α and IL-1 β ; the *IL1RN* gene, which encodes the receptor antagonist to IL-1 (IL-1Ra) and the *IL1R1* gene, which encodes the receptor type I of IL-1 (IL-1R1). IL-1 α and IL-1 β are important inducers of inflammation, whereas the binding of IL-1Ra to the IL-1R1 receptor does not induce the target cell activation, thus acting as an antagonist [63]. There are several functional polymorphisms in these genes: there are at least three polymorphisms in the *IL1B* gene, one at position -511C>T, the other at -31T>C and another at +3962C>T [64, 65]; the polymorphism at -889C>T [65] was described in the *IL1A*; the polymorphism mspa1 11100C>T [65] was described in *IL1RN* gene; and the polymorphism pst1 1970C>T [66] in *IL1R1*. The often confusing polymorphism nomenclature can differ widely between authors; this is the case of the SNP *IL1B*+3962, also known as +3953 [35] or +3954 [67] by some authors, but in all cases the dbSNP number is rs1143634 [68].

It seems that the relationship between polymorphisms of the IL-1 gene family and hepatocellular carcinoma in Japanese patients chronically infected with HCV is becoming well established. In this population, genotypes *IL1B*-31/T:T and -511/T:T and the haplotype -511;-31/CT were associated to the progression of chronic hepatitis C into hepatocellular carcinoma [69-71]. On the other hand, the relationship between polymorphisms of the IL-1 gene family and spontaneous viral clearance does not seem to be well established so far, although there are a few studies addressing this topic. Minton et al. [72] found no association between the SNPs *IL1B*-511 and +3954 and spontaneous viral clearance. Ksiaa Cheikhrouhou et al. [67] also found no association between the *IL1A*-889, *IL1B*-511, +3954 SNPs and spontaneous viral clearance. In contrast, the genotype *IL1B*-511/T:T was associated with a higher susceptibility to the development of chronic hepatitis C in a German population [73].

Only two studies examined the relationship between the *IL1* genetic polymorphisms and response to treatment. Constantini et al. [35], studying the frequency of SNPs *IL1A*-889 and *IL1B*+3953 in Polish patients, and Abbas et al. [37], studying the SNP *IL1B*-511 in Pakistan, found no association between allelic variants and response to treatment. However, it is worth mentioning that the patients enrolled in the study by Constantini et al. [35] were infected with different viral genotypes, while those who participated in the study of Abbas et al. [37] were infected with viral genotype 3; also, in both cases the patients were stratified into two groups only, responders and non-responders. This study enrolled only individuals infected with HCV genotype 1 virus, who were stratified into three groups, since there are not only responders and non-responders individuals, but also the relapsers. Also, we observed that there are differences between these groups.

We observed that the genotype *IL1A*-889/C:C is associated with relapse after treatment with pegIFN-alpha and ribavirin, since it was more frequent in the REL group when compared to SVR and NRS, the latter with *P* value near of significance. The genotype *IL1A*-889/C:T was more frequent in the SVR group, being associated with a good response to treatment. When comparing allele frequencies

between REL vs SVR and REL vs NRS it was also observed a higher frequency of the allele *IL1A*-889/C in the REL group and of the allele *IL1A*-889/T in the SVR and NRS groups, with *P* close to significance. Studies have shown that the allele -889/T up-regulates transcription of the gene and therefore increases plasma levels of IL-1 α [74] and also IL-1 β [75], once *IL1A* and *IL1B* polymorphisms may be in linkage disequilibrium [76]. The -889/T:T genotype would be responsible for slightly higher mRNA levels compared to the CC or CT genotype [74]. Both genotypes, the one associated to REL (*IL1A*-889/C:C) and the one associated with SVR (*IL1A*-889/C:T) would cause higher production of IL-1 α , which would not explain the different outcomes. However, Kawaguchi et al. [77] recently observed that there were no statistically significant differences in expression resulting from this SNP. They demonstrated that -889C>T is acting as a marker for +4845G>T, because they are in strong linkage disequilibrium in all the examined populations (except African-Americans) where carriers of the +4845/T allele exhibit high efficiency processing pre-IL-1 α , facilitating the cellular release of IL-1 α .

We also found a statistically higher frequency of the *IL1B*+3962/T:C genotype in the SVR group when compared to NRS+REL. The same trend was observed when comparing SVR with NRS and REL separately, with *P* value close to significance in both cases. Despite innumerable association studies, many implicating this SNP with disease, there has been little evidence of functionality. It is possible that this SNP is simply acting as a marker for a functional SNP [68]. On the other hand, it has been shown that homozygous individual for the T allele produce a fourfold higher amount of IL-1 β compared to individuals displaying the C:C genotype. The genotype +3962/T:C, associated to the SVR in this study, is related to low production of IL-1 β [64, 78]. There is evidence that IL-1 β inhibits the IFN- $\alpha\beta$ antiviral activity in liver cells both, *in vitro* and *in vivo*. Attenuation of IFN- $\alpha\beta$ signaling in the liver by IL-1 β could be one of the mechanisms underlying the resistance to IFN therapy [79]. Thus, high levels of IL-1 β would be associated to the resistance to treatment, while lower levels would be associated to a good response.

The expression of IL-1R was shown to be increased in inflamed tissue *in vitro* [80] and the *IL1R1* pst1 1970/C allele was demonstrated to be associated with inflammatory diseases [81, 82]. However, no studies were found assessing the relationship between this polymorphism and treatment response in hepatitis C. In this study, the *IL1R1* pst1 1970/T allele was more frequent in the REL group when comparing REL vs NRS. The same trend was observed when comparing REL vs. SVR, but with no statistical significance. The genotype *IL1R1* pst1 1970/C:T was more frequent in the REL group when comparing REL vs SVR and REL vs NRS. The genotype *IL1R1* pst1 1970/C:C was less frequent in the REL group when comparing these groups. There are indications that this SNP did not affect any known transcription factor recognition sequence or the predicted secondary mRNA structure [66], therefore, the biological role for the associations obtained remained unknown.

The IL-4 receptor (IL4R) is composed of two subunits, the α , which binds with high affinity to the ligand, and the γ , common to other cytokine receptors, which amplifies the signal from the α -subunit [83, 84]. The α -subunit is also part of the receptor of IL-13 together with the IL-13 binding protein, IL13R α 1 [68]. The α subunit is encoded by the *IL4RA* gene, located in 16p12.1. Among the polymorphisms described for this gene is the -1902G>A [85], resulting in change of glutamine for

arginine at position 576 of the peptide (often referred to as position 551 if the signal peptide is not included in counting). Although a recent study of systemic sclerosis showed that this polymorphism does not influence gene expression [86], other studies have demonstrated that this change interferes with intracellular signaling [84, 87], due to its location in the peptide intracellular domain, and that the *IL4RA*+1902/G allele is associated with enhanced signaling of the receptor [88] and, consequently, enhance expression of *IL4* and *IL13* regulated genes, since it presents IL-4 and IL-13 as ligand [89].

This study observed that the allele *IL4RA*+1902/G was more frequent in the REL group when comparing to NRS and SVR, but without statistical significance in the second case. Similarly, the *IL4RA*+1902/G:G genotype is more frequent in the REL compared NRS. Avdoshina et al. [90] observed a higher frequency of the +1902/G:G genotype in patients infected with HCV compared to healthy volunteers. However, there seems to have been no previous studies assessing the relationship between the position +1902 and the treatment response in individuals chronically infected with HCV. We believe that the +1902/G allele as well as the +1902/G:G genotype are relapse markers after treatment with pegIFN α and ribavirin, possibly because it increases the signaling of IL-4R or IL-13R receptors, leading to the activation of an anti-inflammatory response. This anti-inflammatory response could inhibit the action of IFN- α treatment. However, the biological mechanism triggered by this process and its relation to relapse remains unknown. Moreover, considering that the +1902 is in linkage disequilibrium with the positions 375, 406, 478 (E375A, C406R, S478P) [91] further investigations are necessary.

CONCLUSION

This paper presents as a peculiar characteristic the careful selection of patients, to form a homogeneous sample group in terms of HCV genotype and absence of viral co-infections. Furthermore, the individuals were followed-up during and after treatment. These efforts may have more clearly characterized the host's genetic interfering factors in therapeutic response outcome. Our results showed that polymorphic variants for positions *IL10*-819, *IL10*-592, *IL1A*-889, *IL1B*+3962, *IL1R1* pst1 1970 and *IL4RA*+1902 are associated with response to treatment with pegIFN α and ribavirin in patients chronically infected with HCV genotype 1. Some of our data confirmed the results of previous studies conducted in other populations, while others were novel and require replication to confirm. The results may contribute to the future establishment of genetic markers of treatment response beyond the current gold standard *IL28B* rs12979860, which will help guide therapeutic decisions in patients with chronic hepatitis C infected with HCV genotype 1. Considering side effects and treatment cost [92], prediction of treatment response before therapy is desirable.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the individuals who donated blood samples and made this work possible. We would also like to thank our lab and PhD colleagues for their help in several tasks. This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

ROLE OF THE FUNDING SOURCE

The funding sources had no role in the study design, collection, analysis and interpretation of the data, in the writing or decision to submit the paper for publication.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Shepard, C.W., L. Finelli, and M.J. Alter, *Global epidemiology of hepatitis C virus infection*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(9): p. 558-67.
2. Lauer, G.M. and B.D. Walker, *Hepatitis C virus infection*. N Engl J Med, 2001. **345**(1): p. 41-52.
3. Thomas, D.L. and L.B. Seeff, *Natural history of hepatitis C*. Clin Liver Dis, 2005. **9**(3): p. 383-98, vi.
4. Ghany, M.G., et al., *Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update*. Hepatology, 2009. **49**(4): p. 1335-74.
5. Gotto, J. and G.M. Dusheiko, *Hepatitis C and treatment with pegylated interferon and ribavirin*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(10): p. 1874-7.
6. Hadziyannis, S.J., et al., *Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose*. Ann Intern Med, 2004. **140**(5): p. 346-55.
7. Alberti, A. and L. Benvegnu, *Management of hepatitis C*. J Hepatol, 2003. **38 Suppl 1**: p. S104-18.
8. Chevaliez, S. and T. Asselah, *Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2011. **35 Suppl 1**: p. S31-41.
9. Perrey, C., et al., *Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report*. Transpl Immunol, 1998. **6**(3): p. 193-7.
10. Tambur, A.R., et al., *Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients*. Transplantation, 2001. **71**(10): p. 1475-80.
11. Romero-Gomez, M., et al., *Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment*. Liver Int, 2011. **31**(4): p. 443-60.
12. Suppiah, V., et al., *IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy*. Nat Genet, 2009. **41**(10): p. 1100-4.
13. Tanaka, Y., et al., *Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C*. Nat Genet, 2009. **41**(10): p. 1105-9.
14. Parra, F.C., et al., *Color and genomic ancestry in Brazilians*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 177-82.
15. de Araujo, E.S., et al., *Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C*. Braz J Infect Dis, 2007. **11**(5): p. 446-50.
16. Lahiri, D.K. and J.I. Nurnberger, Jr., *A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(19): p. 5444.
17. Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. Evol Bioinform Online, 2005. **1**: p. 47-50.
18. Glaubitz, J.C., *CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages*. Molecular Ecology Notes, 2004(4): p. 309-310.
19. Woolf, B., *On estimating the relation between blood group and disease*. Ann Hum Genet, 1955. **19**(4): p. 251-3.
20. Svejgaard, A. and L.P. Ryder, *HLA and disease associations: detecting the strongest association*. Tissue Antigens, 1994. **43**(1): p. 18-27.
21. Barrett, J.C., et al., *Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps*. Bioinformatics, 2005. **21**(2): p. 263-5.
22. Poynard, T., et al., *Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection*

