



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO
(SNP) E EXPRESSÃO DOS GENES DAS CITOCINAS IFN- α 1,
IFN- γ E DO RECEPTOR IFN- α r1 EM RELAÇÃO À
QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL EM PACIENTES COM
HEPATITE B**

JOELMA CARVALHO SANTOS

RECIFE/PE

2014

JOELMA CARVALHO SANTOS

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO
(SNP) E EXPRESSÃO DOS GENES DAS CITOCINAS IFN- α 1,
IFN- γ E DO RECEPTOR IFN- α r1 EM RELAÇÃO À
QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL EM PACIENTES COM
HEPATITE B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças infecciosas e parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

RECIFE/PE

2014

S237a Santos, Joelma Carvalho.
Análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) e expressão dos genes das citocinas IFN- α 1, IFN- γ e do receptor IFN- α r1 em relação à quantificação da carga viral em pacientes com hepatite B / Joelma Carvalho Santos. – Recife: O autor, 2014.
96 f.: il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014. Inclui referências, apêndice e anexos.

1. Vírus da Hepatite B. 2. Polimorfismo de nucleotídeo Único. 3. Interferon- α . 4. Interferon gama. 5. Expressão Gênica. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-049)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

JOELMA CARVALHO SANTOS

No dia 20 de Fevereiro de 2014, às 08h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP, os Membros Doutores: o **Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto (UFPE) – Presidente da Banca**, a **Profª Profª. Drª. Regina Célia Moreira (IAL/SP)** e a **Profª. Drª. Adriana Vieira Gomes (UPE)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram a mestranda **JOELMA CARVALHO SANTOS** sobre a sua Dissertação intitulada “ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNP) E EXPRESSÃO DOS GENES DAS CITOCINAS IFN- α 1, IFN- γ E DO RECEPTOR IFN- α r1 EM RELAÇÃO À QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL EM PACIENTES COM HEPATITE B”, a qual foi orientada pela **Profª. Drª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Aprovada

Profª. Drª. Regina Célia Moreira

Aprovada

Profª. Drª. Adriana Vieira Gomes

Aprovada

Prof. Dr. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Profª. Drª. Regina Célia Moreira

Profª. Drª. Adriana Vieira Gomes



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Souza Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlaudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, irmão, namorado e familiares que foram fundamentais neste processo e sempre me incentivaram.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho pela paciência na orientação e incentivo ao longo do mestrado.

Aos médicos, principalmente Dr. Edmundo, Andrea Dória, Michele Godoy e Rosileide Alves. À Isolda Moura e Cícera, e a todos os pacientes do ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas (UFPE) e do Serviço de Assistência Especializada Dr. Helvio Auto, (UNCISAL) que aceitaram participar da pesquisa.

A todos do Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA/UFPE) e da Pós-Graduação em Medicina Tropical.

À Dayse Vasconcelos por toda paciência, amizade e incentivo em todas as etapas dessa dissertação.

A todos meus amigos: Bárbara Camboim, Augusto Rubim, Roberta Patrícia, Regina Lúcia, Kívia Queiroz e Tatiana Magalhães pelo companheirismo e carinho.

RESUMO

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e a expressão variante dos genes das citocinas IFN- α 1, IFN- γ e do receptor IFN- α r1 em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV), podem ser considerados fatores etiopatogênicos relacionados aos níveis séricos do HBV, resultando em complicações da doença. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar a associação entre as frequências genotípicas e proporções alélicas dos genes *IFNG*, *IFNA1*, *IFNAR1* em relação aos níveis de expressão desses genes e à carga viral do HBV, em pacientes com infecção crônica pelo HBV sem tratamento antiviral. Foi realizado um estudo de caso-controle com amostras de sangue total de 208 indivíduos (94 pacientes com infecção crônica e 114 indivíduos imunes ao HBV) no período de outubro de 2012 a agosto de 2013, no ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e no Hospital Escola Dr. Helvio Auto da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (HEHA/UNCISAL). Para a identificação dos polimorfismos foi utilizada a PCR em tempo real (qPCR) de acordo com técnica de alta resolução de melting (HRM). A quantificação da carga viral e a expressão absoluta dos genes *IFNG* (-5 A>G), *IFNA1* (-2 C>T), *IFNAR1* (-97 T>C) foram realizadas por qPCR. Em todos os pacientes com infecção crônica pelo HBV os níveis de expressão foram menores para o gene *IFNA1* (mediana=2,56x10⁻¹ng/μL), em relação aos genes *IFNG* (mediana=4,54x10⁵ng/μL) e *IFNAR1* (mediana=6,92x10⁹ng/μL), e a média de carga viral foi de 3,2 log₁₀. Pacientes com genótipo heterozigoto *IFNA1*(-2) CT e alelo polimórfico *IFNA1* (-2) T apresentaram maiores chances de desenvolver proteção pelo HBV quando comparados a indivíduos imunes com genótipo *IFNA1*(-2) CC e alelo tipo selvagem C, respectivamente (*IFNA1* CT/CC: OR=0,45; p=0,01 e *IFNA1* T/C: OR=0,54; p<0,01). Em pacientes com infecção crônica e genótipo tipo selvagem TT do *IFNAR1*, os baixos níveis de expressão do gene desse receptor, quando comparado aos outros genótipos, explicam em 40% os altos níveis de carga viral desses pacientes (r²=0,40 | p=0,04) conferindo um risco para o desenvolvimento da cronicidade. Para o genes *IFNG*(-5) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de expressão e os genótipos. Assim, a presença da variante polimórfica do gene *IFNA1* (-2) em pacientes com infecção crônica, pode estar associada à proteção da cronicidade quando comparada ao grupo controle. Os altos níveis de expressão do gene *IFNAR1* e baixos níveis de *IFNA1* podem contribuir para a cronicidade nestes indivíduos. Os pacientes que com genótipo polimórfico *IFNA1* (-2) CT e alelo T apresentaram maior proteção para a cronicidade pelo HBV.

Palavras-chave: Vírus da Hepatite B. Polimorfismo de Nucleotídeo Único. Interferon alfa. Interferon gama. Expressão gênica.

ABSTRACT

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the *IFNG*, *IFNA1* and *IFNAR1* gene variant expression in patients with hepatitis B virus (HBV) chronic infection might be considered one of the etiopathogenic factors related to higher HBV viral load, which results in complications of the disease. Thereby, the present study aimed to investigate the association between genotypic and allelic frequencies with the relative expression levels of these genes and HBV viral load in chronic hepatitis B infected patients without antiviral treatment. Through a case-control study, whole blood samples of 208 patients (94 HBV chronic infected patients and 114 HBV immune subjects), were obtained from the Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (HU/UFPE) and from the Helvio Auto Hospital School of Alagoas State University of Health Sciences (HEHA/UNCISAL) from October 2010 to 2013. Genotyping was performed by real-time PCR (qPCR) according to the HRM (High Resolution Melting). Viral quantification and *IFNG* (-5 A>G), *IFNA1* (-2 C>T) and *IFNAR1* (-97 T>C) gene expression were carried out using qPCR. All patients with chronic HBV infection showed lower *IFNA1* gene expression levels (median=2.56 x10⁻¹ng/μL) in comparison to the *IFNG* gene (median=4.54 x10⁵ng/μL) and *IFNAR1* (median=6.92 x10⁹ng/μL) and the mean viral load was 3.2 log₁₀. Chronic HBV infected patients with *IFNA1* (-2) CT genotype and *IFNA1* (-2) T allele were more likely to develop protection against HBV chronicity when compared to subjects with wild-type *IFNA1*(-2) CC genotype and C allele, respectively (*IFNA1* CT/CC: OR=0.45; p=0.01 and *IFNA1*T/C: OR=0.54; p<0.01). In HBV chronic infected patients with *IFNAR1* wild-type TT genotype, the low gene expression levels of this receptor explains 40% of lower viral load levels (r²=0.40 | p=0.04) and a protection in the chronicity development for those subjects. The *IFNG*(-5) gene polymorphism did not reach statistical significance between expression levels and genotype distribution among the studied groups. Therefore, These findings suggest that the presence of a polymorphic variant of *IFNA1*(-2) gene is associated with protection against chronic HBV infection when compared with the control group, and high expression levels of *IFNAR1* gene and low levels of *IFNA1* might contribute to the chronicity in these subjects. However, in these patients, those with the *IFNA1* (-2) CT polymorphic genotype and T allele were likely to show increased protection against HBV chronicity.

Keywords: Hepatitis B virus. Single Nucleotide Polymorphism. Interferon-alpha. Interferon-gamma. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Eletromicrografia de transmissão colorida de partículas do vírus da hepatite B	14
Figura 2	Representação esquemática da partícula completa do HBV ...	15
Figura 3	Estrutura do genoma do HBV	15
Figura 4	Replicação do HBV	17
Figura 5	Resposta imune durante a infecção pelo HBV	20
Figura 6	Distribuição da infecção crônica da infecção pelo HBV no mundo	21
Figura 7	Curso sorológico típico da hepatite B aguda (I) e crônica (II) ...	23
Figura 8	Ações biológicas dos interferons tipo I	28
Figura 9	Receptores de interferon do tipo I e ativação clássica do mecanismo Jak-Stat	30

ARTIGO

Figura 1	Produtos de PCR visualizados em gel de agarose referente a expressões dos genes <i>IFNG</i> (75pb, com dímero de primer), <i>IFNAR1</i> (75pb), <i>IFNA1</i> (75pb com dímero de primer), β -actina (± 125 pb), GAPDH (± 200 pb), Ladder (L, 100pb)	59
Figura 2	Expressão gênica do <i>IFNA1</i> (-2 C>T), <i>IFNAR1</i> (-97 T>C) e <i>IFNG</i> (-5 A>G) em relação aos genótipos dos pacientes com hepatite B crônica	61
Figura 3	Expressão gênica do <i>IFNAR1</i> (-97) em relação à combinação entre os genótipos dos genes <i>IFNA1</i> (CC, CT e TT) e <i>IFNAR1</i> (TT, TC e CC) em pacientes com hepatite B crônica	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação dos polimorfismos, número de acesso do NCBI, sequências de primers para PCR, temperatura de anelamento e comprimento do amplicon para os genes <i>IFNG</i> , <i>IFNA</i> e <i>IFNAR1</i> , genes normalizadores GAPDH and β -actina e HBV	40, 57
Tabela 2	Características laboratoriais dos pacientes com hepatite B crônica, de acordo com os níveis de carga viral	59
Tabela 3	Frequência genotípica e alélica do polimorfismo dos genes do IFN- α 1, IFN- γ e IFN- α r1 em relação aos níveis de carga viral em pacientes infectados pelo HBV na fase crônica e em indivíduos imunes	60
Tabela 4	Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos <i>IFNG</i> (-5) e <i>IFNA1</i> (-2) e <i>IFNAR1</i> (-97) em relação aos níveis de carga viral e de expressão gênica	62
Tabela 5	Correlação de Spearman entre os níveis de expressão gênica e carga viral em pacientes infectados pelo vírus da hepatite B	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
Anti-HBc	Anticorpos contra o antígeno do núcleo do vírus da hepatite B
AST	Aspartato aminotransferase
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
HBcAg	Antígeno do core do vírus da hepatite B
HBeAg	Antígeno “e” da hepatite B
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	Vírus da Hepatite B
HBV-DNA	Ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B
HBxAg	Antígeno “x” da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
<i>IFNA</i>	Gene interferon alfa
<i>IFNAR1</i>	Gene receptor de interferon alfa tipo 1
<i>IFNG</i>	Gene interferon gama
IFN- α	Interferon alfa
IFN- α r1	Receptor de interferon alfa tipo 1
IFN- γ	Interferon gama
JAK	Janus quinase
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
RNA	Ácido ribonucleico
Rs	Referência da Sequência do polimorfismo SNP
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
SNP	Polimorfismo de único nucleotídeo
STAT	Transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 DESENHO DO ESTUDO	33
5.2 LOCAL DO ESTUDO	33
5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO	33
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	34
5.6 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA	34
5.7 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS	35
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
6 RESULTADOS	42
7 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	43
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45
APÊNDICES	51
APÊNDICE A – Artigo	53
APÊNDICE B – Versão do artigo em inglês	70
APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	86
ANEXOS	87
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE	88
ANEXO B – Normas para publicação da revista	91

1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de persistência e cronicidade da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) ainda não se encontram completamente esclarecidos. No entanto, alguns estudos (AIT-GOUGHOULETE et al., 2010; CONDE, 2010; KIM et al., 2012) descrevem associação entre a susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV e os fatores imunológicos do hospedeiro, principalmente em relação à idade no período de infecção, e aos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs).

Além dos SNPs, a expressão dos genes das citocinas IFN- γ e IFN- α e as variações genéticas no receptor do interferon alfa (IFN- α r1) podem constituir papel importante no clareamento ou na cronicidade nos estágios iniciais de exposição ao HBV, e ainda influenciar a patogênese da infecção crônica em longo prazo (HE et al., 2010). Zhou et al. (2007), relataram que a presença de dois polimorfismos (-408C>T e -3C>T) no *IFNAR1* estava associada à susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV. Em estudos de Fan et al. (2012), os níveis de expressão deste receptor mostraram-se positivamente correlacionados com a gravidade da inflamação hepática, sendo provável que um aumento na expressão resulte em um aumento na resposta terapêutica ao IFN- α .

Pesquisas, principalmente na população asiática (QI et al., 2005; CHEONG et al., 2006; ABBOTT et al., 2007; GAO, 2009; KIM et al., 2012), avaliaram a relação entre o polimorfismo do indivíduo e o nível sérico de citocinas relacionadas com a persistência da infecção crônica pelo HBV. No entanto, foram observadas algumas discordâncias em relação à susceptibilidade à infecção persistente pelo HBV nos grupos pesquisados, quando associados ao padrão genotípico das populações.

Uno et al. (2005) revelaram que há uma variação individual nos níveis de produção de cada IFN- α , e que podem haver diferenças consideráveis entre os níveis de produção da citocina *in vitro*, a depender do estímulo. Estas diferenças na expressão, de acordo com estes estudos, poderiam ser baseadas nas mutações no gene *IFNA*, influenciando assim o curso da infecção pelo HBV.

Em relação aos SNPs do gene do IFN- γ , Gao et al. (2009), relataram associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo *IFNG* +874 (A>T) e à susceptibilidade à infecção persistente pelo HBV e HCV (vírus da hepatite C). O genótipo AA do *IFNG* +874 além de apresentar uma maior frequência, foi associado

a um aumento no risco de persistência de infecção (cerca de 2,7 vezes) quando comparado ao genótipo TA, que apresentou, portanto, uma redução no risco de infecção persistente por HBV e menor probabilidade de desenvolvimento do HCC.

Trabalhos realizados no sul e sudeste do Brasil, apenas em pacientes com infecção pelo HBV e HCV (FALLETI et al., 2007) na fase crônica descreveram a presença de um alto grau de fibrose associada a maiores níveis séricos de IFN- γ (+874), entretanto, sem diferença estatisticamente significativa entre o tipo de polimorfismo e a atividade inflamatória em pacientes com infecção pelo HBV.

Pouca informação encontra-se disponível em relação ao polimorfismo dos genes *IFNG* -5 (A>G), *IFNA1* -2 (C>T) e *IFNAR1* -97 (T>C) nessas regiões. Desta forma, quando descritos SNPs destes genes em outras posições, observa-se que ainda há discordâncias de uma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos a serem estudados e a persistência à infecção pelo HBV.

A identificação destes SNPs e do padrão de expressão das citocinas associados à carga viral poderão ser úteis na prática clínica na estratificação dos grupos de maior ou menor risco. Além disso, favorece um melhor entendimento da resposta imunológica da hepatite B, resultando em um manejo terapêutico mais adequado para cada paciente.

Desta forma, o presente estudo busca investigar a associação entre as frequências genotípicas e proporções alélicas dos polimorfismos dos genes *IFNA1* (-5 A>G, rs202055606), *IFNG* (-2 C>T, rs181407537) e *IFNAR1* (-97 T>C, rs2850015) em pacientes com infecção crônica pelo HBV (não submetidos ao tratamento com antivirais) com os níveis de expressão dessas citocinas e com a carga viral do HBV em dois hospitais universitários nos municípios de Recife e Maceió.