- with hepatitis C virus. *International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT)*. *Lancet*, 1998. **352**(9138): p. 1426-32.
23. Brouwer, J.T., et al., *Early prediction of response in interferon monotherapy and in interferon-ribavirin combination therapy for chronic hepatitis C: HCV RNA at 4 weeks versus ALT*. *J Hepatol*, 1999. **30**(2): p. 192-8.
 24. Tokumoto, Y., et al., *Ribavirin regulates hepatitis C virus replication through enhancing interferon-stimulated genes and interleukin 8*. *J Infect Dis*, 2012. **205**(7): p. 1121-30.
 25. Tai, A.W. and R.T. Chung, *Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response*. *J Hepatol*, 2009. **50**(2): p. 412-20.
 26. Neuman, M.G., et al., *Kinetics of serum cytokines reflect changes in the severity of chronic hepatitis C presenting minimal fibrosis*. *J Viral Hepat*, 2002. **9**(2): p. 134-40.
 27. Younossi, Z.M., et al., *Early gene expression profiles of patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon-alfa and ribavirin*. *Hepatology*, 2009. **49**(3): p. 763-74.
 28. Gerotto, M., et al., *PKR gene expression and response to pegylated interferon plus ribavirin therapy in chronic hepatitis C*. *Antivir Ther*, 2004. **9**(5): p. 763-70.
 29. Taylor, M.W., et al., *Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy*. *J Virol*, 2007. **81**(7): p. 3391-401.
 30. Ji, X., et al., *Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2003. **37**(3): p. 610-21.
 31. Yee, L.J., et al., *Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection*. *Genes Immun*, 2000. **1**(6): p. 386-90.
 32. Powell, E.E., et al., *Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C*. *Hepatology*, 2000. **31**(4): p. 828-33.
 33. Knapp, S., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection*. *Immunogenetics*, 2003. **55**(6): p. 362-9.
 34. Morgan, T.R., et al., *DNA polymorphisms and response to treatment in patients with chronic hepatitis C: results from the HALT-C trial*. *J Hepatol*, 2008. **49**(4): p. 548-56.
 35. Constantini, P.K., et al., *Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy*. *Liver*, 2002. **22**(5): p. 404-12.
 36. Vidigal, P.G., J.J. Germer, and N.N. Zein, *Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin*. *J Hepatol*, 2002. **36**(2): p. 271-7.
 37. Abbas, Z., et al., *Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3*. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(42): p. 6656-61.
 38. Chuang, J.Y., et al., *IL-10 promoter gene polymorphisms and sustained response to combination therapy in Taiwanese chronic hepatitis C patients*. *Dig Liver Dis*, 2009. **41**(6): p. 424-30.
 39. Abbas, O.M., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms in hepatitis C patients with and without Schistosoma mansoni co-infection*. *Liver Int*, 2009. **29**(9): p. 1422-30.
 40. Shin, H.D., et al., *Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14467-72.
 41. Alamartine, E., et al., *Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(1): p. 99-103.
 42. Turner, D.M., et al., *An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter*. *Eur J Immunogenet*, 1997. **24**(1): p. 1-8.
 43. Rosenwasser, L.J. and L. Borish, *Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10)*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. **156**(4 Pt 2): p. S152-5.
 44. Claudino, M., et al., *The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome*. *J Leukoc Biol*, 2008. **84**(6): p. 1565-73.
 45. Steinke, J.W., et al., *Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by sp1*. *J Immunol*, 2004. **173**(5): p. 3215-22.
 46. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 683-765.

47. Thursz, M., L. Yee, and S. Khakoo, *Understanding the host genetics of chronic hepatitis B and C*. Semin Liver Dis, 2011. **31**(2): p. 115-27.
48. Cacciarelli, T.V., et al., *Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa*. Hepatology, 1996. **24**(1): p. 6-9.
49. Marin-Serrano, E., et al., *Modulation of the anti-inflammatory interleukin 10 and of proapoptotic IL-18 in patients with chronic hepatitis C treated with interferon alpha and ribavirin*. J Viral Hepat, 2006. **13**(4): p. 230-4.
50. Kakumu, S., et al., *Production of interleukins 10 and 12 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in chronic hepatitis C virus (HCV) infection*. Clin Exp Immunol, 1997. **108**(1): p. 138-43.
51. Piazzolla, G., et al., *Relationship between interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-12 production in chronic hepatitis C and in vitro effects of interferon-alpha*. J Clin Immunol, 2000. **20**(1): p. 54-61.
52. Kuzushita, N., et al., *High levels of serum interleukin-10 are associated with a poor response to interferon treatment in patients with chronic hepatitis C*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(2): p. 169-74.
53. Cramp, M.E., et al., *Hepatitis C virus-specific T-cell reactivity during interferon and ribavirin treatment in chronic hepatitis C*. Gastroenterology, 2000. **118**(2): p. 346-55.
54. Wan, L., et al., *Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **379**(4): p. 855-60.
55. Mirodzhov, G.K., R.I. Odinaev, and M.I. Sattarova, *[Cytokines in chronic hepatitis C]*. Klin Med (Mosk), 2009. **87**(2): p. 13-7.
56. Liang, C.C., et al., *Functional impairment of dendritic cells in patients infected with hepatitis C virus genotype 1 who failed peginterferon plus ribavirin therapy*. J Med Virol, 2011. **83**(7): p. 1212-20.
57. Shen, X., et al., *IL-10 attenuates IFN-alpha-activated STAT1 in the liver: involvement of SOCS2 and SOCS3*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 132-6.
58. Rigopoulou, E.I., et al., *Direct evidence for immunomodulatory properties of ribavirin on T-cell reactivity to hepatitis C virus*. Antiviral Res, 2007. **75**(1): p. 36-42.
59. Oriss, T.B., et al., *Crossregulation between T helper cell (Th)1 and Th2: inhibition of Th2 proliferation by IFN-gamma involves interference with IL-1*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3666-72.
60. Bertoletti, A., et al., *Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections*. Gastroenterology, 1997. **112**(1): p. 193-9.
61. Lasarte, J.J., et al., *Cellular immunity to hepatitis C virus core protein and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C*. Hepatology, 1998. **28**(3): p. 815-22.
62. Ferrari, C., et al., *T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections*. Hepatology, 1994. **19**(2): p. 286-95.
63. Dinarello, C.A., *Biologic basis for interleukin-1 in disease*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2095-147.
64. Wilson, A.G., et al., *An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 557-60.
65. Tseng, L.H., et al., *Simultaneous genotyping of single nucleotide polymorphisms in the IL-1 gene complex by multiplex polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*. J Immunol Methods, 2002. **267**(2): p. 151-6.
66. Bergholdt, R., et al., *Characterization of polymorphisms of an interleukin 1 receptor type 1 gene (IL1RI) promotor region (P2) and their relation to insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). The Danish Study Group of Diabetes in Childhood*. Cytokine, 1995. **7**(7): p. 727-33.
67. 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.
68. Smith, A.J. and S.E. Humphries, *Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(1): p. 43-59.
69. Tanaka, Y., et al., *Impact of interleukin-1beta genetic polymorphisms on the development of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Japan*. J Infect Dis, 2003. **187**(11): p. 1822-5.
70. Yu, M.L., et al., *Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha*. Antiviral Res, 2003. **59**(1): p. 35-40.
71. Okamoto, K., et al., *The genotypes of IL-1 beta and MMP-3 are associated with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma*. Intern Med, 2010. **49**(10): p. 887-95.

72. Minton, E.J., et al., *Clearance of hepatitis C virus is not associated with single nucleotide polymorphisms in the IL-1, -6, or -10 genes*. Hum Immunol, 2005. **66**(2): p. 127-32.
73. Bahr, M.J., et al., *Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C*. Liver Int, 2003. **23**(6): p. 420-5.
74. Dominici, R., et al., *Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha*. Immunogenetics, 2002. **54**(2): p. 82-6.
75. Hulkkonen, J., P. Laippala, and M. Hurme, *A rare allele combination of the interleukin-1 gene complex is associated with high interleukin-1 beta plasma levels in healthy individuals*. Eur Cytokine Netw, 2000. **11**(2): p. 251-5.
76. Gore, E.A., et al., *Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis*. J Clin Periodontol, 1998. **25**(10): p. 781-5.
77. Kawaguchi, Y., et al., *Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity*. Immunogenetics, 2007. **59**(6): p. 441-8.
78. Hall, S.K., et al., *Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1976-83.
79. Tian, Z., et al., *IL-1 beta attenuates IFN-alpha beta-induced antiviral activity and STAT1 activation in the liver: involvement of proteasome-dependent pathway*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3959-65.
80. Kanda-Nakamura, C., Y. Izumi, and T. Sueda, *Increased expression of interleukin-1 receptors on fibroblasts derived from inflamed gingiva*. J Periodontol, 1996. **67**(12): p. 1267-73.
81. Sarial, S., et al., *IL-1, IL-1R and TNFalpha gene polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2008. **7**(1): p. 37-40.
82. Barkhordari, E., et al., *Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome*. J Clin Immunol, 2010. **30**(1): p. 74-9.
83. Izuhara, K. and T. Shirakawa, *Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy*. Int J Mol Med, 1999. **3**(1): p. 3-10.
84. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 701-38.
85. Caggana, M., et al., *Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups*. Genet Med, 1999. **1**(6): p. 267-71.
86. Broen, J.C., et al., *Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 13, and corresponding receptor genes are not associated with systemic sclerosis and do not influence gene expression*. J Rheumatol, 2012. **39**(1): p. 112-8.
87. Mitsuyasu, H., et al., *Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma*. Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 119-20.
88. Hershey, G.K., et al., *The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor*. N Engl J Med, 1997. **337**(24): p. 1720-5.
89. Kelly-Welch, A.E., et al., *Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1527-8.
90. Avdoshina, V.V., et al., *[Alleles distribution of polymorphic promoter region C-590T in interleukin-4 genes and Q-576r and Ile-50Val regions in IL-4 receptor gene IL-4RA in patients with HCV-infection]*. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol, 2007(1): p. 43-6.
91. Migliaccio, C., et al., *No linkage or association of five polymorphisms in the interleukin-4 receptor alpha gene with atopic asthma in Italian families*. Eur J Immunogenet, 2003. **30**(5): p. 349-53.
92. Ferguson, M.C., *Current therapies for chronic hepatitis C*. Pharmacotherapy, 2011. **31**(1): p. 92-111.

Table 01. List of the investigated cytokine SNPs.

Cytokine gene	Gene chromosome location	SNP designation in the kit	dbSNP-ID	SNP chromosome position (reference)	Location
<i>IL1A</i>	2q14	-889C>T	rs1800587	113259431	5'-UTR
<i>IL1B</i>	2q14	-511T>C	rs16944	113311338	Promoter
		+3962C>T	rs1143634	113306861	Coding/synonymous
<i>IL1R1</i>	2q12	pst1 1970C>T	rs2234650	102124759	Distal promoter
<i>IL1RN</i>	2q14.2	mspa1 11100C>T	rs315952	113606775	Coding/synonymous
<i>IL4RA</i>	16p12.1–p11.2	+1902G>A	rs1801275	27281901	Coding/missense
<i>IL12B</i>	5q31.1–33.1	-1188A>C	rs3212227	158675528	3'-UTR
<i>IFNG</i>	12q14	+874T>A	rs2430561	66838787	Intron
<i>TGFB1</i>	19q13.1	codon 10C>T	rs1800470	46550761	Coding/missense
		codon 25G>C	rs1800471	46550716	Coding/missense
<i>TNF</i>	6p21.3	-308G>A	rs1800629	31651010	Promoter
		-238G>A	rs361525	31651080	Promoter
<i>IL2</i>	4q26-27	-330T>G	rs2069762	123597430	Promoter
		+166G>T	rs2069763	123596932	Coding/synonymous
<i>IL4</i>	5q31.1	-1098T>G	rs2243248	132036543	Promoter
		-590C>T	rs2243250	132037053	Promoter
		-33T>C	rs2070874	132037609	5'-UTR
<i>IL6</i>	7p21	-174G>C	rs1800795	22733170	Promoter
		nt565G>A	rs1800797	22732746	Promoter
<i>IL10</i>	1q31–q32	-1082A>G	rs1800896	205013520	Promoter
		-819C>T	rs1800871	205013257	Promoter
		-592C>A	rs1800872	205013030	Promoter

Table 02. Demographic and clinical information of patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C classified according their response to treatment with pegIFN α and ribavirin.

Characteristics	Patients	SVR	NRS	REL
	(n=136)	(n=52)	(n=59)	(n=25)
Age (years, mean \pm SD)*	43.4 \pm 10.3	40.6 \pm 10.3	46.2 \pm 10.0	42.7 \pm 9.7
Gender n (%)				
Male	105 (77.2)	39 (75.0)	46 (78.0)	20 (80.0)
Female	31 (22.8)	13 (25.0)	13 (22.0)	5 (20.0)
Duration of infection (years, mean \pm SD)* [†]	21.8 \pm 8.5	18.9 \pm 7.9	24.7 \pm 9.4	21.6 \pm 5.5

* $P < 0,05$ when comparing NRS vs SVR and NRS+REL vs SVR.

[†]Duration of infection was calculated only for 85 patients (SVR=34, NRS=34, REL=17). The duration of infection for 51 patients is unknown.

SVR: patients with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment;

NRS: patients with detectable viral RNA on the 48th week of treatment;

REL: patients with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment.

Table 03. Multivariate analysis of predictors of response to treatment among patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C classified according their response to treatment with pegIFN α and ribavirin.

Response variable	Independent variable	Coefficient	P	OR
NRS and SVR	Gender	1.315	0.065	3.724
	Age	-0.034	0.263	0.966
	Duration of infection	-0.078	0.056	0.925
REC and SVR	Gender	0.685	0.375	1.984
	Age	-0.039	0.311	0.962
	Duration of infection	-0.04	0.411	0.961
NRS and REC	Gender	0.589	0.491	1.803
	Age	-0.015	0.685	0.985
	Duration of infection	-0.049	0.276	0.952
NRS+REL and SVR	Gender	1.108	0.068	3.027
	Age	-0.042	0.137	0.958
	Duration of infection	-0.069	0.065	0.933

Gender: male/female, Age: years, Duration of infection: years.

SVR: patients with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment;

NRS: patients with detectable viral RNA on the 48th week of treatment;

REL: patients with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment.

Table 04. Distribution of allelic frequencies of polymorphisms in cytokines genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according to their response to treatment with pegIFN and ribavirin.

Polymorphism	Alleles	SVR (n=52)		NRS (n= 59)		REL (n= 25)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
<i>IL1A-889</i>	C	72	(72.0)	81	(72.3)	43	(86.0)
	T	28	(28.0)	31	(27.7)	7	(14.0)
<i>IL1B-511</i>	C	68	(68.0)	73	(62.9)	26	(52.0)
	T	32	(32.0)	43	(37.1)	24	(48.0)
<i>IL1B+3962</i>	C	77	(75.5)	94	(81.0)	42	(84.0)
	T	25	(24.5)	22	(19.0)	8	(16.0)
<i>IL1R1 pst1 1970</i>	T ^a	31	(29.8)	30	(25.9)	22	(44.0)
	C	73	(70.2)	86	(74.1)	28	(56.0)
<i>IL1RA mspa1 11100</i>	T	75	(72.1)	88	(74.6)	39	(78.0)
	C	29	(27.3)	30	(25.4)	11	(22.0)
<i>IL4RA+1902</i>	A	77	(74.0)	93	(78.8)	32	(64.0)
	G ^b	27	(26.0)	25	(21.2)	18	(36.0)
<i>IL12B-1188</i>	A	78	(78.0)	79	(69.3)	34	(73.9)
	C	22	(22.0)	35	(30.7)	12	(26.1)
<i>IFNG+874</i>	A	53	(53.0)	62	(52.5)	28	(56.0)
	T	47	(47.0)	56	(47.5)	22	(44.0)
<i>TGFB1 cdn10</i>	C	47	(46.1)	52	(44.1)	29	(58.0)
	T	55	(53.9)	66	(55.9)	21	(42.0)
<i>TGFB1 cdn25</i>	C	8	(7.8)	5	(4.2)	4	(8.0)
	G	94	(92.2)	113	(95.8)	46	(92.0)
<i>TNFA-308</i>	G	90	(88.2)	98	(84.5)	44	(88.0)
	A	12	(11.8)	18	(15.5)	6	(12.0)
<i>TNFA-238</i>	G	99	(97.1)	109	(94.0)	46	(92.0)
	A	3	(2.9)	7	(6.0)	4	(8.0)
<i>IL2-330</i>	G	29	(27.9)	35	(29.7)	16	(34.8)
	T	75	(72.1)	83	(70.3)	30	(65.2)
<i>IL2+166</i>	G	69	(66.4)	75	(63.6)	33	(71.7)
	T	35	(33.7)	43	(36.4)	13	(28.3)
<i>IL4-1098</i>	T	75	(73.5)	91	(81.3)	35	(79.6)
	G	27	(26.5)	21	(18.7)	9	(20.5)
<i>IL4-590</i>	C	79	(77.5)	83	(74.1)	39	(88.6)
	T	23	(22.5)	29	(25.9)	5	(11.4)
<i>IL4-33</i>	T	22	(21.6)	25	(22.3)	4	(9.1)
	C	80	(78.4)	87	(77.7)	40	(90.9)
<i>IL6-174</i>	G	75	(73.5)	77	(66.4)	37	(77.1)
	C	27	(26.5)	39	(33.6)	11	(22.9)
<i>IL6nt565</i>	G	77	(75.5)	80	(69.0)	37	(77.1)
	A	25	(24.5)	36	(31.0)	11	(22.9)
<i>IL10-1082</i>	G	42	(41.2)	44	(37.9)	20	(40.0)
	A	60	(58.8)	72	(62.1)	30	(60.0)
<i>IL10-819</i>	C	71	(69.6)	81	(69.8)	35	(70.0)
	T	31	(30.4)	35	(30.2)	15	(30.0)
<i>IL10-592</i>	C	71	(69.6)	81	(69.8)	35	(70.0)
	A	31	(30.4)	35	(30.2)	15	(30.0)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed. So N is variable depending on the SNP.

P obtained through Chi-square test or Fisher's test.

n= number of occurrences o allele; F%= relative frequency of the alleles.

SVR: patients with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment;
NRS: patients with detectable viral RNA on the 48th week of treatment;
REL: patients with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment.

^a NRS vs REL: 30 (25.9%) vs 22 (44.0%) $P= 0.0208$ OR= 2.2524 IC= 1.1229 – 4.5180

^b NRS vs REL: 25 (21.2%) vs 18 (36.0%) $P= 0.0441$ OR= 2.0925 IC= 1.0115 – 4.3288

Table 05. Distribution of genotype frequencies of polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according their response to treatment with pegIFN and ribavirin.

Polymorphism	Genotypes	SVR (n=52)		NRS (n= 59)		REL (n= 25)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
IL1A-889	C:C^a	25	(50.0)	30	(53.6)	19	(76.0)
	C:T^b	22	(44.0)	21	(37.5)	5	(20.0)
	T:T	3	(6.0)	5	(8.9)	1	(4.0)
IL1B-511	C:C	23	(46.0)	25	(43.1)	6	(24.0)
	C:T	22	(44.0)	23	(39.7)	14	(56.0)
	T:T	5	(10.0)	10	(17.2)	5	(20.0)
IL1B+3962	C:C	27	(52.9)	39	(67.2)	18	(72.0)
	T:C^c	23	(45.1)	16	(27.6)	6	(24.0)
	T:T	1	(2.0)	3	(5.2)	1	(4.0)
IL1R1 pst1 1970	T:T	5	(9.6)	4	(6.9)	2	(8.0)
	C:T^d	21	(40.4)	22	(37.9)	18	(72.0)
	C:C^e	26	(50.0)	32	(55.2)	5	(20.0)
IL1RA mspa1 11100	T:T	27	(51.9)	33	(55.9)	15	(60.0)
	T:C	21	(40.4)	22	(37.3)	9	(36.0)
	C:C	4	(7.7)	4	(6.8)	1	(4.0)
IL4RA+1902	A:A	33	(63.5)	37	(62.7)	12	(48.0)
	G:A	11	(21.2)	19	(32.2)	8	(32.0)
	G:G^f	8	(15.4)	3	(5.1)	5	(20.0)
IL12B-1188	A:A	29	(58.0)	29	(50.9)	11	(47.8)
	C:A	20	(40.0)	21	(36.8)	12	(52.2)
	C:C	1	(2.0)	7	(12.3)	0	(0.0)
IFNG+874	A:A	13	(26.0)	16	(27.1)	9	(36.0)
	A:T	27	(54.0)	30	(50.9)	10	(40.0)
	T:T	10	(20.0)	13	(22.0)	6	(24.0)
TGFB1 cdn10	C:C	12	(23.5)	11	(18.6)	9	(36.0)
	C:T	23	(45.1)	30	(50.9)	11	(44.0)
	T:T	16	(31.4)	18	(30.5)	5	(20.0)
TGFB1 cdn25	C:C	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
	C:G	8	(15.7)	5	(8.5)	4	(16.0)
	G:G	43	(84.3)	54	(91.5)	21	(84.0)
TNFA-308	G:G	39	(76.5)	41	(70.7)	20	(80.0)
	G:A	12	(23.5)	16	(27.6)	4	(16.0)
	A:A	0	(0.0)	1	(1.7)	1	(4.0)
TNFA-238	G:G	48	(94.1)	51	(87.9)	21	(84.0)
	G:A	3	(5.9)	7	(12.1)	4	(16.0)
	A:A	0	(0.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
IL2-330	G:G	4	(7.7)	7	(11.9)	2	(8.7)
	G:T	21	(40.4)	21	(35.6)	12	(52.2)
	T:T	27	(51.9)	31	(52.5)	9	(39.1)
IL2+166	G:G	23	(44.2)	26	(44.1)	11	(47.8)
	G:T	23	(44.2)	23	(39.0)	11	(47.8)
	T:T	6	(11.5)	10	(17.0)	1	(4.4)
IL4-1098	T:T	26	(50.1)	35	(62.5)	14	(56.0)
	T:G	23	(45.1)	21	(37.5)	7	(31.8)
	G:G	2	(4.8)	0	(0.0)	1	(4.6)
IL4-590	C:C	31	(60.8)	31	(55.4)	17	(77.3)
	C:T	17	(33.3)	21	(37.5)	5	(22.7)
	T:T	3	(5.9)	4	(7.1)	0	(0.0)