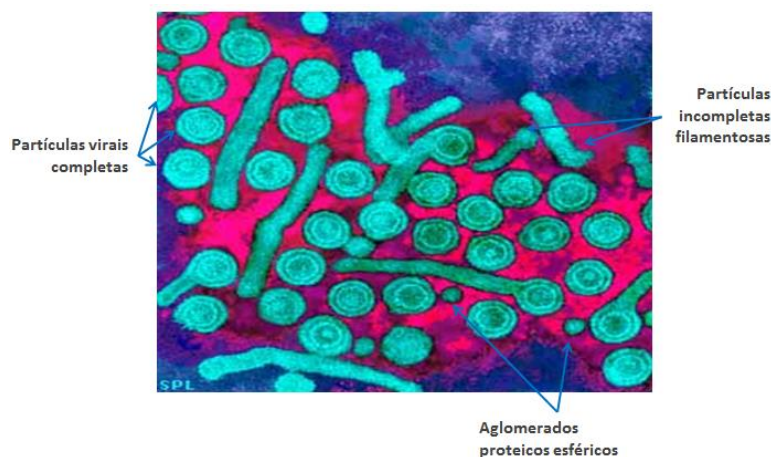
2 REVISÃO DA LITERATURA

O HBV pertence à família *Hepadnaviridae*, ao gênero *Orthohepdnavirus*, que compreende um pequeno número de vírus que compartilham várias características em comum, como tamanho, ultraestrutura da partícula viral, organização genômica, tropismo pelos hepatócitos e mecanismo de replicação do DNA viral (SANTOS et al., 2008; GANEM et al., 2004).

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO HBV

Na microscopia eletrônica é possível visualizar os diferentes tipos de partículas virais do HBV: as completas ou partículas de Dane, com um diâmetro de aproximadamente 42nm, as incompletas esféricas e as filamentosas encontradas em excesso no soro de indivíduos infectados apresentando um diâmetro de 22nm (SANTOS et al., 2008), conforme a figura 1.

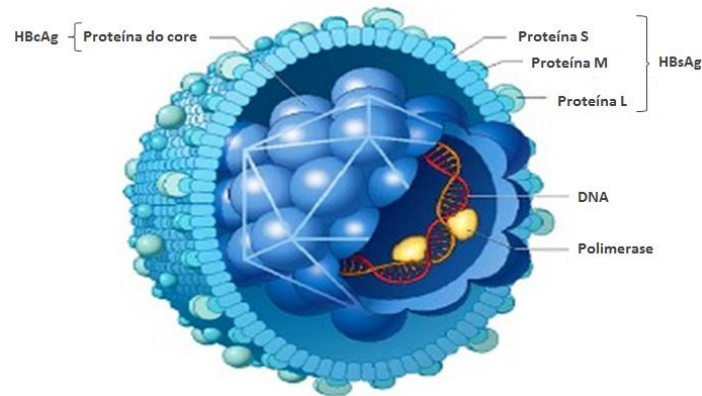
Figura 1 – Eletromicrografia de transmissão colorida de partículas do vírus da hepatite B.



Fonte: STANNARD (2012), adaptado.

As partículas virais infecciosas apresentam um envelope lipoproteico, composto pelas proteínas virais S (*small*), M (*middle*) e L (*large*), as quais constituem o antígeno de superfície do HBV (HBsAg). O nucleocapsídeo possui simetria icosaédrica, sendo constituído pela proteína do core (HBcAg) e pelo genoma viral (SANTOS et al., 2008), visualizado na figura 2.

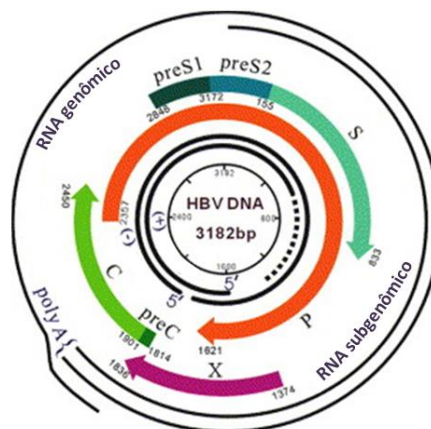
Figura 2 – Representação esquemática da partícula completa do HBV.



Fonte: PERKINS (2002), adaptado.

O genoma do HBV é um dos menores quando comparado ao genoma de outros vírus que infectam humanos, sendo composto por uma molécula de DNA circular de fita parcialmente dupla e apresenta aproximadamente 3200pb (SANTOS et al., 2008). O DNA deste vírus possui quatro regiões de transcrição (*open reading frame* - ORF) responsáveis pela codificação das principais proteínas virais, conhecidas como S, C, P e X (GANEM et al., 2004), conforme mostra a figura 3.

Figura 3 – Estrutura do genoma do HBV



Fonte: ZHANG et al. (2006), adaptado.

A ORF S codifica as proteínas de superfície do envelope viral (HBsAg), e pode ser estruturalmente e funcionalmente dividida em região pre-S1 (grande), pre-S2 (média) e S, pequena (ZHANG et al., 2006).

O gene C possui duas regiões, a pré-core, responsável pela codificação do antígeno “e” da hepatite B (HBeAg), e a core, que codifica o nucleocapsídeo viral

(HBcAg). A polimerase é codificada pela região *P*, a qual é funcionalmente dividida em três domínios: o domínio proteína terminal, sendo este relacionado ao processo de formação do capsídeo e início da síntese de fita negativa; o domínio transcriptase reversa (RT), envolvido no processo de transcrição reversa durante a replicação do HBV; e o domínio ribonuclease H, responsável por degradar o RNA pré-genômico facilitando a replicação (LIANG, 2009). O gene *X* codifica o HBxAg, que parece estar envolvido nos processos de carcinogênese, através de ativação de sinais de transcrição celulares e virais (ARAÚJO, 2008).

Com a descoberta dos genótipos do HBV, observou-se a associação entre estes subtipos e a distribuição geográfica e que através do conhecimento de espécies mutantes é possível um melhor entendimento do curso da infecção pelo HBV e uma melhor assistência aos pacientes (PAN; ZHANG, 2005). Foram descritas, dez variações genotípicas, denominados de A a J (LIN; KAO, 2011), e ainda, quatro principais antígenos de superfície: adq, ayw, adr e ayr (KHOURI; SANTOS, 2004).

2.2 CICLO BIOLÓGICO DO HBV

O HBV possui uma organização genômica única e estratégias de replicação que conferem ao vírus a habilidade de persistir em hepatócitos infectados (DANDRI; LOCARNINI, 2012). Após ligar-se ao hepatócito através de receptores de membrana que reconhecem as proteínas do envelope viral, o HBV alcança o citoplasma, migra para o núcleo e perde a proteção do nucleocapsídeo (ALVARIZ, 2006).

Ao entrar no núcleo, o HBV-DNA sofre modificações pela ação da DNA-polimerase viral resultando na formação de uma cadeia circular fechada com ligações covalentes (cccDNA). O cccDNA por ser estável é o modelo que origina o RNA mensageiro (RNAm) necessário para a síntese de proteínas e replicação viral (DANDRI; LOCARNINI, 2012).

Inicialmente a fita negativa é transcrita pela DNA polimerase da célula hepática e várias cópias de RNA pré-genômico (pgRNA) são formadas. No citoplasma, o pré-genoma é envolto pelo nucleocapsídeo e iniciada a síntese da fita positiva pela ação da transcriptase reversa. Em portadores crônicos da infecção, pode ser encontrado o HBV-DNA integrado ao DNA do hepatócito. O nucleocapsídeo é sintetizado no citosol e as proteínas do envelope no retículo endoplasmático rugoso (BECK et al., 2007). As cópias de DNA viral protegidas pelo nucleocapsídeo, que permanecem no citoplasma recebem o envelope lipoproteico e são secretadas pelo hepatócito (figura 4).

Para alguns autores, o ponto de corte da quantificação de HBV-DNA para início da terapia antiviral encontra-se acima de 2000 UI/mL (10^4 cópias/mL) para os indivíduos HBeAg negativos, e acima de 20000UI/mL (10^5 cópias/mL) para os pacientes HBeAg positivos (LIN; KAO, 2008; LOK; MCMAHON, 2007).

Nos indivíduos sintomáticos, as fases clínicas da hepatite aguda descritas são: período prodrômico ou pré-ictérico, caracterizado por sintomas inespecíficos como anorexia, náuseas, vômitos, febre baixa, diarreia e desconforto no hipocôndrio direito; a fase ictérica, ocorre em 30% dos casos e se observa hepatomegalia dolorosa, com ocasional esplenomegalia e hiperbilirrubinemia, à custa da fração direta; e a fase de convalescença, que se segue ao desaparecimento da icterícia, que ocorre após algumas semanas (BRASIL, 2009).

Indivíduos com infecção crônica pelo HBV podem apresentar tanto um estado de imunotolerância, quanto hepatite crônica com HBeAg positivo, negativo ou portador inativo (PUNGPAPONG et al., 2007).

A hepatite crônica pelo HBV é caracterizada por sinais histológicos de agressão hepática e marcadores sorológicos ou virológicos de replicação viral (HBeAg), assim, os sintomas dependem do grau de dano hepático (BRASIL, 2009).

2.3.1 Hepatite B e Carcinoma Hepatocelular (HCC)

Devido à variação bastante heterogênea dos desfechos da infecção pelo HBV, estima-se que a incidência anual de cirrose e de HCC encontra-se entre 2-10% e 1-3% respectivamente. Entre os fatores associados com a progressão da doença, os desequilíbrios nas reações inflamatórias (HAN et al., 2011) e o genótipo do HBV (LIN; KAO, 2011) constituem importante papel na hepatocarcinogênese induzida pelo HBV. Além de preditivo para o desfecho clínico, o genótipo do HBV também está associado à resposta ao tratamento com interferon (LIN; KAO, 2011).

O HCC é a terceira causa mais comum de morte por câncer no mundo, resultando em cerca de 598.000 mortes por ano. De uma perspectiva geral, os vírus da hepatite B e C mostram-se como os dois mais importantes fatores de risco, e devido ao baixo prognóstico desta doença, busca-se desenvolver novos modelos preditivos que auxiliem na sobrevivência do paciente e na melhor opção de tratamento (BUT et al., 2008).

Como o risco de desenvolvimento do HCC está diretamente relacionado ao *status* da infecção crônica pelo HBV (BUT et al., 2008), a incidência anual de HCC é de apenas 0,1% em indivíduos portadores de HBsAg assintomáticos. No entanto, esse risco aumenta para 1% em pacientes com hepatite B crônica, e agrava para 3-10% em pacientes com cirrose (CHU, 2000).

Em relação à carga viral, Huang et al. (2011) observaram que indivíduos asiáticos que adquiriram a infecção pelo HBV em idade mais avançada apresentavam carga viral mais elevada, o que consequentemente está associado ao risco aumentado de cirrose e HCC. No entanto, nos estudos de Chen et al. (2005), a alta quantificação do HBV-DNA (≥ 10000 cópias/mL) mostrou-se forte preditor no desenvolvimento do HCC independente dos níveis de HBeAg e ALT, e da presença de cirrose hepática.

2.4 IMUNOPATOGENIA DO HBV

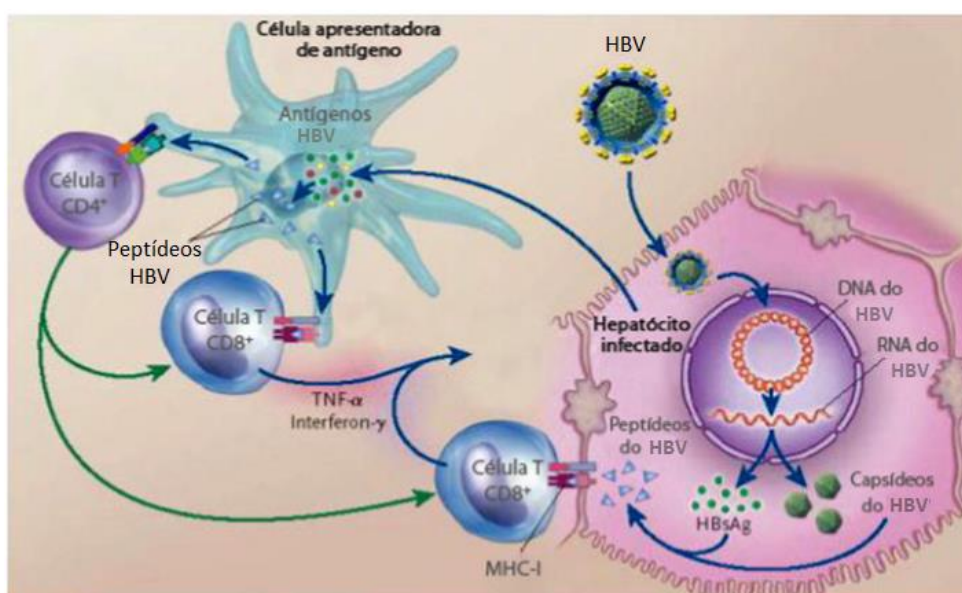
O HBV, isoladamente, é visto na maioria das vezes como um vírus não citopático. Assim, suspeita-se que as alterações hepáticas associadas à hepatite B decorram principalmente da resposta imune direcionada contra os antígenos do vírus. Diferentemente da função conhecida da resposta imune adaptativa na resolução da infecção pelo HBV, a contribuição dos mecanismos da imunidade inata não se encontra completamente esclarecida, principalmente devido ao diagnóstico tardio da infecção pelo HBV (AIT-GOUGHOUTE et al., 2010).

Células T citotóxicas e células *natural killers* (NK) têm papel importante na infecção e células T CD4⁺ facilitando tanto as respostas T citotóxicas, quanto as repostas por células B. Diversos mecanismos têm sido associados à persistência da infecção crônica pelo HBV, como a habilidade reduzida de células dendríticas em ativar células T a produzirem citocinas (IL-12, IFN- γ e TNF- α), a expressão reduzida do receptor TLR2 em monócitos periféricos, a redução da proliferação de células T CD4⁺ e da atividade citotóxica de células T CD8⁺ (CHANG; LEWIN, 2007).

A fase inicial da replicação do HBV é reduzida em consequência da inibição do vírus pela resposta imune inata, que nesta fase é caracterizada pela produção de interferons do tipo I (α e β), induzidos pela presença de DNA viral, e pela ativação de células NK, resultantes do stress molecular induzido e pela modulação de moléculas do MHC de classe I na superfície das células infectadas (KONDO et al., 2009).

A resposta imune adaptativa contra o HBV, como pode ser observado na figura 5, compreende vários tipos de células efectoras, como as células T *helper* CD4⁺ do tipo I (Th1) produtoras de citocinas do tipo I e que auxiliam no desenvolvimento de células T citotóxicas CD8⁺. Enquanto que as células T *helper* CD4⁺ do tipo II (Th2) produtoras de citocinas do tipo II são recrutadas na produção de anticorpos por células B. As células T citotóxicas podem reconhecer antígenos virais apresentados por moléculas de MHC de classe I e eliminar os hepatócitos infectados pelo HBV tanto por mecanismos citolíticos, como não citolíticos (CHANG, 2010).

Figura 5 – Resposta imune durante a infecção pelo HBV



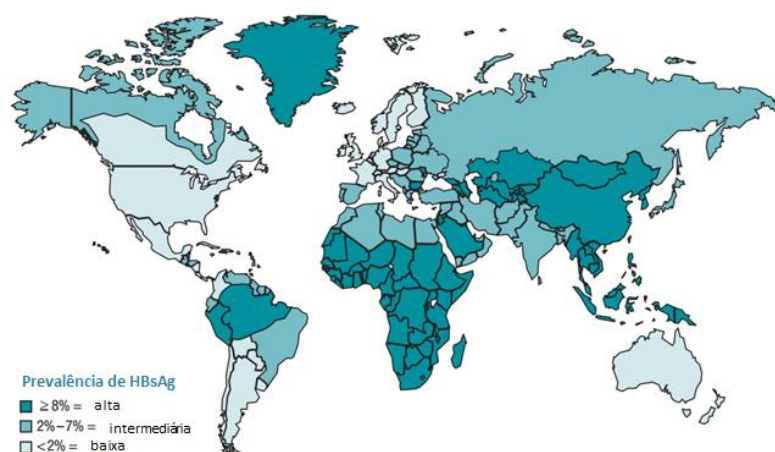
Fonte: GANEM et al. (2004), adaptado.

Entretanto, a indução da tolerância causada por células T regulatórias (T_{reg}) e as condições hepáticas são possíveis fatores responsáveis por uma supressão eficiente das respostas imunes (KONDO et al., 2009). Células T_{reg} naturais têm papel importante na manutenção da auto tolerância e controle negativo em diversas respostas imunes fisiológicas e patológicas. Estas células expressam um fator de transcrição 3 (Foxp3), uma cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (CD25+) e um gene do receptor de TNF induzido por glicocorticoide (*GITR*), que resultam na inibição das funções efectoras antivirais e apoptose das células T (SAKAGUCHI et al., 2005).

2.5 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DO HBV

A infecção pelo HBV constitui importante problema de saúde pública, associado a significativa morbidade e mortalidade por doença crônica do fígado (LYRA et al., 2010). No mundo, segundo a World Health Organization (WHO, 2013), estima-se que dois bilhões de pessoas vem sendo infectadas pelo HBV e cerca de 600 mil pessoas morrem todos os anos em consequência da hepatite B (figura 6). Enquanto que no Brasil, a prevalência de positividade sorológica indicativa de exposição a essa infecção (anti-HBc), na faixa etária entre 10 e 69 anos, foi de 7,4% (PEREIRA et al., 2010).

Figura 6 – Distribuição da infecção crônica da infecção pelo HBV no mundo.



Fonte: CDC (2006), adaptado.

O HBV é transmitido pelo sangue via parenteral (compartilhamento de objetos contaminados, transfusão de sangue, acidentes com exposição a material biológico e procedimentos cirúrgicos, odontológicos e de hemodiálise em que não se aplicam às normas adequadas de biossegurança), via vertical (exposição ao líquido amniótico) e via sexual, pelo espermatozoides e secreção vaginal (WHO, 2013)

O modo de transmissão é o mesmo do HIV, no entanto, o HBV é cerca de 50 a 100 vezes mais infeccioso, pois ao contrário do HIV, pode sobreviver fora do corpo por até sete dias, e durante esse período, o vírus pode ainda causar infecção em indivíduos não protegidos pela vacina (WHO, 2013).

Em relação à prevalência da hepatite B, alguns estudos do final da década de 80 e início de 90 sugeriram uma tendência crescente do HBV nas regiões Sul e Norte (BRASIL, 2009). No entanto, segundo o último Estudo de Prevalência de Base

Populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C, realizado entre 2005 e 2009 em todas as 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal realizado por Pereira et al. (2010), observou-se que a incidência da infecção pelo HBV aumenta com a idade permanecendo com força similar nas três regiões, classificando o conjunto das capitais do Brasil como de baixa endemicidade.

A prevalência da infecção entre os indivíduos não vacinados foi de aproximadamente 10%, enquanto entre os vacinados foi de 4,3%. Neste estudo de base populacional, observou-se a presença dos genótipos A e F na região Nordeste, e dos genótipos A, D e F na região Centro-Oeste, observou-se ainda uma prevalência maior da infecção entre os homens, relacionadas ao maior risco de exposição ao vírus, e idade de iniciação sexual (PEREIRA et al., 2009).

No Brasil, a taxa passou de 0,5%, em 1999, para 5,6%, em 2009. A região Sul registra os maiores índices desde 2002, seguida do Norte. As taxas observadas nessas duas regiões, em 2009, foram de 13,3 e 12,6 por 100 mil habitantes, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

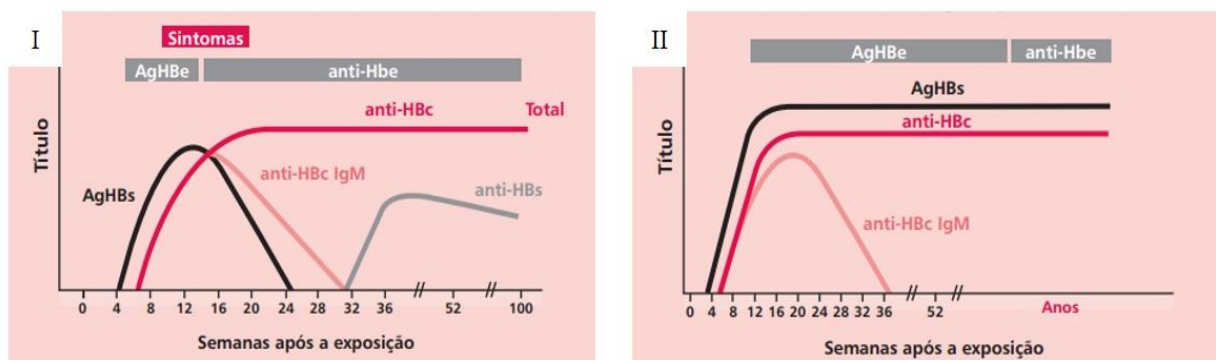
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HBV

Os testes de função hepática, principalmente os níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT), apesar de ser um indicador sensível do dano do parênquima hepático, não é específico para o diagnóstico da hepatite B. Desta forma, devem ser utilizados os testes sorológicos e de biologia molecular específicos (BRASIL, 2009), tanto para diagnosticar e monitorar indivíduos infectados pelo HBV, quanto para distinguir as fases aguda e crônica da infecção (WHO, 2013).

Os métodos sorológicos utilizados para diagnóstico são: o ensaio imunoenzimático (ELISA), o ensaio enzimático de micropartículas (MEIA), e a quimioluminescência, enquanto que os testes rápidos de triagem desenvolvidos para o diagnóstico da hepatite são utilizados principalmente em bancos de sangue, onde são pesquisados o HBsAg e o anti-HBc total (BRASIL, 2009).

No diagnóstico sorológico específico, o HBsAg é o primeiro a surgir no curso da infecção (30 a 45 dias), e pode permanecer detectável por até 120 dias nos casos de hepatite aguda. Ao persistir por mais de seis meses caracteriza a infecção crônica (figura 7). Deve-se considerar, no entanto, o período de janela imunológica da hepatite B, que varia entre 30 a 60 dias para testes sorológicos, e cerca de 42 dias para reação em cadeia da polimerase - PCR (BRASIL, 2008).

Figura 7 – Curso sorológico típico da hepatite B aguda (I) e crônica (II).



Fonte: BRASIL, 2008.

O anti-HBc IgG (anticorpos IgG contra o antígeno do core do HBV) é o marcador que indica contato prévio com o vírus. Permanece detectável por toda a vida nos indivíduos que tiveram infecção. O anti-HBc total é utilizado na triagem para a hepatite B por determinar a presença de anticorpos tanto da classe IgM quando da classe IgG e encontra-se presente nas fases aguda e crônica por aproximadamente 6 meses (BRASIL, 2009).

O HBeAg na infecção crônica indica presença de replicação viral, enquanto o anti-HBe sugere redução ou ausência de replicação viral, com exceção das cepas mutantes não produtoras de proteína “e” (BRASIL, 2009). Nestes casos, o emprego de técnicas para quantificação do DNA viral é extremamente útil, auxiliando na identificação do portador inativo e do portador de hepatite crônica “e” negativo (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

A genotipagem do HBV e a quantificação da carga viral por PCR em tempo real (qPCR) são recomendadas para a pesquisa das possíveis mutações da DNA polimerase, para o acompanhamento do paciente em tratamento antiviral, facilitando a identificação precoce da resistência viral. Contudo, no Brasil ainda não fazem parte da rotina por serem técnicas de alto custo e que requerem padronização (MATTOS; DANTAS-CORREA, 2010).

2.7 POLIMORFISMO DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPs)

Os SNPs são uma das formas mais comuns de variação genética no genoma humano. Sua presença em diversos genes relacionados à resposta imune pelo HBV tem se mostrado associada à diversidade no desfecho desta infecção, principalmente

à infecção persistente, à resposta clínica e aos danos hepáticos (GAO et al., 2009). Assim, alguns polimorfismos podem propiciar cronicidade na infecção do HBV e subsequente desenvolvimento do HCC (KIM et al., 2012).

Muitas destas variações polimórficas são neutras e não interferem na regulação e função dos genes, no entanto, alguns destes SNPs conferem modificações regulatórias que levam às diferenças na expressão gênica, resposta aos fármacos e susceptibilidade à doenças (WANG et al., 2005).

As citocinas interferon alfa (IFN- α) e interferon gama (IFN- γ) têm sido descritas como importantes reguladoras do aumento da transcrição de proteínas relacionadas à redução da replicação do HBV (NOGUCHI et al., 2007). E o polimorfismo no gene destes inteferons influencia a atividade imunomodulatória das citocinas envolvidas no processo de supressão da replicação viral (IFN- α , IFN- γ , TNF- α e IL-6) e na inibição da ativação de células T por IL-10, TGF- β (RIBEIRO et al., 2007).

No Brasil, Corrêa et al. (2012) identificaram a presença de polimorfismos no locus HLA-DR1 entre doadores de sangue da Fundação Hemope e verificaram associação entre a presença dos alelos DRB1*08 e DRB1*09 em doadores de sangue mais jovens do sexo masculino, quando comparados com indivíduos na fase crônica da infecção pelo HBV.

Assim, diversos fatores como o padrão de secreção de citocinas e os polimorfismos nestes genes influenciam as manifestações clínicas da hepatite B crônica. Estas manifestações resultam da interação de fatores inerentes ao hospedeiro, ao vírus e as condições ambientais, principalmente a idade e o padrão imunológico do indivíduo infectado (CONDE, 2010).

2.8 INTERFERON GAMA

2.8.1 Proteína, localização gênica e citogenética

O IFN- γ , também chamado interferon imune, é uma citocina produzida por células NK, células Th1 CD4⁺ e células T CD8⁺. É considerada a principal citocina ativadora dos macrófagos nas respostas imune inata e adquirida mediada por células (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

O gene *IFNG* é responsável pela codificação de um membro da família de interferon tipo II, o IFN- γ (NCBI GENE, 2014a). Este gene está localizado no braço

longo do cromossomo 12 na região 1, banda 4 (12q14). Mais precisamente, o gene *IFNG* está localizado entre os pares de base 68, 548, 549 aos pares 68, 553, 520 no cromossomo 12 (MCKUSICK, 2012).

2.8.2 Função biológica do IFN- γ

O IFN- γ possui alguma atividade antiviral, mas não é um interferon antiviral potente, e age principalmente como uma citocina efetora das respostas imunes (ABBAS et al., 2008). Esta citocina apresenta diversos efeitos na imunidade celular, como a expressão de moléculas MHC classe I e II, diferenciação de células CD4⁺ *naïves* para Th1, inibição da proliferação celular Th2, ativação de funções efetoras microbidas, imunomodulação e ativação de neutrófilos (SCHRODER et al., 2004).

2.8.3 SNPs no gene *IFNG*

Diversas doenças inflamatórias e autoimunes apresentam variados níveis de expressão do gene *IFNG*. A importância do IFN- γ no sistema imune se dá devido à habilidade de inibir a replicação viral diretamente e aos efeitos imunoestimulatórios e imunomodulatórios (McKUSICK, 2012).

Alguns estudos, principalmente na população asiática (QI et al., 2005; CHEONG et al., 2006; ABBOTT et al., 2007; GAO, 2009; KIM et al., 2012), avaliaram a relação entre o polimorfismo do indivíduo e o nível sérico de citocinas relacionadas com a persistência da infecção crônica pelo HBV. No entanto, foram observadas algumas discordâncias em relação à susceptibilidade à infecção persistente pelo HBV nos grupos pesquisados, quando associados ao padrão genotípico das populações.

Nieters et al. (2005) e Ognjanovic et al. (2009) investigaram a presença de uma correlação entre polimorfismos nos genes de algumas citocinas relacionadas às repostas Th1 (*IFNG*, *IL12* e *IL18*) e Th2 (*IL4* e *IL10*) com o desenvolvimento do HCC. No entanto, indivíduos infectados pelo HBV com uma baixa atividade genotípica Th1 e maior atividade de Th2 não apresentaram aumento estatisticamente significativo no risco de desenvolvimento do HCC.

Entre os polimorfismos no gene do IFN- γ , o SNP *IFNG* +874 A>T foi avaliado com maior frequência (LIU et al., 2006; ABBOTT et al., 2007; PENG et al., 2007; GAO et al., 2009; KIM et al., 2013). Liu et al. (2006) observaram frequência

significativamente maior do alelo selvagem A (*IFNG* +874) com um risco de 2,25 vezes em pacientes com hepatite B, quando comparados com controles imunes.

Gao et al. (2009), estudando o polimorfismo *IFNG* +874 (A>T) e a susceptibilidade à infecção pelos vírus B e C, identificaram associação estatisticamente significativa. O genótipo AA do *IFNG* +874 além de apresentar uma maior frequência, foi associado a um aumento de 2,7 vezes no risco de persistência de infecção e cirrose quando comparado ao genótipo TA.

Segundo Hoffmann et al. (2002) na população asiática observou-se uma maior frequência do alelo A do *IFNG* (+874), o qual resultou em uma expressão mais baixa deste interferon, quando comparada com a população caucasiana. Sugerindo assim a possibilidade de uma associação entre os níveis baixos de expressão do IFN- γ e a alta susceptibilidade da população asiática ao HBV.

Entretanto, outros autores (NIETERS et al., 2005; CHEONG et al., 2006; PENG et al., 2007; OGNJANOVIC et al., 2009) não encontraram associação entre a susceptibilidade à persistência da infecção pelo HBV naquela região. Assim, Martin et al. (2009) sugeriram que os baixos níveis de IFN- γ poderiam indicar a possibilidade desta citocina não apresentar um papel importante, ou que a ausência desta contribui para a persistência viral.

Pesquisas realizadas no sul e sudeste do Brasil, apenas em indivíduos com hepatite B e C (FALLETTI et al., 2007) na fase crônica descreveram a presença de um alto grau de fibrose associada a maiores níveis séricos de IFN- γ , entretanto, sem diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo *IFNG* +874 (A>T), e a atividade inflamatória em portadores do vírus B.

Outros SNPs no gene do IFN- γ descritos na literatura também na população asiática encontram-se nas regiões -179 G>T e +445 C>T (BREAM et al., 2002), -183 G>T (CHEVILLARD et al., 2002; QI et al., 2005) e -155 A>G (QI et al., 2005).

Segundo Bream et al. (2002), a presença do alelo *IFNG* -179T é responsável pela indução da produção de TNF- α e de algumas das alterações imunes responsáveis pela patogênese. Qi et al. (2005) ao avaliarem o polimorfismo *IFNG* -183G>T, observaram que indivíduos com o genótipo GG mostram um risco 4,5 vezes maior de susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV quando comparados a controles imunes com os genótipos mutantes GT e TT. No entanto, não detectaram o SNP na posição -155 do *IFNG* na população analisada.

De acordo com Abbott et al. (2007), a ausência de SNPs nas posições -179 e -155 do *IFNG*, em indivíduos estudados na população de *Niue Island*, assim como de gestantes de outras ilhas da Polinésia, excluem a possibilidade de que os polimorfismos potencialmente funcionais nas regiões promotoras do *IFNG*. No entanto, estudos anteriores mostraram associação entre a presença dos SNPs nas posições 179 G>T (BREAM et al., 2002), e 155 A>G (CHEVILLARD et al., 2002). O que levaria a suposição de que estes polimorfismos não seriam necessários para a produção de INF- γ .

O SNP do gene *IFNG* (rs181407537) foi selecionado no presente estudo por encontrar-se localizado na região promotora do *IFNG*, na posição 5, onde há a substituição do nucleotídeo adenina pela guanina, sendo G o alelo mutante (*IFNG* -5 A>G) e poderá apresentar importância na susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV. Embora, não tenham sido encontrados na literatura pesquisada estudos relacionados a este polimorfismo nesta posição.

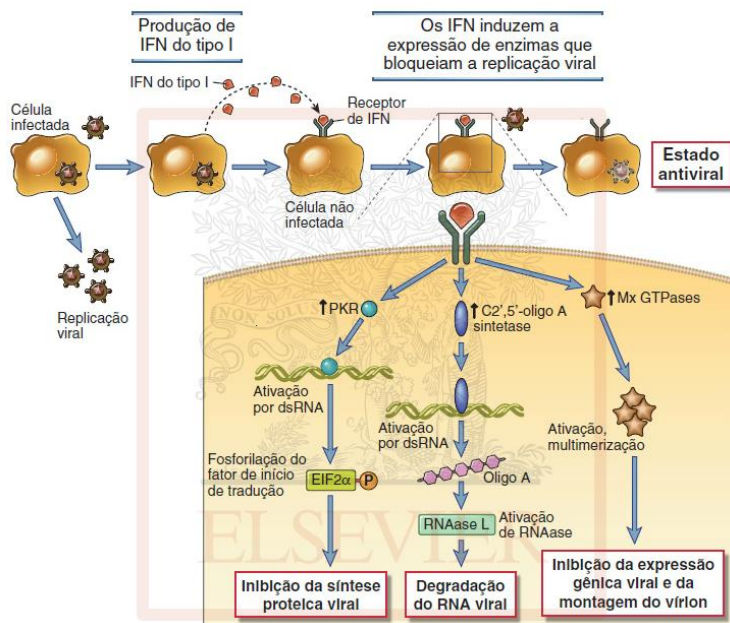
2.9 INTERFERON ALFA

2.9.1 Proteína, localização gênica e citogenética

O *IFNA* é o gene responsável pela codificação de uma proteína produzida pelos macrófagos e que possui potente atividade antiviral, o IFN- α (NCBI GENE, 2014b). Este gene está localizado no braço curto (p) do cromossomo 9 na região 2, banda 2 – 9p22 (MCKUSICK, 2012). O IFN- α 1, é um interferon do tipo I produzido principalmente por fagócitos mononucleares e células dendríticas plasmacitoides (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

2.9.2 Função biológica do IFN- α 1

Por ser um IFN do tipo I, esta citocina inibe a replicação viral, aumenta o potencial lítico de células NK, a expressão de moléculas do MHC classe I nas células infectadas por vírus e estimula o desenvolvimento de células Th1 em humanos como pode ser observado na figura 8 (ABBAS; LICHTMAN, 2012).