IL4-33	T:T	3 (59.9)	2 (3.6)	0 (0.0)
	T:C	16 (31.4)	21 (37.5)	4 (18.2)
	C:C	32 (62.7)	33 (58.9)	18 (81.8)
IL6-174	G:G	28 (54.9)	25 (43.1)	14 (58.3)
	G:C	19 (37.3)	27 (46.6)	9 (37.5)
	C:C	4 (7.8)	6 (10.3)	1 (4.2)
IL6nt565	G:G	30 (58.8)	27 (46.6)	14 (58.3)
	G:A	17 (33.3)	26 (44.8)	9 (37.5)
	A:A	4 (7.8)	5 (8.6)	1 (4.2)
IL10-1082	G:G	8 (15.7)	9 (15.5)	6 (24.0)
	G:A	26 (51.0)	26 (44.8)	8 (32.0)
	A:A	17 (33.3)	23 (39.7)	11 (44.0)
IL10-819	C:C	22 (43.1)	31 (53.5)	11 (44.0)
	C:T^g	27 (52.9)	19 (32.8)	13 (52.0)
	T:T	2 (3.9)	8 (13.8)	1 (4.0)
IL10-592	C:C	22 (43.1)	31 (53.4)	11 (44.0)
	C:A^h	27 (52.9)	19 (32.8)	13 (52.0)
	A:A	2 (3.9)	8 (13.8)	1 (4.0)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed. So N is variable depending on the SNP.

P obtained through Chi-square test or Fisher's test.

n= number of occurrences of genotype; F%= genotype relative frequency.

SVR: patients with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment;

NRS: patients with detectable viral RNA on the 48th week of treatment;

REL: patients with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment.

^a REL vs SVR: 19 (76.0%) vs 25 (50.0%) *P*= 0.0310 OR= 0.3158 IC= 0.1081 – 0.9227

^b REL vs SVR: 5 (20.0%) vs 22 (44.0%) *P*= 0.0461 OR= 3.1429 IC= 1.0174 – 9.7091

^c NRS+REL vs SVR: 22 (26.5%) vs 23 (45.1%) *P*= 0.0268 OR= 2.2776 IC= 1.0909 – 4.755

^d REL vs SVR: 18 (72.0%) vs 21 (40.4%) *P*= 0.0093 OR= 0.2634 IC= 0.0937 – 0.7408

^d NRS vs REL: 22 (37.9%) vs 18 (72.0%) *P*= 0.0043 OR= 4.2078 IC= 1.515 – 11.6871

^e REL vs SVR: 5 (20.0%) vs 26 (50.0%) *P*= 0.0140 OR= 4 IC= 1.3042 – 12.2677

^e NRS vs REL: 32 (55.2%) vs 5 (20.0%) *P*= 0.0038 OR= 0.2031 IC= 0.0671 – 0.6153

^f NRS vs REL: 3 (5.1%) vs 5 (20.0%) *P*= 0.0472 OR= 4.6667 IC= 1.0209 – 21.331

^g NRS vs SVR: 19 (32.8%) vs 27 (52.9%) *P*= 0.0333 OR= 2.3092 IC= 1.0622 – 5.0202

^h NRS vs SVR: 19 (32.8%) vs 27 (52.9%) *P*= 0.0333 OR= 2.3092 IC= 1.0622 – 5.0202

Table 06. Distribution of haplotypes frequencies of polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according to their response with pegIFN and ribavirin.

Polymorphisms	Haplotypes	SVR (n=52)		NRS (n= 59)		REL (n= 25)	
		n	(F%)	n	(F%)	n	(F%)
TGFBβ1 (cdn10; cdn25)	CG	39	(38.3)	47	(39.8)	25	(50.0)
	TG	55	(53.9)	66	(55.9)	21	(42.0)
	CC	8	(7.8)	5	(4.3)	4	(8.00)
TNFA (-308; -238)	GG	87	(85.3)	91	(78.5)	40	(80.0)
	GA	3	(2.9)	7	(6.0)	4	(8.0)
	AG	12	(11.8)	18	(15.5)	6	(12.0)
IL2 (-330; +166)	TG	40	(38.5)	40	(33.9)	17	(37.0)
	GG	29	(27.9)	35	(29.7)	16	(34.8)
	TT	35	(33.7)	43	(36.4)	13	(28.2)
IL4 (-1098; -590; -33)	GCC	26	(25.5)	19	(17.0)	9	(20.5)
	TCC	53	(52.0)	64	(57.1)	30	(68.2)
	TTT	21	(20.6)	25	(22.3)	4	(9.1)
	TTC	1	(1.0)	2	(1.8)	1	(2.2)
	GTT	1	(1.0)	0	(0.0)	0	(0.0)
	GTC	0	(0.0)	2	(1.8)	0	(0.0)
IL6 (-174; nt565)	GG	75	(73.5)	77	(66.4)	37	(77.1)
	CA	25	(24.5)	36	(31.0)	11	(22.9)
	CG	2	(2.0)	3	(2.6)	0	(0.0)
IL10 (-1082; -819; -592)	ATA	31	(30.4)	35	(29.7)	15	(30.0)
	ACC	29	(28.4)	38	(32.2)	15	(30.0)
	GCC	42	(41.2)	45	(38.1)	20	(40.0)

For technical reasons, some patients did not have all their SNPs typed. So N is variable depending on the SNP.

P obtained through the Chi-square test or Fisher's test. All comparisons showed no significant *P* at 0.05.

n= number of occurrence of haplotypes; F%= relative frequency of haplotypes.

SVR: patients with undetectable viral RNA 24 weeks after the end of treatment;

NRS: patients with detectable viral RNA on the 48th week of treatment;

REL: patients with undetectable viral RNA on the 48th week of treatment, but who showed viral RNA in serum on the 12th or 24th week post-treatment.

Table 07. Summary of all positive (susceptible) and negative (protective) polymorphisms in cytokine genes in patients of a Brazilian population with chronic hepatitis C, classified according to their response with pegIFN and ribavirin.

Polymorphisms	Positive Association	Negative Association
<i>IL1R1</i> pst11970	T	REL
	C:T	REL
	C:C	REL
<i>IL1A</i>-889	C:C	REL
	C:T	SVR
<i>IL1B</i>+3962	T:C	SVR
<i>IL4RA</i>+1902	G	REL
	G:G	REL
<i>IL10</i>-819	C:T	SVR
<i>IL10</i>-592	C:A	SVR

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foram identificadas variantes polimórficas em genes de citocinas e em genes de receptores de citocinas e avaliadas suas possíveis associações com o grau de dano hepático e com a resposta ao tratamento combinado com pegIFN-alfa e ribavirina em pacientes brasileiros cronicamente infectados apenas pelo genótipo 1 do HCV.

As frequências genótípicas para os SNPs analisados foram observadas conforme o esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para a posição *IL4RA+1902* ($P= 0,0017$), cujas variantes polimórficas mostraram-se de alguma forma associadas tanto ao dano hepático quanto a resposta ao tratamento. A averiguação se as frequências genótípicas obtidas encontram-se dentro do esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinber é tradicionalmente realizada em estudos caso-controle e mais raramente aplicada em estudos *control-free*, por se tratar de uma amostra composta apenas por pacientes, portanto naturalmente enviesada. Existe muita discussão sobre esse assunto; Esser e Tomluk (2005) comentam que se o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ocorre apenas no grupo de pacientes, isso provê uma evidência adicional da real existência de possíveis associações com a doença observadas para o marcador em questão (ESSER e TOMLUK, 2005). Por este motivo, muitos grupos de pesquisa (YEE et al., 2000; DAI et al., 2006) optam por não verificar se a frequências das variantes polimórficas com as quais trabalham estão ou não conforme o esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Nossos resultados demonstram que variantes polimórficas que aumentam a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (*TNFA-308*, *IL6-174*, *IL6nt565*) e variantes que aumentam a sinalização de receptores de citocinas antiinflamatórias (*IL4RA+1902*) parecem interferir no grau de dano hepático em pacientes portadores de hepatite C crônica infectados pelo genótipo 1 do HCV. Já as variantes polimórficas que diminuem a expressão de genes de citocinas que polarizam a resposta imunológica para Th2 (*IL10-819*, *IL10-592*) parecem influenciar a resposta ao tratamento combinado com pegIFN-alfa e ribavirina. Há indícios também de que variantes que aumentam a sinalização de receptores de citocinas antiinflamatórias (*IL4RA+1902*), assim como variantes de genes da família IL-1 (*IL1A-889*, *IL1B+3962*, *IL1R1* pst1 1970) também influenciam a resposta ao tratamento. Para a grande maioria das associações observadas, a explicação biológica mais plausível é a relação entre as variantes e o nível de produção de citocinas.

Alguns estudos de associação descrevem a aplicação da correção de Bonferroni para ajustar testes múltiplos (CONSTANTINI et al., 2002), sendo ela recomendada para evitar a rejeição errônea da hipótese nula. No entanto, a redução do erro tipo I aumenta o erro tipo II, pois o mesmo não pode ser controlado. Portanto, peritos em estatística tem

abordado esta questão e a maioria concorda que a correção de Bonferroni é muito conservadora para estudos de associação com doença (ROTHMAN, 1990; SAVITZ e OLSHAN, 1995; PERNEGER, 1998). A base teórica para defender um ajuste para comparações múltiplas é a hipótese de que o acaso seria a primeira explicação para os fenômenos observados. Entretanto, essa hipótese compromete as premissas básicas da pesquisa empírica, a qual sustenta que a natureza segue leis regulares que podem ser estudadas através de observações. A opção por não realizar ajustes é preferível, pois levará a menos erros de interpretação, uma vez que os dados avaliados não são números aleatórios, mas observações atuais sobre a natureza. Além disso, os cientistas não devem ser tão relutantes em explorar pistas que podem revelar-se erradas, do que penalizar-se pela falta de resultados possivelmente importantes (ROTHMAN, 1990). Portanto, devido ao caráter exploratório do presente estudo, optamos por não aplicá-la em nossos dados. Uma abordagem alternativa para a correção de Bonferroni seria a replicação de resultados em uma coorte independente. Alguns de nossos dados confirmaram os resultados de estudos prévios, realizados em outras populações, enquanto outros foram inéditos e necessitam replicação para confirmação. Vale salientar, entretanto, que utilizamos um número maior de pacientes em comparação com alguns outros estudos e que nossa amostra foi composta de modo homogêneo para diversos fatores já citados.