Figura 8 - Ações biológicas dos interferons tipo I

Fonte: ABBAS et al. (2012).

2.9.3 SNPs no gene *IFNA1*

Uno et al. (2005) mostram que há uma variação individual nos níveis de produção de cada IFN- α , e que podem haver diferenças consideráveis entre os níveis de produção da citocina *in vitro*, a depender do estímulo. Estas diferenças na expressão, de acordo com estes estudos, poderiam ser baseadas nas mutações no gene *IFNA*, influenciando assim o curso da infecção pelo HBV.

Song et al. (2006) avaliaram mutações na região promotora do *IFNA2* em pacientes vietnamitas infectados e não infectados pelo HBV. O estudo mostrou uma frequência significativa de uma deleção na região promotora do *IFNA2* nos pacientes infectados, quando comparados aos indivíduos controle. Indicando que a deleção na região promotora do gene *IFNA2* reduz a transcrição desse gene *in vitro*. E que esta redução poderia explicar os diferentes níveis de interferon em cada indivíduo, podendo ainda ser considerada uma das causas da susceptibilidade à infecção pelo HBV.

Kimkong et al. (2013) ao avaliarem a associação entre o risco de cronicidade pelo HBV e polimorfismos na região promotora do *IFNA1* (-1823 G>A) e *IFNA5* (-2529 A>T) na população tailandesa, identificaram uma associação estatisticamente significativa entre a presença do alelo A do SNP -1823 G>A e o risco de infecção crônica pelo HBV, quando comparados com indivíduos imunes e com hepatite B auto-

limitada. Indivíduos com genótipo AA apresentaram um risco 2,79 vezes maior de cronicidade pelo HBV quando comparado com os genótipos mutantes GG e GA.

Ainda no mesmo estudo, Kimkong et al. (2013) testaram associações entre as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos nos dois genes com a carga viral e enzimas hepáticas ALT e AST e não encontraram diferença estatisticamente significativa entre essas variáveis.

O SNP do gene *IFNA1* (rs202055606) foi selecionado no presente estudo por encontrar-se localizado na região promotora do *IFNA1*, na posição 2, onde há a substituição do nucleotídeo citosina pela timina, sendo T o alelo mutante (-2 C>T) e poderá apresentar importância na susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV. No entanto, não foram encontrados na literatura pesquisada estudos relacionados a este polimorfismo nesta posição.

2.10 SUBUNIDADE 1 DO RECEPTOR DO INTERFERON ALFA

2.10.1 Proteína e localização gênica e citogenética

O *IFNAR1* é o gene responsável pela codificação de uma proteína de membrana que constitui uma das duas cadeias dos receptores dos interferons alfa e beta, o IFN- α r1. A codificação desta proteína funciona, ainda como importante fator antiviral (NCBI GENE, 2014c). Este gene apresenta 11 éxons (LUTFALLA et al., 1990) e está localizado no braço longo do cromossomo 21 na região 2, banda 2, sub-banda 1 (21q22.11) (MCKUSICK, 2012).

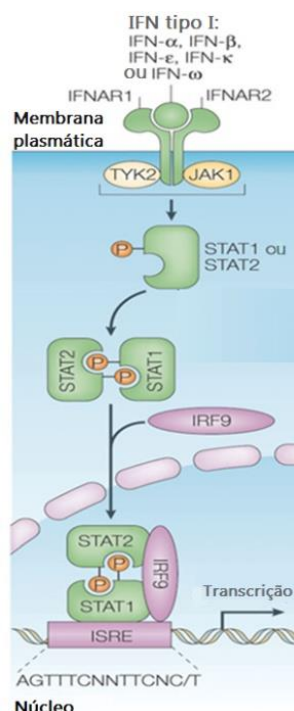
O receptor de superfície celular do IFN- α é um membro da família de receptores de citocinas tipo II, composto pelas subunidades IFN α r1 e IFN α r2, as quais estão associados respectivamente a duas tirosinas quinases da família Janus, a TYK2 e JAK1 (ABBAS; LICHTMAN, 2009).

2.10.2 Função biológica do IFN- α r1

A ligação do IFN- α 1 ao receptor IFN- α r resulta na ativação de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), as quais induzem a expressão de genes cujos produtos interferem na replicação viral (UZÉ et al., 2007). A ativação das JAKs que estão associadas ao IFN- α r1 resulta na fosforilação em tirosina das STAT1 e STAT2, que leva à formação de complexos STAT1-STAT2-IRF9

(fator regulador de interferon 9), conhecidos como ISGF3 (fator gênico 3 estimulado por interferon). Estes complexos se translocam para o núcleo e se ligam a elementos responsáveis pela estimulação de interferon (ISRE) no DNA para iniciar a transcrição gênica, como pode ser observada na figura 9 (PLATANIAS, 2005).

Figura 9 - Receptores do interferon do tipo I e ativação clássica do mecanismo JAK-STAT



Fonte: PLATANIAS (2005), adaptado.

2.10.3 SNPs no gene *IFNAR1*

As variações genéticas no *IFNAR1* podem constituir um papel importante no clearance ou na cronicidade nos estágios iniciais de exposição ao HBV, e ainda influenciar a patogênese da infecção crônica, em longo prazo (HE et al., 2010). Zhou et al., (2007) relataram que os alelos -408C e -3T deste receptor, estavam associados à susceptibilidade a infecção crônica pelo HBV.

Em estudos de Fan et al. (2012), os níveis de expressão da subunidade 2 deste receptor mostraram-se positivamente correlacionados com a gravidade da inflamação hepática, sendo provável que um aumento na expressão resulte em um aumento na resposta terapêutica ao IFN-α.

Song et al. (2008) ao avaliarem dois polimorfismos no gene do *IFNAR1* (rs1012335 G>C e rs2257167 C>G), observaram que indivíduos com o alelo mutante C *IFNAR1* (rs1012335 G>C) apresentaram um risco 2,6 maior no desenvolvimento da cronicidade pelo HBV quando comparados a controles imunes. Da mesma forma, o genótipo mutante CC desse polimorfismo mostrou-se associado a altas concentrações de ALT e AST nos pacientes. Em relação ao SNP *IFNAR1* rs2257167 C>G, a troca do aminoácido valina (GTT) pela leucina (CTT) em ambos os cromossomos foi considerada fator de proteção (OR=0,54) para os indivíduos imunes.

O SNP do gene *IFNAR1* (rs2850015) que será analisado no presente estudo poderá apresentar importância por encontrar-se localizado na região promotora do *IFNAR1*, na posição 97, onde há a substituição do nucleotídeo timina pela citosina, sendo C o alelo mutante (-97 T>C).

Não foram encontrados estudos na literatura pesquisada que relacionem este polimorfismo na posição 97 da região promotora do gene *IFNAR1* com a susceptibilidade à infecção pelo HBV. Embora, quando analisados em relação à progressão e susceptibilidade ao HIV-1 (DIOP et al., 2006) e à resposta ao IFN- α em casos de leucemia mieloide crônica (KREIL et al., 2010) não foram identificadas associações significativas.

Diante do exposto, o padrão polimórfico das populações pode apresentar-se distribuído de forma diferenciada, assim identificar de polimorfismos nos genes das citocinas *IFNG* (rs181407537), *IFNA1* (rs202055606) e do receptor *IFNAR1* (rs2850015) que possam estar associados aos níveis séricos de carga viral e expressão desses genes pode constituir um fator importante na análise do perfil clínico desses pacientes.

4 OBJETIVOS

Descrição dos objetivos gerais e específicos.

4.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação entre as frequências genotípicas e proporções alélicas dos polimorfismos nos genes *IFNA1* (-5 A>G, rs202055606), *IFNG* (-2 C>T, rs181407537) e *IFNAR1* (-97 T>C, rs2850015) com os níveis de expressão desses genes, e carga viral em pacientes infectados pelo HBV na fase crônica, não submetidos a tratamento com antivirais, atendidos no Hospital das Clínicas/UFPE (Recife-PE) e no Hospital Escola Dr. Helvio Auto/UNCISAL (Maceió-AL).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em pacientes com infectados pelo HBV na fase crônica e indivíduos imunes:

- Verificar a associação das frequências genotípicas e alélicas em pacientes na fase crônica da hepatite B e indivíduos imunes pelo HBV e níveis de expressão gênica.

Apenas em pacientes cronicamente infectados pelo HBV:

- Correlacionar os níveis de expressão gênica e carga viral com os genótipos;
- Comparar os níveis de expressão do gene *IFNAR1* com os genótipos concomitantes referentes aos SNPs dos genes *IFNA1*(-2) e *IFNAR1*(-97);
- Comparar as variáveis laboratoriais (leucócitos, ALT, AST, GGT, bilirrubina total e bilirrubina indireta) com os níveis de carga viral.

5 METODOLOGIA

Descrição do desenho de estudo, local, critérios de inclusão e exclusão, definição do tamanho amostral, categorização das variáveis e coleta de dados.

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo caso-controle por ser o desenho de estudo mais adequado para investigar a existência de possível associação causal entre a exposição (SNPs nos genes das citocinas IFN- γ , IFN- α 1 e receptor IFN- α r1) e o desfecho analisado (cronicidade pelo HBV caracterizada pelos níveis de carga viral e expressão gênica).

Definição de caso:

Pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico de infecção crônica pelo HBV, que não tenham sido submetidos a tratamento com nenhum antiviral por um período superior a 6 meses. E que apresentem os marcadores sorológicos HBsAg e Anti-HBc total (ou IgG) reagentes.

Definição de controle:

Indivíduos imunes ao HBV, maiores de 18 anos e apresentando os marcadores sorológicos anti-HBs e anti-HBc total (ou IgG) reagentes e HBsAg não reagente.

5.2 LOCAL DO ESTUDO

As coletas foram realizadas no Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e no Serviço de Assistência Especializada do Hospital Escola Dr. Helvio Auto da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas. Ambos os locais são centros de referência para o tratamento de hepatite nas cidades de Recife e Maceió, respectivamente.

5.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população alvo deste estudo foi pacientes maiores de 18 anos infectados pelo HBV na fase crônica atendidos no HC/UFPE e no HEHA/UNCISAL.

5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico prévio de infecção pelo HBV na fase crônica, atendidos nos serviços de referência citados.

5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os indivíduos submetidos a qualquer tratamento antiviral por um período inferior a seis meses, co-infectados com HIV e/ou HCV e utilizando imunossupressores. Os dados foram obtidos dos prontuários disponíveis nos serviços de atendimento.

5.6 TIPO DE AMOSTRAGEM E DEFINIÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Como não foram encontrados na literatura pesquisada estudos que indiquem as frequências dos polimorfismos nas regiões promotoras analisadas, foi utilizado como base para o cálculo amostral a frequência de 5,71% (OR=4,5) observada no polimorfismo do gene *IFNG* (-183) por Qi et al. (2005).

Para obtenção do número da amostra necessária para estabelecer a associação entre a expressão gênica e alélica dos genes das citocinas IFN- α 1, IFN- γ e IFN- α r1) e os níveis de carga viral, foram utilizados os seguintes dados na função Statcalc do programa EpiInfo v.6.04d:

Frequência esperada do polimorfismo (exposição) no grupo com menor carga viral (controle): 5,71%. Odds ratio (OR): 4,5

Nível de significância: 95%

Poder do teste: 80%

Proporção do número de casos para controle: 1:1

O tamanho da amostra foi estimado em 172 indivíduos, sendo 86 casos e 86 controles.

5.7 DEFINIÇÃO E CATEGORIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS

Descrição da operacionalização, categorização das variáveis, métodos de coleta, processamento e análise das amostras.

5.7.1 Operacionalização e categorização das variáveis

Variáveis dependentes

Variável	Definição	Categorização
Carga viral	Quantificação do HBV utilizando o fluoróforo <i>Sybr Green I</i> através da técnica de qPCR.	Variável numérica contínua: Cópias de DNA-HBV/mL
Expressão dos genes das citocinas (<i>IFNG</i> , <i>IFNA1</i> e <i>IFNAR1</i>)	Refere-se à transcrição de um gene utilizando o fluoróforo <i>Sybr Green</i> através da técnica de qPCR.	Variável numérica contínua: Níveis de <i>IFNA1</i> /mL Níveis de <i>IFNG</i> /mL Níveis de <i>IFNAR1</i> /mL

Variáveis independentes

Variável	Definição	Categorização
Sexo	Refere-se ao sexo do paciente.	Variável categórica dicotômica: Masculino Feminino
Idade	Intervalo de tempo entre a data do nascimento e data de realização da coleta sanguínea (em anos).	Variável numérica discreta.
Alelo <i>IFNG</i> (-5 A>G, rs181407537)	Presença do nucleotídeo adenina ou guanina referente à posição do SNP (rs181407537) na região promotora 5 do gene do IFN- γ através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica dicotômica: Alelo A Alelo G
Alelo <i>IFNA1</i> (-2 C>T, rs202055606)	Presença do nucleotídeo citosina ou timina referente à posição do SNP (rs202055606) na região promotora 2 do gene do IFN- α 1 através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica dicotômica: Alelo C Alelo T
Alelo <i>IFNAR1</i> (-97 T>C, rs2850015)	Presença do nucleotídeo timina ou citosina referente à posição (rs2850015) na região promotora 97 do gene do IFN- α r1 através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica dicotômica: Alelo T Alelo C
Genótipos do SNP <i>IFNG</i> (-5)	Junção dos alelos A e G referente à posição do SNP (rs181407537) da região promotora do gene do IFN- γ através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica nominal: Genótipo AA Genótipo AG Genótipo GG
Genótipos do SNP <i>IFNA1</i> (-2)	Junção dos alelos C e T referente à posição do SNP (rs202055606) na região promotora do gene do IFN- α 1 através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica nominal: Genótipo CC Genótipo CT Genótipo TT
Genótipos do SNP <i>IFNAR1</i> (-97)	Junção dos alelos e T e C referente à posição do SNP (rs2850015) na região promotora do gene do IFN- α r1 através da técnica de <i>High Resolution Melting</i> qPCR.	Variável categórica nominal: Genótipo TT Genótipo TC Genótipo CC

5.7.2 Métodos de coleta de dados e amostras

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A), os pacientes enquadrados nos critérios de elegibilidade tiveram os dados referentes ao sexo e idade, tratamento antiviral e utilização de imunossupressores coletados através do prontuário disponível nos serviços de atendimento, já que os dois últimos constituíam fatores de exclusão.

Foram coletados destes pacientes 2 tubos de 4mL de sangue periférico com anticoagulante EDTA por punção venosa para extração do DNA, quantificação do HBV e detecção dos SNPs.

5.7.3 Processamento e armazenamento das amostras

Após a coleta, as amostras foram processadas no Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) ou no Centro de Patologia e Medicina Laboratorial (CPML) da Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), em no máximo 30 minutos após a coleta.

Dos dois tubos de sangue venoso coletados com EDTA, um deles foi destinado à extração do DNA genômico, e imediatamente centrifugado a 1500rpm por 10 minutos. O plasma foi aliquotado em microtubos tipo eppendorf, e assim como as células restantes da centrifugação, ambos foram homogeneizados e armazenados a -80°C para posterior extração do DNA. O segundo tubo, destinado à extração do RNAm, foi tratado inicialmente com o reagente Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare®), para isolamento das células polimorfonucleares (PBMC) do sangue periférico.

As células armazenadas em isotiocianato de guanidina, e o plasma coletado no CPML foram armazenados a -20°C até o envio para o Setor de Virologia do LIKA/UFPE, onde estas células foram mantidas a -80°C até a realização dos testes moleculares. A genotipagem dos SNPs, quantificação viral e expressão gênica foram realizadas no Setor de Virologia do LIKA/UFPE.

5.7.4 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado 1mL de sangue periférico, coletado em tubos com EDTA, através do método baseado na adição de fenol equilibrado ($\text{pH} \pm 8,0$) e clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) com uma quantificação aproximada de 500ng (100-1000ng) utilizando o quantificador de ácidos nucleicos nanodrop 2000 (ThermoScientific®).

5.7.5 Genotipagem dos SNPs

A genotipagem dos polimorfismos dos genes *IFNG* A>G (rs202055606), *IFNA1* C>T (rs181407537) e *IFNAR1* T>C (rs2850015) foi realizada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR), utilizando a técnica de *alta resolução de melting* (HRM). Para a reação de HRM utilizou-se um volume final de 10 μL , contendo 2 μL de master mix Eva Green 1x com solução de albumina bovina (BSA - Solis BioDyne®), 0,7 μL de cada primer (forward e reverse) a 10pmol/ μL e 2 μL de DNA genômico extraído.

Foram utilizadas sequências artificialmente construídas como controles positivos para os alelos selvagens e polimórficos, com amplicons de 75pb relacionados a cada um dos genótipos (tabela 1). Os genótipos heterozigotos foram obtidos através de uma mistura equimolar das sequências dos dois alelos.

A reação de amplificação constituiu-se em: desnaturação inicial a 95°C/15min, 45 ciclos a 95°C/15 segundos (desnaturação), 20 segundos a 60°C (hibridização) e uma extensão final de 25 segundos a 72°C, sob as condições de melting de aquecimento gradual de 50 a 90°C, aumentando 0,7°C a cada 7 segundos para a formação da curva de dissociação, e 90 segundos para as condições pré-melt.

5.7.6 Detecção e quantificação do HBV-DNA

O DNA do HBV foi extraído a partir de 400 μL de plasma pelo método de adição de fenol equilibrado ($\text{pH} \pm 8,0$) e clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e eluído em 100 μL de solução de re-hidratação (Tampão TE 1x), obtendo uma quantificação de 1 a 1500ng através do nanodrop (2000).

Para cada reação da qPCR utilizou-se um volume final de 10 μL , contendo 2 μL de HBV-DNA extraído, 2 μL de master mix Eva Green 1x sem BSA (Solis BioDyne®) e 0,7 μL de cada primer a 10pmol/ μL (tabela 1), com ciclos a 94°C/15min, 45 ciclos a

95°C/15 segundos, 60°C por 15 segundos, seguidos de uma extensão final de 60 segundos a 72°C. As condições de melting foram: aquecimento gradual de 50 a 90°C, aumentando 0,7°C a cada 7 segundos para a formação da curva de dissociação, e 90 segundos para as condições pré-melt, com temperatura de melting entre 80,1 a 80,6°C.

A quantificação do HBV-DNA foi obtida através de curvas de quantificação referente ao padrão internacional da organização mundial de saúde (OMS) para o DNA-HBV, referente ao *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC Code 97/746) em UI/mL e convertidas em $\log_{10}$.

O resultado da quantificação viral do HBV-DNA foi estratificado de acordo com os níveis de carga viral: baixa carga viral, quando menor que 2.000UI/mL ou 3,3 $\log_{10}$, e alta carga viral, quando maior ou igual a 2.000UI/mL ou 3,3 $\log_{10}$. Utilizou-se como ponto de corte para a carga viral os níveis preconizados no *Clinical Practice Guidelines for chronic hepatitis B infection* pelo *European Association for the Study of the Liver* (EASL, 2012) como um dos critérios de indicação para o início da terapia antiviral.

5.7.7 Extração do RNAm e construção do DNA complementar (cDNA)

A extração do RNAm foi realizada utilizando-se o PBMC armazenado em isotiocianato de guanidina (4M) pelo método de adição de fenol ácido (pH $\pm$ 5,0) e clorofórmio (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Após a extração, foi acrescentado uma solução a 0,001% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) ao RNAm e esta foi armazenada a -80°C.

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) a partir das amostras de RNAm, foram utilizados primers randômicos e a enzima transcriptase reversa do kit ImProm - II™ Reverse Transcriptase System (Promega®).

5.7.8 Expressão absoluta dos genes das citocinas

Para a quantificação da expressão dos genes das citocinas (IFN- γ , IFN- α 1 e IFN- α r1) através da técnica de RT-qPCR, foram utilizadas 5 diluições seriadas a partir da concentração inicial referente ao amplicon mais homogêneo dos indivíduos para os respectivos genes.

Para a reação de RT-qPCR utilizou-se um volume final de 10 μ L, contendo 5 μ L de master mix Sybr Green 1x, 0,7 μ L de cada primer (tabela 1) a 10pmol/ μ L e 2 μ L de

cDNA construído, com ciclos da qPCR a 94°C/15min, 45 ciclos a 95°C/15 segundos, 60°C por 20 segundos, seguidos de uma extensão final de 25 segundos a 72°C. As condições de melting foram as mesmas para genotipagem e carga viral, com temperatura de melting variando entre 88,4-89,4°C para a expressão do *IFNA1*, 88,4-89,7°C para expressão do *IFNG* e entre 75,9-76,9°C para o *IFNAR1*.

Os níveis de expressão gênica, analisados apenas para o grupo de pacientes com infecção crônica pelo HBV, foram estratificados em baixos níveis (valores abaixo da mediana do nível de expressão) e altos níveis de expressão (valores iguais ou acima da mediana do nível de expressão) correspondentes a cada um dos genes das citocinas analisadas. Para a quantificação da expressão absoluta foram utilizados como genes constitutivos (normalizadores ou *housekeepings*) o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a β -actina (tabela 1).

Tabela 1 – Identificação dos polimorfismos, número de acesso do NCBI, sequências de primers para PCR, temperatura de anelamento e comprimento do amplicon para os genes *IFNG*, *IFNA* e *IFNAR1*, genes normalizadores *GAPDH* e *β-actina*, e HBV.

Polimorfismo	Identificação	Número de acesso no NCBI	Primers PCR (Forward / Reverse)	Temperatura de anelamento	pb*
<i>IFNG</i> (-5) (rs181407537)	A → G	NM000619.2	(F): 5'-AACTACTGATTTCAACTTCTTTG-3' (R): 5'-TGAAAAGCCAAGATATAACTTGT-3'	68°C	75
Controle positivo <i>IFNG</i> (-5)	Alelo G		5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC GGA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3'		
Controle positivo <i>IFNG</i> (-5)	Alelo A		5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC GAA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3'		
<i>IFNA1</i> (-2) (rs202055606)	C → T	BC112302.1	(F): 5'-CCCATCTCAGCAAGCCCAGAA-3' (R): 5'-CACCAGGACCATCAGTAAAGCA-3'	62°C	75
Controle positivo <i>IFNA1</i> (-2)	Alelo T		5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT ATG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3'		
Controle positivo <i>IFNA1</i> (-2)	Alelo C		5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT ACG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3'		
<i>IFNAR1</i> (-97) (rs2850015)	T → C	NM000629.2	(F): 5'-GTAGAGGGGCGGTGAGAGCTA-3' (R): 5'-CGCCATCGCCCCGTCCTAAG-3'	66°C	75
Controle positivo <i>IFNAR1</i> (-97)	Alelo T		5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT GIG CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3'		
Controle positivo <i>IFNAR1</i> (-97)	Alelo C		5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT GCG CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3'		
<i>GAPDH</i>	Gene constitutivo normalizador	XM005253678.1	(F): 5'-CCAAAATCAAGTGGGGCGATG-3' (R): 5'- AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCTG-3'	50°C	200
<i>β-actina</i>	Gene constitutivo normalizador	XM005249820.1	(F): 5'- ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACG-3' (R): 5'- TCATTGCCAATGGTGATGACCT-3'	50°C	125
HBV	Carga viral	JQ000009.1	(F): 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3' (R): 5'-GAGAGAAGTCCACCACGAGTCTAGA-3'	60°C	90

*pb = Comprimento do amplicon em 'pares de bases'

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estimativa da distribuição das frequências genotípicas e proporções alélicas foi calculada pelo teste do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) para casos e controles, com o objetivo de verificar a homogeneidade da distribuição dos genótipos e a aderência entre os valores esperados e observados de acordo com o EHW.

Para verificar a associação, de forma categorizada, entre sexo, faixa etária, frequências genotípicas, proporções alélicas, carga viral e expressão gênica foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2) e o odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}). Para comparação entre genótipos e níveis de expressão das citocinas e carga viral, como variáveis contínuas, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann Whitney* para duas variáveis e o teste de *Kruskal Wallis* a partir de 3 variáveis.

Para verificar a existência da associação entre as variáveis não lineares (expressão dos genes das citocinas e carga viral) e o grau de associação (valor significativo de p), foi utilizado o coeficiente de determinação (r^2), calculado através do coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ).

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de p menor que 0,05. Para realização das análises foram utilizados os programas estatísticos *BioEstat 5.0* e *GraphPad Prism 5.0*.

5.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE como parte de um projeto maior (ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNP) EM GENES DE CITOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DESENCADEADA PELO VÍRUS DA HEPATITE B), sob o protocolo de número 96.288 (Anexo A).

6 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa serão apresentados na forma de artigo científico (Apêndice A) que será submetido ao periódico *Human Immunology*, Qualis A2, fator de impacto 2,298 (2013). Medicina II.

7 CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

- A presença do genótipo heterozigoto *IFNA1* (-2) CT e do alelo polimórfico *IFNA1* (-2) T conferem proteção contra o desenvolvimento de cronicidade pelo HBV;
- Em relação aos genes *IFNAR1* (-97 T>C) e *IFNG* (-5 A>G), não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à frequência genotípica e alélica desses genes e os níveis de carga viral quando comparado os grupos de caso e controle;

Em pacientes com infecção crônica pelo HBV:

- Os baixos níveis de expressão do gene *IFNAR1* em indivíduos com o genótipo selvagem CC conferem proteção no desenvolvimento da cronicidade em relação ao genótipo tipo heterozigoto *IFNAR1* TC.
- O alelo polimórfico *IFNG*(-5) G mostrou-se relacionado a altos níveis de carga viral, independente dos níveis de expressão do *IFNG* nesses indivíduos.
- O alelo polimórfico *IFNA1*(-2) C mostrou associação entre os altos níveis de carga viral e os baixos níveis de expressão deste gene.
- Os altos níveis de carga viral e baixos níveis de expressão gênica do *IFNAR1* em indivíduos com genótipo TT e alelo tipo selvagem T mostraram-se associados.
- Indivíduos com o genótipo heterozigoto para o *IFNA1*(-2) e para o *IFNAR1*, apresentam níveis maiores de expressão de *IFNAR1*.
- Não houve diferença entre a atividade das enzimas ALT, AST, GGT, níveis de expressão das citocinas, leucometria, bilirrubina total e indireta, em relação à carga viral.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos SNPs associada aos níveis de expressão gênica das citocinas que interferem na resposta imune ao HBV (IFN- α , TNF- α , IL-10, IFN- γ e IFN- α r) poderá representar um papel importante como preditores de resultado pré-tratamento, auxiliando na escolha do período de início da terapia antiviral, do tipo de medicamento a ser administrado e prever significativamente a resposta virológica sustentada em pacientes infectados pelo HBV.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. In: **Citocinas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABBOTT, W. et al. Polymorphism in intron 1 of the interferon-gamma gene influences both serum immunoglobulin E levels and the risk for chronic hepatitis B virus infection in Polynesians. **Immunogenetics**, v. 59, n. 3, p. 187–95, mar. 2007.
- AIT-GOUGHOUlte, M. et al. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. **Viruses**, v. 2, p. 1394–1410, jul. 2010.
- ALVARIZ, R. C. Hepatite crônica pelo vírus B (HBV). **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**, v. 5, p. 17–34, 2006.
- ARAÚJO, E. S. A. **O aBc das hepatites: manual clínico para o manuseio, terapia e prevenção da hepatite B**. São Paulo: Bristol-Myers Squibb, 2008.
- BECK, J.; NASSAL, M. Hepatitis B virus replication. **World journal of gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 48–64, 7 jan. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites Virais: O Brasil está atento**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. In: MINISTÉRIO DA SAÚDE (Ed.). **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. p. 23–45.
- BREAM, J. et al. gamma promoter alters control of gene transcription. **Genes and Immunity**, v. 3, p. 165–169, 2002.
- BUT, D.-Y.-K.; LAI, C.-L.; YUEN, M.-F. Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 14, n. 11, p. 1652–1656, 21 mar. 2008.
- CDC Centers for Disease Control and Prevention. **Recommendations for routine testing and follow-up for chronic hepatitis B virus (HBV) infection**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hepatitis/hbv/PDFs/ChronicHepBTestingFlwUp.pdf>>. Acesso em: 8 out. 2012.

CHANG, J. J.; LEWIN, S. R. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 1, p. 16–23, jan. 2007.

CHANG, K.-M. Hepatitis B and the Immune System. **Current Hepatitis Reports**, v. 9, p. 205–213, 21 ago. 2010.

CHEN, C.-C. et al. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. **International journal of epidemiology**, v. 34, n. 6, p. 1310–1318, dez. 2005.

CHEONG, J. Y. et al. Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. **Biochemical genetics**, v. 44, n. 5-6, p. 246–255, jun. 2006.

CHEVILLARD, C. et al. Two new polymorphisms in the human interferon gamma (IFN-gamma) promoter. **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, v. 29, n. 1, p. 53–56, mar. 2002.

CHU, C. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 15 Suppl, p. 25–30, maio 2000.

CHU, C. et al. Precore Stop Mutant in HBeAg-Positive Patients with Chronic Hepatitis B: Clinical Characteristics and Correlation with the Course of HBeAg-to-Anti-HBe Seroconversion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 16–21, 2002.

CONDE, S. R. S. DA S. **Correlação dos níveis séricos e dos polimorfismos nos genes de citocinas (TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 e IL-10) com a apresentação clínica da hepatite crônica**. 2010. 171f. Tese (Doutorado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

CORRÊA, B. D. M. et al. Association between HLA-DRB1* polymorphisms and hepatitis B infection in a brazilian population. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 5, p. 537–542, 2012.

DANDRI, M.; LOCARNINI, S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. **Gut**, v. 61 Suppl 1, p. 6–17, maio 2012.

DIOP, G. et al. Exhaustive genotyping of the interferon alpha receptor 1 (IFNAR1) gene and association of an IFNAR1 protein variant with AIDS progression or susceptibility to HIV-1 infection in a French AIDS cohort. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 569–77, nov. 2006.

EASL. EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 57, n. 2, p. 167–185, 2012.

FALLETI, E. et al. Genetic polymorphisms of inflammatory cytokines and liver fibrosis progression due to recurrent hepatitis C. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 27, n. 3, p. 239–246, mar. 2007.

FAN, H. BIN et al. Hepatitis B Virus Genotype B and High Expression of Interferon Alpha Receptor β Subunit are Associated With Better Response to Pegylated Interferon Alpha 2a in Chinese Patients With Chronic Hepatitis B Infection. **Hepatitis monthly**, v. 12, n. 5, p. 333–338, maio 2012.

GANEM, D.; PRINCE, A. M. Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences. **New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1118–1129, 2004.

GAO, Q.-J. et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 44, p. 5610–5619, 2009.

HAN, Q. et al. Associations between cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 polymorphisms and serum tumor necrosis factor- α and interferon- γ levels in patients with chronic hepatitis B virus infection. **Inflammation research**, v. 60, n. 11, p. 1071–1078, nov. 2011.

HE, X.-X. et al. Persistent effect of IFNAR-1 genetic polymorphism on the long-term pathogenesis of chronic HBV infection. **Viral immunology**, v. 23, n. 3, p. 251–257, jun. 2010.

HOFFMANN, S. C. et al. Ethnicity greatly influences cytokine gene polymorphism distribution. **American journal of transplantation**, v. 2, p. 560–567, jul. 2002.

HUANG, H.-H. et al. Hepatitis B viraemia: its heritability and association with common genetic variation in the interferon gamma signalling pathway. **Gut**, v. 60, n. 1, p. 99–107, jan. 2011.

KHOURI, M. EL; SANTOS, V. A. Review Hepatitis B: epidemiological, immunological, and serological considerations emphasizing mutation. **Revista do Hospital das Clínicas Universidade de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 216–224, 2004.