O *Cytokine Genotyping kit* (DynaL Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA), utilizado para a determinação das tipagens das variantes polimórficas no presente estudo, foi desenvolvido pela Universidade de Heidelberg para o 13º Workshop Internacional de Histocompatibilidade (Seattle, USA, 2002) e é utilizado por alguns grupos de pesquisa (KLEINRATH et al., 2007; ATANASOVSKA-STOJANOVSKA et al., 2012). Previamente ao início do uso do kit para o desenvolvimento do presente trabalho, foi realizada uma validação do mesmo, comparando as tipagens para as posições *TNFA*-308G>A, *TGFB1*+869T>C, *TGFB1*+915C>G, *IL10*-1082A>G, *IL10*-819T>C, *IL10*-592A>C, *IL6*-174G>C e *IFNG*+874T>A com as obtidas pelo uso do *Cytokine Genotyping Tray* (One-Lambda, Inc, Canoga Park, CA), um outro kit mais antigo que o da Invitrogen, bastante aceito pelo meio científico e já utilizado por nosso grupo de pesquisa. As tipagens foram realizadas com ambos os kits em cinco amostras de DNA de diferentes indivíduos e mostraram-se 100% idênticas.

7. CONCLUSÕES

O grau de dano hepático em pacientes portadores de hepatite C crônica infectados pelo genótipo 1 do HCV parece estar sob a influência de variantes polimórficas que aumentam a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias (*TNFA*-308, *IL6*-174, *IL6nt565*) e sob a influência de variantes que aumentam a sinalização de receptores de citocinas antiinflamatórias (*IL4RA*+1902). O conhecimento destes marcadores apresenta uma significância prognóstica em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, permitindo dirigir a terapia de forma mais agressiva para aqueles com aumento do risco de progressão da doença.

A resposta ao tratamento combinado com pegIFN-alfa e ribavirina também parece estar sob a influência de variantes polimórficas que diminuem a expressão de genes de citocinas que polarizam a resposta imunológica para Th2, resultando assim na eliminação viral decorrente de uma resposta Th1 (*IL10*-819, *IL10*-592). Há indícios também de que variantes que aumentam a sinalização de receptores de citocinas antiinflamatórias (*IL4RA*+1902), assim como variantes de genes da família IL-1 (*IL1A*-889, *IL1B*+3962, *IL1R1* pst1 1970) também influenciam a resposta ao tratamento. Os resultados contribuirão para o estabelecimento de novos marcadores genéticos de resposta ao tratamento além do *IL28B* rs12979860, o único SNP cuja genotipagem é aceita até o presente momento como preditora de resposta ao tratamento. A determinação de novos marcadores de resposta ao tratamento ajudará a orientar as decisões terapêuticas em pacientes com hepatite crônica C infectados com o genótipo 1 do HCV. Considerando os efeitos colaterais e o custo do tratamento, a previsão da resposta ao tratamento previamente ao início da terapia é importante.

APÊNDICE: DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

CASUÍSTICA – Ver páginas 46, 47, 71 e 72

BIÓPSIA HEPÁTICA – Ver página 47

PROTOCOLO DE TRATAMENTO – Ver página 72

GENOTIPAGEM VIRAL – Ver páginas 47 e 72

COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletadas amostras de sangue de indivíduos diagnosticados com hepatite C. Após esclarecimentos sobre o projeto, assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e preenchimento de uma ficha cadastral, foi coletada uma amostra de 10 mL de sangue por punção da veia mediana, em tubos estéreis contendo EDTA, utilizando agulhas e seringas descartáveis. O sangue total foi congelado em tubos de criopreservação até o momento da extração do DNA.

EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Após o descongelamento das amostras de sangue total, o DNA foi extraído através da técnica *Salting-out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991) ou através da utilização do kit comercial *BioPur* (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Pr, Brasil). Em ambas as técnicas os reagentes lisam as células nucleadas e a carioteca, removem enzimas, precipitam proteínas, lavam o DNA e ao final, reidratam-no, conforme protocolo descrito abaixo. Algumas amostras que apresentaram resíduos de hemoglobina ao final do processo de extração foram purificadas através do uso do kit comercial *Purelink™* Genomic DNA purification (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), conforme protocolo descrito abaixo.

A concentração do DNA foi determinada utilizando o Fluorômetro Qubit™ (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) ou através da visualização da intensidade das bandas após eletroforese em gel de agarose, tendo um controle como padrão de comparação.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PELA TÉCNICA *SALTING-OUT*

1. Identificar tubos de 1,5mL
2. Transferir 500µL de sangue total
3. Acrescentar 800µL de RCLB (*red blood cell lysis* - composta por sacarose, triton X, MgCl₂ 6H₂O 1M, Tris pH 7,5 1M e água ultrapura) (1x) gelado

- Vórtex
 - Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos a 20°C
 - Desprezar o sobrenadante
4. Acrescentar 1mL de RCLB (1x) gelado
- Vórtex
 - Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos a 20°C
 - Desprezar o sobrenadante
5. Repetir o passo 4 até obter-se um *pellet* limpo
6. Desprezar o sobrenadante
- Adicionar 80µL de tampão de proteinase K[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) + 40µL de proteinase K (ou 40µL do preparado)
 - 20µL de SDS[®] (sulfato dodecil de sódio, Sigma Chemical CO, Steinheim, Germany) (20%) temperatura ambiente
 - 240µL de água de injeção
7. Vórtex
- Incubar em banho-maria a 55°C por 20min
 - Agitar manualmente
 - Incubar em banho-maria a 55°C por 20min
8. Deixar atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir
9. Adicionar 100µL de NaCl (6M) temperatura ambiente
10. Vórtex
11. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 20°C
12. Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo de 1,5mL com 100µL de NaCl (6M)
13. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 20°C
14. Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo de 1,5mL
15. Acrescentar 800µL de ETHO absoluto gelado
16. Inverter gentilmente os tubos várias vezes para precipitar o DNA
17. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos a 20°C
18. Desprezar o sobrenadante
19. Adicionar 1mL de Etanol 70%
20. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos a 20°C
21. Desprezar o sobrenadante
22. Deixar secar a temperatura ambiente
23. Ressuspender o DNA em 50µL de água de injeção
24. Deixar em geladeira por ao menos 24hs para reidratar o DNA
25. Deixar em banho-maria a 37° por 30 min para dissolver bem

26. Homogeneizar
27. Verificar a Densidade Ótica
28. Armazenar a -20°C

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA – KIT COMERCIAL *BioPur*

1. Identificar tubos de 1,5mL (não fornecido)
2. Transferir 200 μL de sangue total
3. Caso a amostra seja velha ou esteja coagulada - Acrescentar 1000 μL de RCLB (1x) gelado
 - Vórtex
 - Centrifugar a 9000 rpm por 3 minutos a 20°C
 - Desprezar o sobrenadante
 - Completar com 200 μL de PBS
4. 200 μL de tampão A de lise + 20 μL de proteinase K
 - Vórtex 5 segundos
5. Incubar os tubos por 15 minutos a 56°C em um termomixer (ou agitar as amostras em vórtex a cada 3 minutos)
6. 400 μL de tampão B6 de ligação
 - Vórtex
7. Coloque um tubo spin em um tubo de reação 2mL
8. Transfira a mistura para o tubo spin
9. Feche e incube por 1 minuto
 - Centrifugue por 2 minutos a 13000g
 - Descarte o filtrado
10. Coloque o tubo spin em um novo tubo de reação 2mL
11. Adicione 500 μL de tampão I de lavagem
 - Centrifugue por 1 minuto a 13000g
 - Descarte o filtrado
12. Adicione 800 μL de tampão II de lavagem
 - Centrifugue por 1 minuto a 13000g
 - Descarte o filtrado
13. Recoloque o tubo spin no mesmo tubo de reação 2mL
 - Centrifugue por 4 minutos na velocidade máxima para eliminar o etanol
14. Coloque o tubo spin em um novo tubo de reação 1,5mL
15. Adicione 120 μL de tampão de eluição pré-aquecido a 56°C

- Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto
- Centrifugar por 1 minuto a 8000g
- Descartar o tubo spin

16. Verificar a concentração do DNA

17. Armazenar a amostra a -20°C.

GENOTIPAGEM DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS EM GENES DE CITOCINAS

As tipagens das variantes polimórficas em genes de citocinas foram realizadas pela técnica PCR-SSP (“polymerase chain reaction-sequence specific primers”), usando o *Cytokine Genotyping kit* (DynaL Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA). Cada amostra de DNA, ajustada em 25 a 200 ng/μL, foi adicionada a uma solução de amplificação fornecida pelo kit, juntamente com a enzima Taq DNA polimerase (5u/μL; Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) e água de injeção, de acordo com os volumes recomendados pelo protocolo abaixo. Após a homogeneização desta solução, alíquotas foram dispensadas em placas de 96 poços, contendo os iniciadores específicos para os alelos de citocinas (anexo III). As placas foram transferidas para o termociclador (Pelkin-Elmer® 9600 ou GeneAmp® PCR System 9700), para a amplificação, conforme recomendações do fabricante.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, em cuba micro SSP gel System (MGS-B, One Lambda®, CA, USA), em gel de agarose a 2,5%, a 150 volts por 8 minutos. A visualização das bandas de DNA, quando expostas à luz ultravioleta, pode ser realizada devido à adição do corante SYBR® Green ao gel de agarose antes da solidificação. A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento específico de DNA amplificado, conforme as fichas-padrão fornecidas pelo fabricante do *Cytokine Genotyping kit* (DynaL Biotech, Invitrogen® Corporation, Brown Deer, WI, USA). Para verificar a integridade da reação de PCR, foi utilizado um par de iniciadores como controle interno. Todas as reações foram fotodocumentadas (Transiluminador e fotodocumentador L-PIX Loccus biotecnologia). As fotodocumentações foram salvas em arquivos digitais e impressas, sendo nesse último caso, afixadas à ficha-padrão de cada paciente.

PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO PELA TÉCNICA PCR-SSP *Cytokine Genotyping kit* (Invitrogen®)

1) Adicionar ao mix (140 μl-fornecido pelo kit):

- 329 μl de água

- 3,3 µl de Taq Polymerase
 - Vortex
 - 50 µl de DNA (75 a 125 ng/µl)
 - Vortex
 - Volume final = 379 µl
- 2) Dispensar 10 µl da mistura em cada poço da placa (fornecida pelo kit)
 - 3) Tapar
 - 4) Levar imediatamente ao termociclador para amplificar conforme o programa descrito no Quadro 1
 - 5) Submeter a eletroforese.