KIM, H.-J. et al. Polymorphisms of Interferon Gamma Gene and Risk of Hepatocellular Carcinoma in Korean Patients with Chronic Hepatitis B Viral Infection. **Hepatogastroenterology**, v. 60, n. 125, p. 1117–1120, 2013.

KIM, S. S. et al. Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor accessory protein gene polymorphisms are associated with persistent hepatitis B virus infection. **Hepatogastroenterology**, v. 59, p. 190–197, 2012.

KIMKONG, I.; TANGKIJVANICH, P.; HIRANKARN, N. Association of interferon-alpha gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection. **International journal of immunogenetics**, v. 40, n. 6, p. 476–481, dez. 2013.

KONDO, Y.; UENO, Y.; SHIMOSEGAWA, T. Immunopathogenesis of hepatitis B persistent infection: implications for immunotherapeutic strategies. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v. 2, p. 71–79, 27 mar. 2009.

KREIL, S. et al. A polymorphism associated with STAT3 expression and response of chronic myeloid leukemia to interferon α . **Haematologica**, v. 95, n. 1, p. 148–152, jan. 2010.

LIANG, T. J. Hepatitis B: the virus and disease. **Hepatology**, v. 49, n. 5 Suppl, p. 13–12, 2009.

LIN, C.-L.; KAO, J.-H. Hepatitis B viral factors and clinical outcomes of chronic hepatitis B. **Journal of biomedical science**, v. 15, n. 2, p. 137–145, mar. 2008.

LIN, C.-L.; KAO, J.-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 26 Suppl 1, p. 123–130, jan. 2011.

LIU, M. et al. Association of interferon-gamma gene haplotype in the Chinese population with hepatitis B virus infection. **Immunogenetics**, v. 58, n. 11, p. 859–864, dez. 2006.

LOK, A. S. F.; MCMAHON, B. J. Chronic hepatitis B. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 45, n. 2, p. 507–539, fev. 2007.

LUTFALLA, G. et al. Assignment of the human interferon-alpha receptor gene to chromosome 21q22.1 by in situ hybridization. **Journal of interferon research**, v. 10, n. 5, p. 515–517, out. 1990.

LYRA, A. C.; CAVALCANTE, L. N.; LYRA, L. G. C. Hepatite crônica B. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, p. 39–48, 2010.

MARTIN, C. M. et al. Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals. **Cytokine**, v. 47, n. 3, p. 194–198, 2009.

MATTOS, A. A. DE; DANTAS-CORREA, E. B. Hepatite pelo vírus B em pacientes HBeAg-negativo. In: **Tratado de Hepatologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. p. 189–203.

MCKUSICK, V. A. **Interferon gamma, IFNG**. Disponível em: <<http://omim.org/entry/147570>>. Acesso em: 3 mar. 2014.

NCBI GENE. **IFNG interferon, gamma**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458>>. Acesso em: 3 mar. 2014a.

NCBI GENE. **IFNA1 interferon, alpha 1**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3439>>. Acesso em: 3 mar. 2014b.

NCBI GENE. **IFNAR1 interferon (alpha, beta and omega) receptor 1**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3454>>. Acesso em: 3 mar. 2014c.

NIETERS, A. et al. Effect of cytokine genotypes on the hepatitis B virus-hepatocellular carcinoma association. **Cancer**, v. 103, n. 4, p. 740–748, 15 mar. 2005.

NOGUCHI, C. et al. Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. **The Journal of general virology**, v. 88, n. Pt 2, p. 432–440, fev. 2007.

OGNJANOVIC, S. et al. Genetic polymorphisms in the cytokine genes and risk of hepatocellular carcinoma in low-risk non-Asians of USA. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 758–762, maio 2009.

PAN, C. Q.; ZHANG, J. X. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. **International journal of medical sciences**, v. 2, n. 1, p. 36–40, jan. 2005.

PENG, X. M. et al. Influences of MxA gene -88 G/T and IFN-gamma +874 A/T on the natural history of hepatitis B virus infection in an endemic area. **International journal of immunogenetics**, v. 34, n. 5, p. 341–346, out. 2007.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. Population-based multicentric survey of hepatitis B infection and risk factor differences among three regions in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 2, p. 240–247, ago. 2009.

PEREIRA, L. M. M. B. et al. **Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2010. p. 295

PERKINS, J. A. **Schematic picture of a HBV-particle**. Disponível em: <<http://people.rit.edu/japfaa/infectious.html>>. Acesso em: 3 mar. 2014.

PLATANIAS, L. C. Interferon receptors and activation of classical JAK–STAT pathways by type I and type II interferons. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 375–386, 2005.

PUNGPAPONG, S.; KIM, W. R.; POTERUCHA, J. J. Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians. **Mayo Clinic proceedings**, v. 82, n. 8, p. 967–975, ago. 2007.

QI, S. et al. Association of the -183 Polymorphism in the IFN- γ Gene Promoter With Hepatitis B Virus Infection in the Chinese Population. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 19, p. 276–281, 2005.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 215–229, 2005.

RIBEIRO, C. S. S.; VISENTAINER, J. E. L.; MOLITERNO, R. A. Association of cytokine genetic polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 4, p. 435–440, 2007.

RIBEIRO, R. M.; LO, A.; PERELSON, A. S. Dynamics of hepatitis B virus infection. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 8, p. 829–835, 2002.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunological Reviews Foxp3 + CD25 + CD4 + natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Nature immunology**, v. 212, n. 1, p. 345-352, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning: a laboratory manual. In: **Protocol 1- isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells Using Proteinase K and Phenol**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 6.4–6.11.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Hepatites Virais. In: **Introdução à virologia humana**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 331–356.

SCHRODER, K. et al. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, p. 163–189, 2004.

SONG, L. H. et al. A promoter polymorphism in the interferon alpha-2 gene is associated with the clinical presentation of hepatitis B. **Mutation research**, v. 601, p. 137–143, 10 out. 2006.

SONG, L. H. et al. Association of two variants of the interferon-alpha receptor-1 gene with the presentation of hepatitis B virus infection. **European cytokine network**, v. 19, n. 4, p. 204–210, dez. 2008.

STANNARD, L. **Eletromicrografia de transmissão colorida de partículas do vírus da hepatite B**. Disponível em: <<http://www.sciencephoto.com/media/249558/view/diseases/html/hepb.stm>>. Acesso em: 3 mar. 2014.

UNO, K. et al. Impairment of IFN-alpha production capacity in patients with hepatitis C virus and the risk of the development of hepatocellular carcinoma. **World journal of gastroenterology**, v. 11, n. 46, p. 7330–7334, 14 dez. 2005.

UZÉ, G. et al. The receptor of the type I interferon family. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 316, p. 71–95, 2007.

WANG, J. et al. High-throughput SNP genotyping by single-tube PCR with Tm-shift primers. **BioTechniques**, v. 39, n. 6, p. 885–893, dez. 2005.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis B, Fact sheet n°204**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 3 mar. 2014.

ZHANG, S.-J. et al. Effect of seasonal variation on the clinical course of chronic hepatitis B. **Journal of gastroenterology**, v. 41, p. 1107–1115, nov. 2006.

ZHOU, J. et al. Polymorphisms of type I interferon receptor 1 promoter and their effects on chronic hepatitis B virus infection. **Journal of hepatology**, v. 46, n. 2, p. 198–205, fev. 2007.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo

Associação entre o polimorfismo -2 C>T no gene *IFNA1* e altos níveis de expressão do gene *IFNAR1* com a infecção crônica pelo HBV

Joelma Carvalho Santos^{1,2}, Dayse Maria Vasconcelos de Deus^{1,2}, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{1,3}, Maria Rosileide Bezerra Alves⁴, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2,5}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil;

²Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil;

³Departamento de Medicina Clínica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil;

⁴Hospital Escola Dr. Helvio Auto, Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL), Maceió-AL, Brasil.

⁵Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brasil;

Resumo

A presença de polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e a expressão variante dos genes de alguns interferons em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) pode estar relacionada aos níveis séricos do HBV e complicações da doença. Desta forma, 208 indivíduos (94 pacientes com infecção crônica e 114 indivíduos imunes ao HBV) foram incluídos em um estudo de caso-controle para verificar a associação entre as frequências genotípicas e proporções alélicas dos genes *IFNG* (-5A>G), *IFNA1* (-2C>T), *IFNAR1* (-97T>C) em relação aos níveis de expressão desses genes e à carga viral do HBV. Para a genotipagem foi utilizada a qPCR de acordo com técnica de Alta Resolução de Melting e a quantificação viral e a expressão absoluta dos genes foram realizadas por qPCR. Pacientes com infecção crônica pelo HBV com o genótipo heterozigoto *IFNA1* CT e alelo T tiveram maiores chances de desenvolver proteção contra o HBV quando comparados a indivíduos imunes com o genótipo e alelo selvagem (*IFNA1* CT/CC: OR=0,45; p=0,01 e alelo T/C: OR=0,54; p<0,01). Em pacientes com infecção crônica e genótipo selvagem TT do *IFNAR1*, os níveis de expressão do gene desse receptor explicam em 40% os baixos níveis de carga viral desses pacientes ($r^2=-0,40$ | p=0,04) e conferem uma proteção no desenvolvimento da cronicidade. A presença da variante polimórfica do gene *IFNA1* (-2) está associada com a cronicidade da infecção pelo HBV, e altos níveis de expressão do gene *IFNAR1* e baixos níveis de *IFNA1* contribuem para a cronicidade da infecção crônica nestes indivíduos.

Palavras-chave: Vírus da hepatite B; polimorfismo de nucleotídeo único; interferon alfa; interferon gama; receptor de interferon alfa; expressão gênica.

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) constitui um importante problema de saúde pública, associado a significativa morbidade e mortalidade por doença crônica hepática [1]. No mundo, estima-se que 2 bilhões de pessoas vem sendo infectadas pelo HBV e cerca de 600 mil pessoas morrem todos os anos em consequência da hepatite B [2]. Enquanto que no Brasil, a prevalência de positividade sorológica indicativa de exposição a essa infecção (anti-HBc), na faixa etária entre 10 e 69 anos, foi de 7,4% [3].

Entre os fatores associados com a progressão da doença, os desequilíbrios nas reações inflamatórias [4] e o genótipo do HBV [5] constituem importante papel na hepatocarcinogênese induzida pelo HBV.

Os mecanismos de persistência e cronicidade da infecção pelo HBV ainda não se encontram completamente esclarecidos. No entanto, alguns estudos [6–8] descrevem associação entre a susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV e os fatores imunológicos do hospedeiro, principalmente em relação à idade no período de infecção, e aos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs).

Além dos SNPs, a expressão dos genes das citocinas IFN- γ e IFN- α e as variações genéticas no receptor do interferon alfa (IFN- α r1) podem representar papel importante no clareamento ou na cronicidade nos estágios iniciais de exposição ao HBV, e ainda influenciar a patogênese da infecção crônica em longo prazo [9].

Alguns estudos, principalmente na população asiática [8,10–12] avaliaram a relação entre o polimorfismo do indivíduo e o nível sérico de citocinas relacionadas com a persistência da infecção crônica pelo HBV. No entanto, foram observadas algumas discordâncias em relação à susceptibilidade à infecção persistente pelo HBV nos grupos pesquisados, quando associados ao padrão genotípico das populações.

Pouca informação encontra-se disponível em relação aos polimorfismos dos genes *IFNG* (-5 A>G), *IFNA1* (-2 C>T) e *IFNAR1* (-97 T>C) nessas regiões. Desta forma, quando descritos SNPs destes genes em outras posições, observa-se que ainda há discordâncias de uma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos estudados e a persistência à infecção pelo HBV.

A identificação destes SNPs e do padrão de expressão das citocinas associados à carga viral poderão ser úteis na prática clínica para estratificar os grupos de maior ou menor risco, e auxiliar no desenvolvimento de tratamento mais eficaz para a clínica de cada paciente e em um melhor entendimento da resposta imunológica no desenvolvimento da infecção pelo HBV.

Desta forma, o presente estudo buscou investigar a associação entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes *IFNA1* (-5 A>G, rs202055606), *IFNG* (-2 C>T, rs18407537) e *IFNAR1* (-97 T>C, rs2850015) em pacientes com hepatite B crônica (não submetidos ao tratamento com antivirais) com os níveis de expressão dessas citocinas e com a carga viral do HBV.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes analisados

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo caso-controle incluindo 208 indivíduos adultos: 94 na fase crônica da infecção pelo HBV não submetidos a tratamento antiviral (64 homens e 30 mulheres) e 114 indivíduos imunes (84 homens e 30 mulheres) atendidos no Ambulatório de Hepatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE) e no Serviço de Assistência Especializada do Hospital Escola Dr. Helvio Auto/UNCISAL no período de outubro de 2012 a agosto de 2013. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

O diagnóstico da infecção crônica pelo HBV foi estabelecido pela positividade para os antígenos de superfície do envelope viral (HBsAg >125mU/mL) e anticorpos contra o antígeno do core total (anti-HBc total >1,5 Unidade PEI/mL) ou do isotipo IgG, por um período superior a 6 meses. Como grupo controle, participaram do estudo Indivíduos imunes com os marcadores sorológicos HBsAg não reagente e, anticorpo contra o antígeno de superfície do HBV (Anti-HBs >10mU/mL) e Anti-HBc total reagentes.

Foram excluídos do estudo os indivíduos submetidos a qualquer tratamento antiviral há menos de 6 meses da data de inclusão, co-infectados com HIV e/ou HCV e em uso de imunossuppressores.

2.2 Genotipagem

Para a extração do DNA genômico foi utilizado 1mL de sangue periférico, coletado em tubos com EDTA, através do método baseado na adição de fenol equilibrado ($\text{pH} \pm 8,0$) e clorofórmio [13], com uma quantificação aproximada de 500ng (100-1000ng) utilizando o quantificador de ácidos nucleicos nanodrop 2000 (ThermoScientific®). Foram utilizadas sequências artificialmente construídas como controles positivos para os alelos selvagens e polimórficos, com amplicons de 75pb relacionados a cada um dos genótipos (tabela 1). Os genótipos heterozigotos foram obtidos através de uma mistura equimolar das sequências dos dois alelos.

A genotipagem dos polimorfismos dos genes *IFNG* (A>G, rs202055606), *IFNA1* (C>T, rs181407537) e *IFNAR1* (T>C, rs2850015) foi realizada por PCR em tempo real quantitativa (qPCR), utilizando a técnica de *alta resolução de melting* (HRM). Para a reação de HRM utilizou-se um volume final de 10μL, contendo 2μL de master mix Eva Green 1x com BSA (Solis BioDyne®), 0,7μL de cada primer (forward e reverse) a 10pmol/μL e 2μL de DNA genômico extraído.

A reação de amplificação constituiu-se em: desnaturação inicial a 95°C/15min, 45 ciclos a 95°C/15 segundos (desnaturação), 20 segundos a 60°C (hibridização) e uma extensão final de 25 segundos a 72°C, sob as condições de melting de aquecimento gradual de 50 a 90°C, aumentando 0,7°C a cada 7 segundos para a formação da curva de dissociação, e 90 segundos para as condições pré-melt. As temperaturas de melting foram entre 88,4 a 89,4°C para a expressão do gene *IFNA1*, 88,4 a 89,7°C para expressão do *IFNG* e entre 75,9 a 76,9°C para o *IFNAR1*. O percentual de confiança aceito para a acurácia da genotipagem foi acima de 99%.

2.3 Detecção e quantificação do HBV-DNA

O DNA do HBV foi extraído a partir de 400µL de plasma através do método baseado na adição de fenol equilibrado ($\text{pH} \pm 8,0$) e clorofórmio [13] e eluído em 100µL de solução de re-hidratação (Tampão TE 1x), obtendo uma quantificação de 1 a 1500ng através do nanodrop (2000).

Para cada reação da qPCR utilizou-se um volume final de 10µL, contendo 2µL de HBV-DNA extraído, 2 µL de master mix Eva Green 1x sem BSA (Solis BioDyne®) e 0,7µL de cada primer a 10pmol/µL (tabela 1), com ciclos a 94°C/15min, 45 ciclos a 95°C/15 segundos, 60°C por 15 segundos, seguidos de uma extensão final de 60 segundos a 72°C. As condições de melting foram: aquecimento gradual de 50 a 90°C, aumentando 0,7°C a cada 7 segundos para a formação da curva de dissociação, e 90 segundos para as condições pré-melt, com temperatura de melting entre 80,1 a 80,6°C. A quantificação do HBV-DNA foi obtida através de curvas de quantificação referente ao padrão internacional (OMS) para o DNA-HBV (NIBSC Code 97/746) em UI/mL e convertidas em $\log_{10}$.

O resultado da quantificação viral do HBV-DNA foi estratificado de acordo com os níveis de carga viral: baixa carga viral, quando menor que 2.000UI/mL ou 3,3 $\log_{10}$, e alta carga viral, quando maior ou igual a 2.000UI/mL ou 3,3 $\log_{10}$. Utilizou-se como ponto de corte para a carga viral os níveis preconizados pelo EASL Clinical Practice Guidelines for chronic hepatitis B infection [14] como um dos critérios de indicação para o início da terapia antiviral.

2.4 Expressão absoluta dos genes das citocinas

Para o isolamento das células polimorfonucleares (PBMNC) do sangue total foi utilizado o Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare®). O RNAm foi extraído utilizando-se o PBMNC armazenado em isotiocianato de guanidina (4M) pelo método baseado na adição de fenol ácido ($\text{pH} \pm 5,0$) e clorofórmio [13]. Após a extração, foi acrescentado 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato (DEPC) ao RNAm e esta solução foi armazenada a -80°C. Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) foram utilizados primers randômicos e a enzima transcriptase reversa do kit ImProm - II™ Reverse Transcriptase System (Promega®).

Para avaliar a expressão dos genes das citocinas através da reação de RT-qPCR utilizou-se um volume final de 10µL, contendo 5µL de master mix Sybr Green-I, 0,7µL de cada primer (tabela 1) a 10pmol/µL e 2µL de cDNA construído, com ciclos da qPCR a 94°C/15min, 45 ciclos a 95°C/15 segundos, 60°C por 20 segundos, seguidos de uma extensão final de 25 segundos a 72°C. As condições de melting foram as mesmas para genotipagem e carga viral, com temperatura de melting de 62°C para a expressão do gene *IFNA1*, 68°C para o *IFNG* e 66°C para o *IFNAR1*.

Para a quantificação da expressão absoluta (AE) foram utilizados como genes constitutivos (*housekeeping*) o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a β -actina (tabela 1). Assim, $AE = [\text{expressão do gene}]/[\text{GAPDH} \times \beta\text{-actina}]$. Os níveis de expressão gênica, analisados apenas para o grupo de casos, foram estratificados em baixos níveis de expressão (valores abaixo da mediana do nível de expressão) e altos níveis de expressão (valores iguais ou acima da mediana do nível de expressão) correspondentes a cada um dos genes das citocinas analisadas. A especificidade dos primers de expressão foi confirmada pela curva de melting relacionada a cada gene.

Tabela 1 – Identificação dos polimorfismos, número de acesso do NCBI, sequências de primers para PCR, temperatura de anelamento e comprimento do amplicon para os genes *IFNG*, *IFNA* e *IFNAR1*, genes normalizadores GAPDH e β -actina, e HBV.

Polimorfismo	Identificação	Número de acesso no NCBI	Primers PCR (Forward / Reverse)	Temperatura de anelamento	pb*
<i>IFNG</i> (-5) (rs181407537) Controle positivo <i>IFNG</i> (-5) Controle positivo <i>IFNG</i> (-5)	A → G Alelo G Alelo A	NM000619.2	(F): 5'-AACTACTGATTTCAACTTCTTTG-3' (R): 5'-TGAAAAGCCAAGATATAACTTGT-3' 5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC <u>G</u> GA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3' 5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC <u>G</u> AA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3'	68°C	75
<i>IFNA1</i> (-2) (rs202055606) Controle positivo <i>IFNA1</i> (-2) Controle positivo <i>IFNA1</i> (-2)	C → T Alelo T Alelo C	BC112302.1	(F): 5'-CCCATCTCAGCAAGCCCAGAA-3' (R): 5'-CACCAGGACCATCAGTAAAGCA-3' 5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT A <u>T</u> G ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3' 5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT A <u>C</u> G ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3'	62°C	75
<i>IFNAR1</i> (-97) (rs2850015) Controle positivo <i>IFNAR1</i> (-97) Controle positivo <i>IFNAR1</i> (-97)	T → C Alelo T Alelo C	NM000629.2	(F): 5'-GTAGAGGGGCGGTGAGAGCTA-3' (R): 5'-CGCCATCGCCCCGTCCTAAG-3' 5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT G <u>T</u> G CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3' 5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT G <u>C</u> G CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3'	66°C	75
<i>GAPDH</i>	Gene constitutivo normalizador	XM005253678.1	(F): 5'-CCAAAATCAAGTGGGGCGATG-3' (R): 5'- AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCTG-3'	50°C	200
β-actina	Gene constitutivo normalizador	XM005249820.1	(F): 5'- ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACG-3' (R): 5'- TCATTGCCAATGGTGATGACCT-3'	50°C	125
HBV	Carga viral	JQ000009.1	(F): 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3' (R): 5'-GAGAGAAGTCCACCACGAGTCTAGA-3'	60°C	90

*pb = Comprimento do amplicon em 'pares de bases'

2.5 Análises estatísticas

A estimativa da distribuição das frequências genotípicas e alélicas foi calculada através do teste do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) para casos e controles, com o objetivo de verificar a aderência entre os valores esperados e observados de acordo com o EHW.

Para verificar a associação, de forma categorizada, entre sexo, faixa etária, frequências genotípicas, proporções alélicas, carga viral e expressão gênica foi utilizado o teste do qui-quadrado (χ^2) e o odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC_{95%}). Para comparação entre genótipos e níveis de expressão dos genes das citocinas e carga viral, como variáveis contínuas, foram utilizados os teste não paramétrico de *Mann Whitney* e o teste de *Kruskal Wallis*.

Para verificar a existência da associação entre as variáveis não lineares (expressão dos genes das citocinas e carga viral) e o grau de associação (valor significativo de p), foi utilizado o coeficiente de determinação (r^2), calculado através do coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ).

Foram considerados estatisticamente significantes os resultados com valor de p menor que 0,05. Para realização das análises foram utilizados os programas estatísticos *BioEstat 5.0* e *GraphPad Prism 5.0*.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da amostra e análises laboratoriais

As características clínicas da amostra em relação ao sexo e idade dos casos e controles foram analisadas. Quando comparada a distribuição por sexo entre as duas populações, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) entre casos e controles (M/F=64:30 e 84:30, respectivamente). No entanto, observou-se diferença entre a faixa etária de pacientes com infecção crônica pelo HBV e controles ($p = 0,01$), com maior número de casos com idade entre 40 e 60 anos, enquanto que a maior parte dos controles encontrava-se na faixa etária de 19 a 39 anos. A média de idade $\pm$ SD no grupo de casos foi de $44,54 \pm 13,52$, enquanto que no grupo controle foi de $37,74 \pm 11,40$.

Dos indivíduos analisadas com infecção crônica pelo HBV e baixos níveis de carga viral, 11 (29,72%) apresentaram anti-HBe reagente. Em relação ao grupo de alta carga viral 15 (26,31%) apresentaram anti-HBe reagente, indicando ausência de replicação, ou possíveis mutações na região pré-core ou core basal do vírus.

Na tabela 2, as características laboratoriais foram estratificadas de acordo com os níveis de carga viral. Em indivíduos com infecção crônica, os níveis médios de carga viral foram de $3,2 \log_{10}$, e para o gene *IFNA1* observou-se menores níveis de expressão (mediana = $2,56 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L}$) em comparação aos genes *IFNG* (mediana = $4,54 \times 10^5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) e *IFNAR1* (mediana = $6,92 \times 10^9 \text{ ng}/\mu\text{L}$).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação às enzimas ALT, AST, GGT, níveis de expressão das citocinas, leucometria, bilirrubina total e indireta, de acordo com a carga viral (tabela 2).

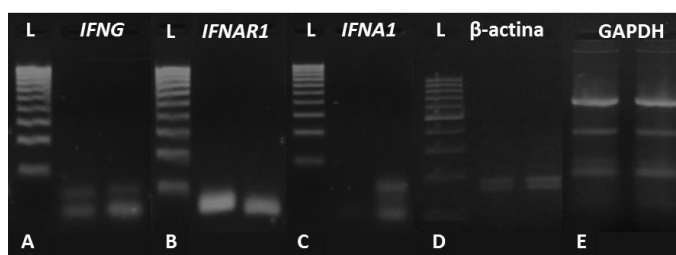
Tabela 2 – Características laboratoriais dos 94 pacientes com infecção crônica pelo HBV, de acordo com os níveis de carga viral.

Características laboratoriais	Baixa carga viral (<3,3 log ₁₀) n=37		Alta carga viral (≥3,3 log ₁₀) n=57		p*
	(Masculino/Feminino: 26/11)		(Masculino/Feminino: 38/19)		
	Mediana	Intervalo mínimo-máximo	Mediana	Intervalo mínimo-máximo	
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	4.600	[3.400-8.800]	6.600	[2.600-12.130]	0,0522
Quantificação sérica					
ALT (UI/L)	25	[13-102]	25	[9,9-70,0]	0,1773
AST (UI/L)	24	[12-104]	24	[10,9-81,3]	0,3256
GGT (UI/L)	33	[13-171]	25	[10-426]	0,1911
Bilirrubina total (mg/dL)	0,60	[0,20-1,50]	0,52	[0,20-2,20]	0,4106
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,30	[0,1-1,0]	0,30	[0,10-1,70]	0,7622
Expressão gênica					
<i>IFNG</i> (ng/μL)	13,0	[9,6x10 ⁻¹⁰ -6,9x10 ⁶]	3,0	[1,5x10 ⁻⁸ -1,2x10 ⁷]	0,8400
<i>IFNA1</i> (ng/μL)	6,7x10 ⁻⁷	[2,8x10 ⁻¹² -5,4]	1,7x10 ⁻⁷	[1,7x10 ⁻¹⁰ -11,4]	0,8730
<i>IFNAR1</i> (ng/μL)	11,7	[0-1,1x10 ¹¹]	168,0	[3,5x10 ⁻⁸ -1,2x10 ⁷]	0,1784

*p valor do teste de *Mann-Whitney*.

Ao analisar o produto da PCR por eletroforese em gel de agarose e corado com *Blue Green* foi possível verificar as bandas correspondentes à expressão gênica dos interferons e dos genes normalizadores (figura 1).

Figura 1 – Produtos de PCR visualizados em gel de agarose 2% referente às expressões dos genes *IFNG* (75pb, com dímero de primer), *IFNAR1* (75pb), *IFNA1* (75pb com dímero de primer), B actina (±125pb), GAPDH (±200pb), Ladder (L, 100pb).



As frequências encontradas enquadram-se nos critérios de Manly estabelecidos em 2005 [15]. A frequência dos genótipos observados não foi estatisticamente diferente da distribuição esperada de acordo com o EHW, para os genes das três citocinas analisadas ($p>0,05$). Indicando assim homogeneidade na distribuição dos genótipos e adequação para realização dos cálculos e testes para desvios destas frequências.

3.2 Distribuição genotípica e alélica dos genes das citocinas *IFNG* (-5 A>G), *IFNA1* (-2 C>T) e *IFNAR1* -97 (T>C) em pacientes com infecção crônica pelo HBV

A presença do genótipo heterozigoto *IFNA1*(-2) CT mostrou associação estatisticamente significativa com a proteção da cronicidade pelo HBV, quando comparados aos indivíduos com genótipo tipo selvagem *IFNA1*(-2) CC (OR=0,45; IC_{95%}=0,25-0,81). Em relação à proporção alélica, os indivíduos com o alelo polimórfico *IFNA1*(-2) T foram associados também com a proteção para cronicidade (OR=0,54; IC_{95%}=0,35-0,82) quando comparados aos indivíduos com o alelo *IFNA1*(-2) C (p=0,0077). Entretanto, não foi observada diferença significativa entre os genótipos *IFNA1*(-2) CC/TT entre os grupos analisados (tabela 3).

Em relação aos genes *IFNAR1*(-97) e *IFNG*(-5), não foi observada diferença estatisticamente significativa em relação à frequência genotípica e alélica desses genes quando comparados casos e controles (tabela 3).

Tabela 3 – Frequência genotípica e alélica do polimorfismo dos genes *IFNG* (-5), *IFNA1* (-2) e *IFNAR1* (-97) em pacientes infectados pelo HBV na fase crônica e indivíduos imunes.

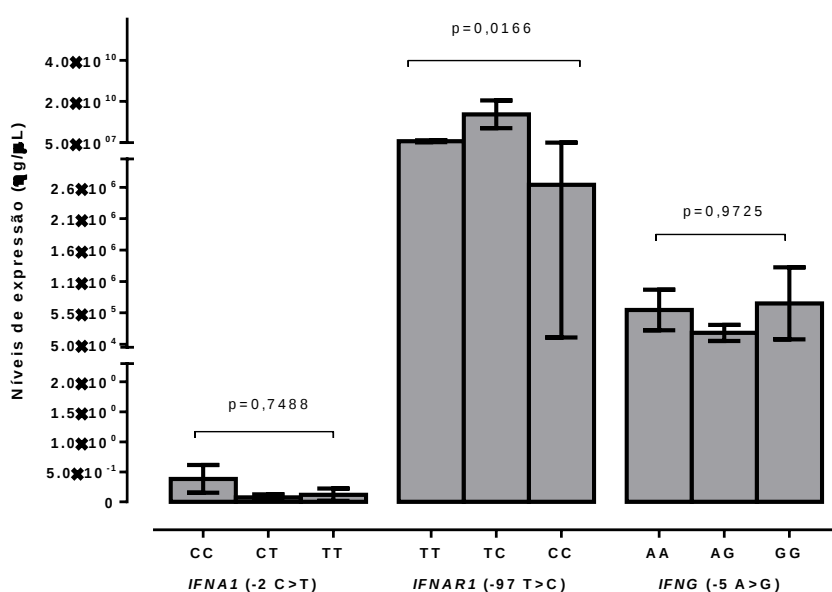
Frequência genotípica e alélica do polimorfismo	Infecção crônica pelo HBV (Casos) n=94	Indivíduos imunes (Controles) n=114	OR	IC _{95%}	p*
	n (%)	n (%)			
<i>IFNG</i> (-5 A>G, rs181407537)					
AA	42 (44,7)	56 (49,1)	1	-	
AG	40 (42,5)	48 (42,1)	1,11	0,62-1,98	0,8350
GG	12 (12,8)	10 (8,8)	1,60	0,63-4,05	0,5995
A	124 (66,0)	160 (70,2)	1	-	
G	64 (34,0)	68 (29,8)	1,21	0,80-1,84	0,4156
<i>IFNA1</i> (-2 C>T, rs202055606)					
CC	53 (56,4)	41 (36,0)	1	-	
CT	35 (37,2)	60 (52,6)	0,45	0,25-0,81	0,0109
TT	6 (6,4)	13 (11,4)	0,36	0,13-1,02	0,0850
C	141 (75,0)	142 (62,3)	1	-	
T	47 (25,0)	86 (37,7)	0,55	0,35-0,84	0,0077
<i>IFNAR1</i> (-97 T>C, rs2850015)					
TT	44 (46,8)	53 (46,5)	1	-	
TC	45 (47,9)	43 (37,7)	1,26	0,71-2,25	0,5236
CC	5 (5,3)	18 (15,8)	0,34	0,12-0,97	0,0663
T	133 (70,7)	149 (65,4)	1	-	
C	55 (29,3)	79 (34,6)	0,78	0,52-1,18	0,2863

*p valor do odds ratio.

3.3 Frequência genotípica e proporção alélica em relação aos níveis de carga viral e expressão gênica

Ao comparar os níveis de expressão dos 3 genes das citocinas analisadas, observou-se que os indivíduos com genótipo *IFNAR1* TC apresentaram maior expressão (média= $1,38 \times 10^{10}$ ng/ μ L, $p=0,0166$). Em relação ao gene *IFNA*(-2), indivíduos com genótipo CC apresentam maiores níveis de expressão (média= $3,84 \times 10^{-1}$ ng/ μ L) quando comparados aos genótipos polimórficos *IFNA*(-2) CT e TT, ainda que não haja diferença estatisticamente significativa ($p=0,7488$). Da mesma forma, para o gene *IFNG*(-5) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (figura 2).

Figura 2 – Expressão gênica do *IFNA1* (-2 C>T), *IFNAR1* (-97 T>C) e *IFNG* (-5 A>G) em relação aos genótipos dos pacientes com infecção crônica pelo HBV.