Quadro 1 – Programa para termociclador para amplificação pelo *Cytokine Genotyping kit* (Invitrogen®)

Ciclos	Tempo	Temperatura
1 ciclo	2 min	94°C
10 ciclos	15 seg	94°C
	60 seg	65°C
20 ciclos	15 seg	94°C
	50 seg	61°C
	30 seg	72°C
Manutenção	indeterminado	4°C

FONTE: Manual de instruções do *Cytokine Genotyping kit* (Invitrogen®)

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Freqüências alélicas, genótípicas e haplotípicas

As freqüências alélicas e genótípicas foram obtidas por contagem direta através das fórmulas:

$$F_{al} = n/2N$$

$$F_{gen} = nx100/N$$

Onde:

F_{al} : freqüência alélica

F_{gen} : freqüência genotípica

n: freqüência absoluta de um alelo na amostra

N: número de indivíduos na amostra.

As freqüências haplotípicas foram estimadas tomando por base as freqüências genotípicas observadas, através do método da verossimilhança que utiliza o algoritmo EM (maximização de expectativa), o qual faz parte do conjunto de programas disponíveis no pacote Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER et al., 2005). Para elaborar o arquivo de entrada para o pacote Arlequin empregou-se o programa Convert (GLAUBITZ, 2004).

Comparação entre grupos amostrais – Ver página XX

O “*Odds Ratio*” (“OR” ou razão de probabilidades) foi estimado através da fórmula (WOOLF, 1955):

$$OR = (A \times D) / (B \times C)$$

Onde A, B, C e D são os valores correspondentes às letras do Quadro 2:

Quadro 2 – Valores para cálculo de *Odds Ratio*

	Amostra X	Amostra Y
Positivo para o fator pesquisado	A	B
Negativo para o fator pesquisado	C	D

FONTE: Wolf, 1955

O valor de OR exprime quantas vezes a característica é mais freqüente entre os portadores de um determinado fator comparando-se com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD et al., 1974). Nos casos em que o valor de alguma das células (A, B, C ou D) for zero, será realizada a correção de Haldane (SVEJGAARD e RYDER, 1994), cuja fórmula é:

$$RR = [(A+1/2) \cdot (D+1/2)] / [(B+1/2) \cdot (C+1/2)]$$

Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver o quadro clínico; valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade. O intervalo de confiança (IC) de 95% empregado nas determinações de OR foi obtido pelo método de Woolf (WOOLF, 1955), através da seguinte fórmula:

$$CI (95\%) = \text{anti ln} \{ \ln(OR) \pm 1,96 \sqrt{(1/a + 1/b + 1/c + 1/d)} \}$$

Análise do desequilíbrio de ligação entre os SNPs estudados

A partir das frequências obtidas, foram estimados os valores de desequilíbrio de ligação para os locos estudados. A verificação da ocorrência não aleatória de certas combinações alélicas foi realizada como proposto por Lewontin (LEWONTIN, 1964), pela fórmula:

$$\Delta_{ab} = p_{ab} - p_a p_b$$

Onde:

- Δ_{ab} : valor do desequilíbrio de ligação
- p_{ab} : frequência observada de um haplótipo
- p_a : frequência observada do alelo (a) de um dado *locus*
- p_b : frequência observada do alelo (b) de um outro *locus*
- $p_a p_b$: frequência esperada de um haplótipo (ab)

No entanto, um valor relativo do desequilíbrio de ligação (Δ'_{ab}) é mais informativo do que o obtido pela fórmula descrita acima, pois o Δ'_{ab} traz informação a respeito da magnitude do desequilíbrio de ligação em relação ao maior valor que ele poderia assumir, dadas as frequências dos alelos em questão (LEWONTIN, 1964). Este valor relativo foi calculado pelo programa ARLEQUIN versão 3.5 (EXCOFFIER et al., 2005) através da fórmula:

$$\Delta'_{ab} = \Delta_{ab} / \Delta_{ab, \text{máx}}$$

onde o valor de $\Delta_{ab, \text{máx}}$ pode ter um dos dois valores:

- o maior de $(p_a p_b, (1 - p_a)(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} < 0$

ou

- o menor de $((1 - p_a)p_b, p_a(1 - p_b))$, se $\Delta_{ab} \geq 0$

O Δ'_{ab} pode assim assumir valores no intervalo de -1,0 a +1,0, sendo que os valores negativos indicam repulsão entre os alelos em questão e os positivos indicam acoplamento. O valor zero indica ausência de desequilíbrio de ligação, ou a situação denominada por alguns autores como “equilíbrio de ligação”. O grau de significância do desequilíbrio de ligação foi avaliado através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2x2.

O desequilíbrio também pode levar à correlação entre dois SNPs, que é estimada por r . O valor de r^2 , que também foi calculado pelo programa Arlequin versão 3.5 (EXCOFFIER et al., 2005), é correlato ao valor de D e é calculado da seguinte maneira:

$$r^2 = D^2 / [p_a (1-p_a) p_b (1-p_b)]$$

Assim, o valor de χ^2 também pode ser calculado por: $\chi^2 = 2nr^2$ de maneira que o resultado final é aplicado tanto ao valor de D como de r^2 .

REFERÊNCIAS

- ACCAPEZZATO, D. et al. Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. **J Exp Med**, v. 202, n. 6, p. 817-28, 2005.
- AGGARWAL, B. B. et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. **J Biol Chem**, v. 260, n. 4, p. 2345-54, 1985.
- AREND, W. P. Interleukin-1 receptor antagonist. **Adv Immunol**, v. 54, p. 167-227, 1993.
- ASSELAH, T. Genetic polymorphism and response to treatment in chronic hepatitis C: the future of personalized medicine. **J Hepatol**, v. 52, n. 3, p. 452-4, 2010.
- ATANASOVSKA-STOJANOVSKA, A. et al. IL10 -1082, IL10 -819 and IL10 -592 polymorphisms are associated with chronic periodontitis in a Macedonian population. **Hum Immunol**, v. 73, n. 7, p. 753-8, 2012.
- AUFFERMANN-GRETZINGER, S.; KEEFFE, E. B.; LEVY, S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3171-6, 2001.
- BARTH, H. et al. Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 9, p. 3605-14, 2005.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-18, 2005.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 289-93, 1996.
- BERGHOLDT, R. et al. Genetic and functional evaluation of an interleukin-12 polymorphism (IDDM18) in families with type 1 diabetes. **J Med Genet**, v. 41, n. 4, p. e39, 2004.
- BIALEK, S. R.; TERRAULT, N. A. The changing epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. **Clin Liver Dis**, v. 10, n. 4, p. 697-715, 2006.
- BIGGER, C. B.; BRASKY, K. M.; LANFORD, R. E. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. **J Virol**, v. 75, n. 15, p. 7059-66, 2001.
- BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 2, p. 97-113, 2009.
- BLACKARD, J. T. et al. Acute hepatitis C virus infection: a chronic problem. **Hepatology**, v. 47, n. 1, p. 321-31, 2008.
- BLANCHETTE, F. et al. TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. **J Clin Invest**, v. 99, n. 8, p. 1974-83, 1997.
- BODE, J. G.; BRENNENDORFER, E. D.; HAUSSINGER, D. Subversion of innate host antiviral strategies by the hepatitis C virus. **Arch Biochem Biophys**, v. 462, n. 2, p. 254-65, 2007.
- BRASIL. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2011**. DEPARTAMENTO DE AIDS, D. E. H. V., SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE: Ministério da Saúde 2011a.

_____. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral c e coinfeções**
DEPARTAMENTO DE DST, A. E. H. V., SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE:
Ministério da Saúde 2011b.

BRENNER, A. V. et al. Single-nucleotide polymorphisms in selected cytokine genes and risk of adult glioma. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2543-7, 2007.

BROEN, J. C. et al. Polymorphisms in the interleukin 4, interleukin 13, and corresponding receptor genes are not associated with systemic sclerosis and do not influence gene expression. **J Rheumatol**, v. 39, n. 1, p. 112-8, 2012.

BROWN, K. D. et al. A family of small inducible proteins secreted by leukocytes are members of a new superfamily that includes leukocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growth factors, and indicators of various activation processes. **J Immunol**, v. 142, n. 2, p. 679-87, 1989.

BRUNDA, M. J. Interleukin-12. **J Leukoc Biol**, v. 55, n. 2, p. 280-8, 1994.

BUKH, J.; MILLER, R. H.; PURCELL, R. H. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. **Semin Liver Dis**, v. 15, n. 1, p. 41-63, 1995.

CAGGANA, M. et al. Population-based studies reveal differences in the allelic frequencies of two functionally significant human interleukin-4 receptor polymorphisms in several ethnic groups. **Genet Med**, v. 1, n. 6, p. 267-71, 1999.

CAI, D. et al. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med**, v. 11, n. 2, p. 183-90, 2005.

CAMBIEN, F. et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 881-7, 1996.

CDC. Guidelines for Viral Hepatitis Surveillance and Case Management. Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports. 2002. Disponível em: < www.cdc.gov/Ncidod/diseases/hepatitis/resource/surveillance.htm >. Acesso em: 03 fev 2008.

CHANDER, G. et al. Treatment of chronic hepatitis C: a systematic review. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S135-44, 2002.

CHEN, M. et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 135-43, 1999.

CHERWINSKI, H. M. et al. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J Exp Med**, v. 166, n. 5, p. 1229-44, 1987.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J. M. HCV Genome and Life Cycle. 2006.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J. An update on interleukin-4 and its receptor. **Eur Cytokine Netw**, v. 8, n. 4, p. 333-44, 1997.

CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

- CLAUDINO, M. et al. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 6, p. 1565-73, 2008.
- COFFMAN, R. L. et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol Rev**, v. 102, p. 5-28, 1988.
- CONSTANTINI, P. K. et al. Interleukin-1, interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms in hepatitis C virus infection: an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and response to alpha-interferon therapy. **Liver**, v. 22, n. 5, p. 404-12, 2002.
- CORADO, J. et al. Impairment of natural killer (NK) cytotoxic activity in hepatitis C virus (HCV) infection. **Clin Exp Immunol**, v. 109, n. 3, p. 451-7, 1997.
- DAI, C. Y. et al. Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. **J Viral Hepat**, v. 13, n. 11, p. 770-4, 2006.
- DEIGNAN, T. et al. Decrease in hepatic CD56(+) T cells and V alpha 24(+) natural killer T cells in chronic hepatitis C viral infection. **J Hepatol**, v. 37, n. 1, p. 101-8, 2002.
- DI GIOVINE, F. S. et al. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL1 beta). **Hum Mol Genet**, v. 1, n. 6, p. 450, 1992.
- DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, n. 8, p. 1627-52, 1991.
- _____. Interleukin-1. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 8, n. 4, p. 253-65, 1997.
- _____. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, v. 117, n. 14, p. 3720-32, 2011.
- DIXON, A. L. et al. A genome-wide association study of global gene expression. **Nat Genet**, v. 39, n. 10, p. 1202-7, 2007.
- DOMINICI, R. et al. Cloning and functional analysis of the allelic polymorphism in the transcription regulatory region of interleukin-1 alpha. **Immunogenetics**, v. 54, n. 2, p. 82-6, 2002.
- DUARTE, E. A. et al. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. **Infect Agents Dis**, v. 3, n. 4, p. 201-14, 1994.
- DUSTIN, L. B.; RICE, C. M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. **Annu Rev Immunol**, v. 25, p. 71-99, 2007.
- EASL. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. **J Hepatol**, v. 31 Suppl 1, p. 3-8, 1999.
- EL-OMAR, E. M. et al. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 398-402, 2000.

- ENDLER, G. et al. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism does not determine plasma interleukin-6 concentrations in experimental endotoxemia in humans. **Clin Chem**, v. 50, n. 1, p. 195-200, 2004.
- ESKDALE, J. et al. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. **Immunogenetics**, v. 46, n. 2, p. 120-8, 1997.
- ESSER, C.; TOMLUK, J. Reporting Hardy-Weinberg tests in case-control studies: reasons for caution but not for panic reactions. **J Invest Dermatol**, v. 124, n. 5, p. 1082-3, 2005.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evol Bioinform Online**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FALLETI, E. et al. Genetic polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis C. **Hum Immunol**, v. 71, n. 10, p. 999-1004, 2010.
- FANG, S. H. et al. Ribavirin enhancement of hepatitis C virus core antigen-specific type 1 T helper cell response correlates with the increased IL-12 level. **J Hepatol**, v. 33, n. 5, p. 791-8, 2000.
- FARCI, P.; PURCELL, R. H. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. **Semin Liver Dis**, v. 20, n. 1, p. 103-26, 2000.
- FELDMANN, G. et al. Induction of interleukin-6 by hepatitis C virus core protein in hepatitis C-associated mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4491-8, 2006.
- FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e prevenção. **Revista brasileira de Epidemiologia**, n. 7, p. 473-87, 2004.
- FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest**, v. 102, n. 7, p. 1369-76, 1998.
- FISHMAN, S. L.; BRANCH, A. D. The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 6, p. 1158-67, 2009.
- FREITAS, S. Z. et al. Prevalence, genotypes and risk factors associated with hepatitis C virus infection in hemodialysis patients in Campo Grande, MS, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 405-8, 2008.
- FRIED, M. W. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. **N Engl J Med**, v. 347, n. 13, p. 975-82, 2002.
- FUJITA, T. et al. Structure of the human interleukin 2 gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 24, p. 7437-41, 1983.
- FULLER, M. J. et al. Cutting edge: emergence of CD127^{high} functionally competent memory T cells is compromised by high viral loads and inadequate T cell help. **J Immunol**, v. 174, n. 10, p. 5926-30, 2005.
- GALE, M., JR.; FOY, E. M. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 939-45, 2005.

- GATELY, M. K. et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. **Annu Rev Immunol**, v. 16, p. 495-521, 1998.
- GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399-401, 2009.
- GERLACH, J. T. et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 117, n. 4, p. 933-41, 1999.
- GHANY, M. G. et al. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. **Hepatology**, v. 49, n. 4, p. 1335-74, 2009.
- GLAUBITZ, J. C. CONVERT: a user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. **Molecular Ecology Notes**, n. 4, p. 309-310, 2004.
- GONZALEZ, A. et al. Efficacy of screening donors for antibodies to the hepatitis C virus to prevent transfusion-associated hepatitis: final report of a prospective trial. **Hepatology**, v. 22, n. 2, p. 439-45, 1995.
- GORE, E. A. et al. Interleukin-1beta+3953 allele 2: association with disease status in adult periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 10, p. 781-5, 1998.
- GOTTO, J.; DUSHEIKO, G. M. Hepatitis C and treatment with pegylated interferon and ribavirin. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 10, p. 1874-7, 2004.
- GRAY, P. W.; GOEDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 859-63, 1982.
- 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**, v. 149, n. 2, p. 517-20, 1992.
- GRUNGREIFF, K.; REINHOLD, D.; ANSORGE, S. Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF-beta1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. **Cytokine**, v. 11, n. 12, p. 1076-80, 1999.
- GUIDOTTI, L. G.; CHISARI, F. V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 65-91, 2001.
- GUO, W. et al. Ligation of MHC class II molecules differentially upregulates TNF beta gene expression in B cell lines of different MHC class II haplotypes. **Hum Immunol**, v. 60, n. 4, p. 312-22, 1999.
- HADZIYANNIS, S. J. et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. **Ann Intern Med**, v. 140, n. 5, p. 346-55, 2004.
- HALL, M. A. et al. Genetic polymorphism of IL-12 p40 gene in immune-mediated disease. **Genes Immun**, v. 1, n. 3, p. 219-24, 2000.
- HAUSER, S. L. Tumor necrosis factor: immunogenetics and disease. **Ann Neurol**, v. 38, n. 5, p. 702-4, 1995.

HEGEDUS, C. M. et al. Screening the human serum proteome for genotype-phenotype associations: an analysis of the IL6 -174G>C polymorphism. **Proteomics**, v. 7, n. 4, p. 548-57, 2007.

HERSHEY, G. K. et al. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. **N Engl J Med**, v. 337, n. 24, p. 1720-5, 1997.

HIROISHI, K.; ITO, T.; IMAWARI, M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, n. 10, p. 1473-82, 2008.

HOFFMANN, S. C. et al. Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. **Transplantation**, v. 72, n. 8, p. 1444-50, 2001.

HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S21-9, 2002.

HUANG, J. et al. Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 12829-32, 1997.

HUARTE, M. P.; CASI, M. A. [Virology, diagnostic tests, epidemiology and transmission mechanisms of hepatitis C virus infection]. **An Sist Sanit Navar**, v. 27 Suppl 2, p. 41-9, 2004.

HUTH, C. et al. Joint analysis of individual participants' data from 17 studies on the association of the IL6 variant -174G>C with circulating glucose levels, interleukin-6 levels, and body mass index. **Ann Med**, v. 41, n. 2, p. 128-38, 2009.

IVIC, I. et al. Hla-Cw7 allele as predictor of favorable therapeutic response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. **Croat Med J**, v. 48, n. 6, p. 807-13, 2007.

IZUHARA, K.; SHIRAKAWA, T. Signal transduction via the interleukin-4 receptor and its correlation with atopy. **Int J Mol Med**, v. 3, n. 1, p. 3-10, 1999.

JANEWAY, C. A. et al. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th. New York and London: Garland Science, 2001. ISBN 0-8153-3642-X.

JANG, J. Y.; CHUNG, R. T. Chronic hepatitis C. **Gut Liver**, v. 5, n. 2, p. 117-32, 2011.

JESUDIAN, A. B.; GAMBARIN-GELWAN, M.; JACOBSON, I. M. Advances in the treatment of hepatitis C virus infection. **Gastroenterol Hepatol (N Y)**, v. 8, n. 2, p. 91-101, 2012.

JOHN, S. et al. Two novel biallelic polymorphisms in the IL-2 gene. **Eur J Immunogenet**, v. 25, n. 6, p. 419-20, 1998.

JU, G. et al. Structure-function analysis of human interleukin-2. Identification of amino acid residues required for biological activity. **J Biol Chem**, v. 262, n. 12, p. 5723-31, 1987.

KABESCH, M. et al. A complete screening of the IL4 gene: novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, n. 5, p. 893-8, 2003.

- KAKIMI, K. et al. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 921-30, 2000.
- KANTO, T. et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. **J Immunol**, v. 162, n. 9, p. 5584-91, 1999.
- KAPLAN, M. et al. Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: a review of immunological and clinical characteristics. **Gastroenterology**, v. 125, n. 2, p. 597-604, 2003.
- KAWAGUCHI, Y. et al. Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. **Immunogenetics**, v. 59, n. 6, p. 441-8, 2007.
- KELLY-WELCH, A. E. et al. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1527-8, 2003.
- KENNY-WALSH, E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. **N Engl J Med**, v. 340, n. 16, p. 1228-33, 1999.
- KHAKOO, S. I. et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. **Science**, v. 305, n. 5685, p. 872-4, 2004.
- KILPINEN, S. et al. The promoter polymorphism of the interleukin-6 gene regulates interleukin-6 production in neonates but not in adults. **Eur Cytokine Netw**, v. 12, n. 1, p. 62-8, 2001.
- KIM, Y. J. et al. Association of TNF-alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. **Hum Mol Genet**, v. 12, n. 19, p. 2541-6, 2003.
- KINGSLEY, D. M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev**, v. 8, n. 2, p. 133-46, 1994.
- KISHIMOTO, T.; TAGA, T.; AKIRA, S. Cytokine signal transduction. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 253-62, 1994.
- KISZEL, P. et al. Interleukin-6 -174 promoter polymorphism does not influence IL-6 production after LPS and IL-1 beta stimulation in human umbilical cord vein endothelial cells. **Cytokine**, v. 40, n. 1, p. 17-22, 2007.
- KITTESEN, D. J. et al. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. **J Clin Invest**, v. 106, n. 10, p. 1239-49, 2000.
- KLEINRATH, T. et al. Interleukin-4 promoter polymorphisms: a genetic prognostic factor for survival in metastatic renal cell carcinoma. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 7, p. 845-51, 2007.
- KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol**, v. 34, n. 5, p. 391-9, 1997.
- KSIAA CHEIKHROUHO, L. et al. Cytokine and apoptosis gene polymorphisms influence the outcome of hepatitis C virus infection. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, v. 10, n. 3, p. 280-8, 2011.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res**, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAI, M. E. et al. Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. **Lancet**, v. 343, n. 8894, p. 388-90, 1994.

LEWONTIN, R. C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v. 49, n. 1, p. 49-67, 1964.

LIMA-CABELLO, E. et al. Enhanced expression of pro-inflammatory mediators and liver X-receptor-regulated lipogenic genes in non-alcoholic fatty liver disease and hepatitis C. **Clin Sci (Lond)**, v. 120, n. 6, p. 239-50, 2011.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 259-62, 2001.

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**, v. 164, n. 12, p. 6480-6, 2000.

LU, C. C. et al. Host TNF-alpha-1031 and -863 promoter single nucleotide polymorphisms determine the risk of benign ulceration after H. pylori infection. **Am J Gastroenterol**, v. 100, n. 6, p. 1274-82, 2005.

MACIAS, J. et al. Host genetics. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 6, n. 6, p. 491-500, 2011.

MAHMOOD, S. et al. Clinical significance of intrahepatic interleukin-8 in chronic hepatitis C patients. **Hepatol Res**, v. 24, n. 4, p. 413-419, 2002.

MAHONEY, F. J. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 2, p. 351-66, 1999.

MALYAK, M. et al. Characterization of a low molecular weight isoform of IL-1 receptor antagonist. **J Immunol**, v. 161, n. 4, p. 1997-2003, 1998.

MANESIS, E. K. et al. Natural course of treated and untreated chronic HCV infection: results of the nationwide Hepnet.Greece cohort study. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 29, n. 10, p. 1121-30, 2009.

MANNS, M. P. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. **Lancet**, v. 358, n. 9286, p. 958-65, 2001.

MARANGON, A. V. et al. Influence of HLA alleles in response to treatment with pegylated interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. **Int J Immunogenet**, 2012.

_____. KIR genes and their human leukocyte antigen ligands in the progression to cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. **Hum Immunol**, v. 72, n. 11, p. 1074-8, 2011.

MARCH, C. J. et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. **Nature**, v. 315, n. 6021, p. 641-7, 1985.

MARINO, M. W. et al. Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 15, p. 8093-8, 1997.

MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. Immunogenetics of viral infections. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 5, p. 510-6, 2005.

MASSAGUE, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, v. 6, p. 597-641, 1990.

MATESANZ, F. et al. Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. **J Neuroimmunol**, v. 148, n. 1-2, p. 212-7, 2004.

MATSUDA, T.; HIRANO, T. Interleukin 6 (IL-6). **Biotherapy**, v. 2, n. 4, p. 363-73, 1990.

MAY, L. T. et al. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. **J Biol Chem**, v. 263, n. 16, p. 7760-6, 1988.

MCDERMOTT, M. F. TNF and TNFR biology in health and disease. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 47, n. 4, p. 619-35, 2001.

MCDERMOTT, M. M. et al. Patterns of inflammation associated with peripheral arterial disease: the InCHIANTI study. **Am Heart J**, v. 150, n. 2, p. 276-81, 2005.

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**, v. 79, n. 19, p. 12365-74, 2005.

MITSUYASU, H. et al. Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma. **Nat Genet**, v. 19, n. 2, p. 119-20, 1998.

MIYAJIMA, A. et al. Cytokine receptors and signal transduction. **Annu Rev Immunol**, v. 10, p. 295-331, 1992.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 683-765, 2001.

MORISHIMA, C. et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. **Hepatology**, v. 43, n. 3, p. 573-80, 2006.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348-57, 1986.

MS. Hepatite C: Descrição da doença. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=27218>. Acesso em: 05 jun 2012.

MUHL, H.; PFEILSCHIFTER, J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. **Int Immunopharmacol**, v. 3, n. 9, p. 1247-55, 2003.

MYRMEL, H.; ULVESTAD, E.; ASJO, B. The hepatitis C virus enigma. **Apmis**, v. 117, n. 5-6, p. 427-39, 2009.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthritis Res**, v. 4 Suppl 3, p. S233-42, 2002.

- NEDWIN, G. E. et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. **Nucleic Acids Res**, v. 13, n. 17, p. 6361-73, 1985.
- NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. **Annu Rev Immunol**, v. 17, p. 701-38, 1999.
- NEUMANN, A. U. et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. **Science**, v. 282, n. 5386, p. 103-7, 1998.
- NIH. Hepatitis C. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 72, n. 10, p. 65-9, 1997.
- NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002. **NIH Consens State Sci Statements**, v. 19, n. 3, p. 1-46, 2002.
- OLEJNICZAK, K.; KASPRZAK, A. Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases--a review. **Med Sci Monit**, v. 14, n. 10, p. RA179-89, 2008.
- PALADINO, N. et al. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. **Tissue Antigens**, v. 69 Suppl 1, p. 109-11, 2007.
- PAPATHEODORIDIS, G. V.; PARASKEVIS, D. Role of genetic polymorphisms in the progression of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Liver Int**, v. 28, n. 6, p. 764-6, 2008.
- PAUL, W. E. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. **Blood**, v. 77, n. 9, p. 1859-70, 1991.
- PAWLOTSKY, J. M. Hepatitis C virus population dynamics during infection. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 299, p. 261-84, 2006.
- PENNICA, D. et al. Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, v. 312, n. 5996, p. 724-9, 1984.
- PERNEGER, T. V. What's wrong with Bonferroni adjustments. **Bmj**, v. 316, n. 7139, p. 1236-8, 1998.
- PERREY, C. et al. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. **Transpl Immunol**, v. 6, n. 3, p. 193-7, 1998.
- POWELL, E. E. et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 31, n. 4, p. 828-33, 2000.
- PRATI, D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. **J Hepatol**, v. 45, n. 4, p. 607-16, 2006.
- RAFIQ, S. et al. Common genetic variation in the gene encoding interleukin-1-receptor antagonist (IL-1RA) is associated with altered circulating IL-1RA levels. **Genes Immun**, v. 8, n. 4, p. 344-51, 2007.
- REDDY, K. R. et al. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 33, n. 2, p. 433-8, 2001.

- REHERMANN, B. et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. **J Virol**, v. 70, n. 10, p. 7092-102, 1996.
- REIBMAN, J. et al. Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 15, p. 6805-9, 1991.
- RINK, L.; KIRCHNER, H. Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 111, n. 3, p. 199-209, 1996.
- ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. **Mol Reprod Dev**, v. 32, n. 2, p. 91-8, 1992.
- ROMERO-GOMEZ, M. et al. Genes and hepatitis C: susceptibility, fibrosis progression and response to treatment. **Liver Int**, v. 31, n. 4, p. 443-60, 2011.
- ROSENWASSER, L. J.; BORISH, L. Genetics of atopy and asthma: the rationale behind promoter-based candidate gene studies (IL-4 and IL-10). **Am J Respir Crit Care Med**, v. 156, n. 4 Pt 2, p. S152-5, 1997.
- ROTHMAN, K. J. No adjustments are needed for multiple comparisons. **Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 43-6, 1990.
- SAVITZ, D. A.; OLSHAN, A. F. Multiple comparisons and related issues in the interpretation of epidemiologic data. **Am J Epidemiol**, v. 142, n. 9, p. 904-8, 1995.
- SEEFF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S35-46, 2002.
- SEEGERS, D. et al. A TaqI polymorphism in the 3'UTR of the IL-12 p40 gene correlates with increased IL-12 secretion. **Genes Immun**, v. 3, n. 7, p. 419-23, 2002.
- SEIFERT, U. et al. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 250-9, 2004.
- SHEPARD, C. W.; FINELLI, L.; ALTER, M. J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. **Lancet Infect Dis**, v. 5, n. 9, p. 558-67, 2005.
- SHIN, E. C. et al. Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. **J Clin Invest**, v. 116, n. 11, p. 3006-14, 2006.
- SILVA, C. M. et al. High proportion of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in a large cohort of patients from Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 867-70, 2007.
- SIMMONDS, P. Viral heterogeneity of the hepatitis C virus. **J Hepatol**, v. 31 Suppl 1, p. 54-60, 1999.
- _____. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 11, p. 3173-88, 2004.
- SIMMONDS, P. et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. **Hepatology**, v. 19, n. 5, p. 1321-4, 1994.

_____. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 962-73, 2005.

_____. Evolutionary analysis of variants of hepatitis C virus found in South-East Asia: comparison with classifications based upon sequence similarity. **J Gen Virol**, v. 77 (Pt 12), p. 3013-24, 1996.

SIMS, J. E. et al. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, n. 22, p. 8946-50, 1989.

SMITH, A. J.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 20, n. 1, p. 43-59, 2009.

STEINKASSERER, A. et al. The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. **Genomics**, v. 13, n. 3, p. 654-7, 1992.

STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9th. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

STOICA, A. L. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 gene polymorphism, endothelial dysfunction, and postoperative prognosis in patients with peripheral arterial disease. **J Vasc Surg**, v. 52, n. 1, p. 103-9, 2010.

SUPPIAH, V. et al. IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1100-4, 2009.

SVEJGAARD, A. et al. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**, v. 4, n. 2, p. 95-105, 1974.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, v. 43, n. 1, p. 18-27, 1994.

SZABO, G.; DOLGANIUC, A. Subversion of plasmacytoid and myeloid dendritic cell functions in chronic HCV infection. **Immunobiology**, v. 210, n. 2-4, p. 237-47, 2005.

TAI, A. W.; CHUNG, R. T. Treatment failure in hepatitis C: mechanisms of non-response. **J Hepatol**, v. 50, n. 2, p. 412-20, 2009.

TAKAKI, A. et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. **Nat Med**, v. 6, n. 5, p. 578-82, 2000.

TAMBUR, A. R. et al. Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients. **Transplantation**, v. 71, n. 10, p. 1475-80, 2001.

TANABE, O. et al. Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. **J Immunol**, v. 141, n. 11, p. 3875-81, 1988.

TANAKA, Y. et al. Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nat Genet**, v. 41, n. 10, p. 1105-9, 2009.

TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **J Biol Chem**, v. 275, n. 24, p. 18138-44, 2000.

TESTER, I. et al. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. **J Exp Med**, v. 201, n. 11, p. 1725-31, 2005.

THOMAS, D. L.; SEEFF, L. B. Natural history of hepatitis C. **Clin Liver Dis**, v. 9, n. 3, p. 383-98, vi, 2005.

TRINCHIERI, G.; PFLANZ, S.; KASTELEIN, R. A. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641-4, 2003.

TSENG, C. T.; KLIMPEL, G. R. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. **J Exp Med**, v. 195, n. 1, p. 43-9, 2002.

TSUBOTA, A. et al. Peginterferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. **World J Gastroenterol**, v. 17, n. 4, p. 419-32, 2011.

TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 1997.

VALIANTE, N. M. et al. Life, activation and death of intrahepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. **Immunol Rev**, v. 174, p. 77-89, 2000.

VAN DER POEL, C. L. Hepatitis C virus and blood transfusion: past and present risks. **J Hepatol**, v. 31 Suppl 1, p. 101-6, 1999.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 253-78, 1990.

VIEIRA, P. et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 4, p. 1172-6, 1991.

VILLANO, S. A. et al. Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. **Hepatology**, v. 29, n. 3, p. 908-14, 1999.

WAHL, S. M. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure. **J Clin Immunol**, v. 12, n. 2, p. 61-74, 1992.

WATANABE, N.; KOBAYASHI, Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 alpha. **Cytokine**, v. 6, n. 6, p. 597-601, 1994.

WATHELET, M. G. et al. Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN-beta enhancer in vivo. **Mol Cell**, v. 1, n. 4, p. 507-18, 1998.

WILSON, A. G. et al. An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles. **J Exp Med**, v. 177, n. 2, p. 557-60, 1993.

_____. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 7, p. 3195-9, 1997.

WINDSOR, W. T. et al. Disulfide bond assignments and secondary structure analysis of human and murine interleukin 10. **Biochemistry**, v. 32, n. 34, p. 8807-15, 1993.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann Hum Genet**, v. 19, n. 4, p. 251-3, 1955.

XING, Z. et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clin Invest**, v. 101, n. 2, p. 311-20, 1998.

YASUKAWA, K. et al. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. **Embo J**, v. 6, n. 10, p. 2939-45, 1987.

YE, K. et al. Three distinct promoters direct transcription of different 5' untranslated regions of the human interleukin 1 type I receptor: a possible mechanism for control of translation. **Cytokine**, v. 8, n. 6, p. 421-9, 1996.

YEE, L. J. et al. Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection. **Hepatology**, v. 33, n. 3, p. 708-12, 2001.

_____. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. **Genes Immun**, v. 1, n. 6, p. 386-90, 2000.

ZARIFE, M. A. et al. Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 7, p. 663-8, 2006.

ANEXO



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de outubro de 2.009

OF. 392/2009-CEP

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Dr. Giovanni,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa, (Protocolo CEP 3355-2009) **Influência dos genes KIR, MICA, HLA e citocinas na progressão da hepatite C e na resposta ao Tratamento**", que será conduzido por Vossa Senhoria, com a participação de Ricardo Alberto Moliterno, Maria Inês de Moura Campos Pardini, Rejane M. T. Grotto e Camila Fernanda Verdichio de Moraes, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 05/10/09.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.