Na tabela 4 foram comparadas as frequências genotípicas e alélicas com os níveis de quantificação viral. Em relação ao polimorfismo do gene *IFNG*(-5), o alelo polimórfico G apresentou maior frequência entre os altos níveis de carga viral, independente dos níveis de expressão do *IFNG* nesses indivíduos ($p=0,03$). Para os demais genótipos e alelos desse gene não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes (tabela 4).

A presença do alelo polimórfico C no gene do IFN- α (-2) mostrou maior proporção ($p=0,04$) entre os altos níveis de carga viral e os baixos níveis de expressão do *IFNA1*. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa com o alelo T (tabela 4).

Observou-se maior frequência e associação genotípica e alélica entre os maiores níveis de carga viral e os baixos níveis de expressão gênica do *IFNAR1*(-97) em indivíduos com genótipo TT ($p=0,02$) e alelo tipo selvagem T ($p=0,01$). Para os demais genótipos TC e CC, e alelo C do gene *IFNAR1* não foi observada diferença estatisticamente significativa (tabela 4).

Tabela 4 – Frequência genotípica e alélica dos polimorfismos *IFNG* (-5) e *IFNA1* (-2) e *IFNAR1* (-97) em relação aos níveis de carga viral e de expressão gênica dos 94 pacientes com infecção crônica pelo HBV.

Frequência genotípica e alélica do polimorfismo	Níveis de carga viral (log ₁₀) n=94		Níveis de expressão gênica (ng/μL) n=94		p***
	<3,3 log ₁₀ (n=37)	≥3,3 log ₁₀ (n=57)	Baixos* (n=47)	Altos** (n=47)	
<i>IFNG</i> (-5 A>G, rs181407537)					
AA	17 (45,95)	25 (43,86)	20 (42,55)	22 (46,81)	0,66
AG	16 (43,24)	24 (42,11)	22 (46,81)	18 (38,29)	0,26
GG	4 (10,81)	8 (14,03)	5 (10,64)	7 (14,90)	0,50
A	50 (67,57)	74 (64,91)	62 (65,96)	62 (65,96)	0,16
G	24 (32,43)	40 (35,09)	32 (34,04)	32 (34,04)	0,03
<i>IFNA1</i> (-2 C>T, rs202055606)					
CC	19 (51,35)	34 (64,82)	29 (61,70)	25 (53,19)	0,09
CT	17 (45,95)	18 (31,48)	15 (31,92)	19 (40,43)	0,89
TT	1 (2,70)	5 (3,70)	3 (6,38)	3 (6,38)	0,54
C	55 (74,32)	86 (80,56)	73 (77,66)	69 (73,40)	0,04
T	19 (25,68)	28 (19,44)	21 (22,34)	25 (25,60)	0,49
<i>IFNAR1</i> (-97 T>C, rs2850015)					
TT	16 (43,24)	28 (59,58)	28 (59,57)	16 (34,04)	0,02
TC	18 (48,65)	27 (57,45)	16 (36,17)	29 (59,58)	0,83
CC	3 (8,11)	2 (4,26)	2 (4,26)	3 (6,38)	0,53
T	50 (67,57)	85 (7,28)	72 (77,66)	61 (63,83)	0,01
C	24 (32,43)	31 (26,72)	22 (22,34)	33 (36,17)	0,70

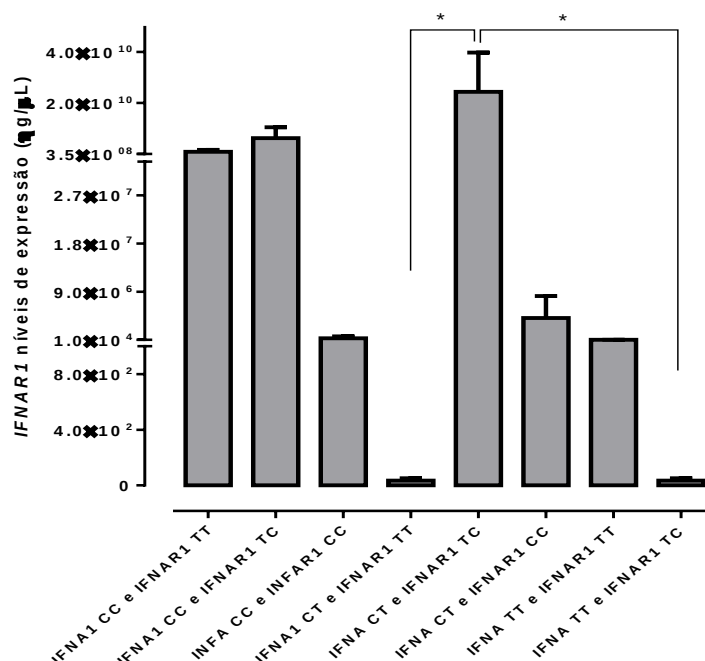
*Níveis de expressão baixos: valores menores que a mediana do nível de expressão. Para *IFNG*, a mediana corresponde a 3,70ng/ μ L, para *IFNA1* equivale a 4,83x10⁻⁷ng/ μ L e para *IFNAR1* a 5,02x10ng/ μ L.

**Níveis de expressão altos: valores maiores que a mediana de toda a amostra em relação ao nível de expressão.

***p valor do teste do qui-quadrado em relação aos níveis de carga viral e expressão gênica, de acordo com o genótipo e alelo.

Ao analisar os níveis de expressão do *IFNAR1* em relação à combinação dos genótipos dos genes *IFNA1*(-2) e *IFNAR1*(-97) (figura 3), observou-se que indivíduos com o genótipo heterozigoto para o *IFNA1*(-2) e para o *IFNAR1*, apresentam níveis maiores de expressão do transcrito *IFNAR1* quando comparados com indivíduos que apresentam um alelo polimórfico em um dos genes (*IFNA1* CT e *IFNAR1* TT, n=13 vs. *IFNA1* CT e *IFNAR1* TC, n=18, *p=0.0124 | *IFNA1* CT e *IFNAR1* TC, n=18 vs. *IFNA1* TT e *IFNAR1* TC, n=13, *p=0.0124).

Figura 3 – Expressão gênica do *IFNAR1* em relação à combinação entre os genótipos dos genes *IFNA1* (CC, CT e TT) e *IFNAR1* (TT, TC e CC) em pacientes com infecção crônica pelo HBV.



3.4 Correlação entre expressão gênica e carga viral

Encontram-se descritas na tabela 5, apenas as correlações fortes e que obtiveram valores de p acima de 0,60. Entre as associações testadas, observou-se que indivíduos com genótipos *IFNA1*(-2) CT e *IFNG*(-5) AA; *IFNA1*(-2) CT e *IFNG*(-5) AG apresentaram correlação substancial, no entanto, sem significância estatística.

Em relação ao polimorfismo *IFNA1*(-2), observou-se que os indivíduos com os genótipos selvagens *IFNA1*(-2) CC e *IFNG*(-5) AA apresentaram um coeficiente de *Spearman* de -0,60, indicando a existência de uma correlação negativa entre as expressões dos genótipos analisados ($p=0,043$). Assim, o aumento da expressão do gene *IFNA1* em indivíduos com o genótipo do tipo selvagem *IFNA1*(-2) CC explica 36% do decréscimo da expressão do gene *IFNG* em portadores do genótipo tipo selvagem *IFNG*(-5) AA (tabela 5).

Para o polimorfismo do gene *IFNAR1*(-97) observou-se que os indivíduos com o genótipo heterozigoto *IFNAR1*(-97) TC e *IFNG*(-5) AG apresentaram correlação positiva ($p=0,62$) estatisticamente significativa ($p=0,025$). Assim, o aumento da expressão do *IFNAR1* em indivíduos com o genótipo heterozigoto TC é atribuído em 38% aos baixos níveis de expressão do gene *IFNG* em indivíduos com o genótipo AG. Da mesma forma, os altos níveis de carga viral em indivíduos com o genótipo tipo selvagem *IFNAR1*(-97) TT do gene desse receptor, podem ser atribuídos em 40% ($p=0,63$) aos baixos níveis de expressão do desse gene ($p=0,040$).

Em relação ao gene *IFNG*, os baixos níveis de expressão desse gene em indivíduos com o genótipo selvagem AA explicam 60% ($p=0,77$) da elevação dos níveis de carga viral detectados nesses pacientes ($p=0,005$).

Tabela 5 – Correlação de *Spearman* entre os níveis de expressão gênica e carga viral em pacientes infectados pelo vírus da hepatite B.

	n	Coeficiente de correlação (ρ)	Coeficiente de determinação (r^2)	*p
<i>IFNA1</i> CC e <i>IFNG</i> AA	12	-0,60	0,36	0,043
<i>IFNA1</i> CT e <i>IFNG</i> AA	7	0,75	0,56	0,066
<i>IFNA1</i> CT e <i>IFNG</i> AG	4	-0,80	0,64	0,333
<i>IFNAR1</i> TT e carga viral	11	-0,63	0,40	0,040
<i>IFNAR1</i> TC e <i>IFNG</i> AG	13	0,62	0,38	0,025
<i>IFNG</i> AA e carga viral	12	-0,77	0,60	0,005

*p valor do teste de correlação de *Spearman*.

4. DISCUSSÃO

O desfecho da infecção e a severidade da doença hepática induzida pelo HBV variam amplamente. Aproximadamente 95% dos adultos infectados pelo HBV desenvolvem infecção aguda sem complicações, no entanto, 5% cronicam [7]. Entre os pacientes cronicamente infectados, a maioria poderá desenvolver complicações como cirrose até insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular [16].

Os fatores de risco com maiores evidências para o desenvolvimento do HCC incluem predisposição genética para o HCC, sexo masculino, níveis de HBV-DNA acima de 2.000 UI/mL em indivíduos com faixa etária acima de 40 anos, presença de cirrose e mutações na região promotora basal do core do HBV [17].

Certas citocinas, por serem vias essenciais na resposta imune estimulada pelo vírus, podem representar um papel importante no clareamento ou na cronicidade nos estágios iniciais de exposição ao HBV, e ainda influenciar a patogênese da infecção crônica em longo prazo [12]. Assim, a investigação dos SNPs e da expressão gênica referente às citocinas relacionadas a essa resposta são potencialmente importantes, por serem fatores preditores genéticos de susceptibilidade ou da progressão da infecção.

Variantes polimórficas nestes genes influenciam os diversos níveis séricos de citocinas e consequentemente manifestações clínicas da infecção crônica pelo HBV [6]. Estas manifestações resultam da interação entre as mutações no vírus e aos fatores inerentes ao hospedeiro, principalmente referentes à idade e o padrão imunológico do indivíduo infectado.

Diferentes prevalências de indivíduos com infecção crônica pelo HBV nos demais países e regiões levam à hipótese que há fatores genéticos que possam conduzir a maior ou menor susceptibilidade à cronicidade da doença [6]. Até o momento, não foram identificados estudos que relacionem os SNPs nos genes das citocinas nas regiões propostas com a expressão gênica e carga viral.

Os resultados sugerem que os polimorfismos nos genes dos interferons analisados, associados aos níveis de expressão e de carga viral podem ser importantes no risco de evolução da infecção pelo HBV. Os pacientes analisados encontram-se principalmente na fase de portador inativo (25,5%, n=24). Contudo, no presente estudo foram observados pacientes com a presença de anti-HBe e elevados níveis de carga viral acima de $>3,3\log_{10}$ (26,31%, n=15) indicando possíveis mutações na região pré-core ou core basal do HBV [18].

O presente estudo mostrou que a chance de indivíduos com o genótipo *IFNA1*(-2) CT desenvolverem cronicidade pelo HBV foi 2,22 vezes menor quando comparados com indivíduos imunes que apresentam o genótipo *IFNA1*(-2) CC (OR=0,45; p=0,01), o que pode levar a uma proteção à infecção pelo HBV. Desta forma, a presença do alelo tipo selvagem *IFNA1*(-2) T pode ser considerada um fator de proteção para estes indivíduos, contribuindo em 1,85 vezes para a proteção (OR=0,54; p<0,01).

Quando estratificados pelos níveis de carga viral e expressão, confirma-se o risco de cronicidade em indivíduos com alelo polimórfico C no gene do IFN- α . Indivíduos com o genótipo tipo selvagem *IFNA1*(-2) CC apresentaram risco para o desenvolvimento da infecção crônica pelo HBV, pois nesses pacientes, os níveis de expressão do gene *IFNA1* (Mediana= $2,4 \times 10^{-7} \pm 1,707 \text{ ng}/\mu\text{L}$) explicam em 36% ($p=0,6$ | $p=0,04$) o decréscimo da expressão do gene *IFNG*(-5) (mediana= $21,35 \pm 2,1 \times 10^6 \text{ ng}/\mu\text{L}$) em portadores do genótipo tipo selvagem AA.

Uno et al. em 2005 mostraram que há uma variação individual nos níveis de produção do IFN- α , e que pode haver diferenças consideráveis entre os níveis de produção da citocina, presença ou ausência da infecção, alteração metabólica e presença do HCC [19]. Estas diferenças na expressão, poderiam ser baseadas em alterações polimórficas em regiões promotoras do gene *IFNA*, influenciando assim o curso da infecção viral.

De acordo com Wu et al. em 2013, os níveis de expressão intra-hepáticos de IFN- α foram maiores nos pacientes infectados pelo HBV quando comparados ao grupo de indivíduos controles, e essa expressão também foi significativamente mais elevada nos grupos de casos com hepatite grave e crônica. Assim, a expressão intra-hepática do IFN- α pode correlacionar-se com a inflamação hepática após a infecção pelo HBV, confirmando que elevados níveis de IFN- α podem desempenhar um papel importante no aparecimento da forma grave da hepatite B [20].

Em relação ao polimorfismo no gene *IFNAR1*(-97), não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. No entanto, quando estratificados, em relação à mediana da expressão gênica e dos níveis de carga viral, observou-se associação entre elevados níveis de carga viral e os baixos níveis de expressão gênica em indivíduos com genótipo TT ($p=0,02$) e alelo T tipo selvagem ($p=0,01$), resultando em um maior risco para estes indivíduos.

Assim, em pacientes com infecção crônica pelo HBV e genótipo selvagem TT do *IFNAR1*(-97), os níveis de expressão do gene desse receptor explicam em 40% menores níveis de carga viral ($r^2=0,40$ | $p=0,04$) e, conseqüentemente, uma provável proteção para o desenvolvimento da cronicidade em relação a esse nível de expressão e ao genótipo polimórfico *IFNAR1*(-97) CC (OR=0,34).

Em relação aos pacientes com genótipos polimórficos *IFNAR1*(-97) TC e *IFNG* AG, observou-se uma correlação positiva estatisticamente significativa ($p=0,62$; $p=0,03$). Assim, nesses indivíduos

maiores níveis de expressão dos genes *IFNAR1* e *IFNG* concomitantemente, sugere que altos níveis de expressão do gene *IFNAR1*(-97) contribua para a cronicidade (mediana=409±4,5x10¹⁰ng/μL). Da mesma forma, o aumento da expressão do *IFNAR1* em indivíduos com o genótipo heterozigoto TC é atribuído em 62% aos baixos níveis de expressão do gene *IFNG* em indivíduos com o genótipo AG. De acordo com Li et al. em 2014, a expressão de IFN-γ, bem como de TNF-α foi notavelmente regulada negativamente em células natural killers (NK) provenientes de pacientes com hepatite B crônica na fase de imunoativação, quando comparada com pacientes na fase de imunotolerância e com indivíduos saudáveis [21].

No entanto, não foram encontrados estudos que relacionem o polimorfismo na posição 97 da região promotora do gene *IFNAR1* à susceptibilidade da infecção pelo HBV. Contudo, quando analisada essa mesma região em relação à progressão e susceptibilidade ao HIV-1 em uma coorte na França [22] e à resposta ao IFN-α em casos de leucemia mieloide crônica [23] não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes. O presente estudo corrobora a distribuição das proporções alélicas identificadas por Diop et al. em 2006 nos grupos de casos e controles.

Em relação ao polimorfismo do gene *IFNG*(-5), o alelo polimórfico G apresentou maior frequência (p=0,03) entre os indivíduos com altos níveis de carga viral, independente dos níveis de expressão do *IFNG*(-5) nesses indivíduos. Verificou-se também que os níveis de expressão do gene *IFNG* (mediana=3,7±1,7x10⁶ng/μL) em pacientes com genótipo *IFNG*(-5) AA implicam 60% da redução de carga viral, sendo considerado um fator de proteção para a evolução do estado crônico.

Segundo Bream et al. (2002), o controle da expressão do gene *IFNG* é fortemente regulada ao nível transcricional e que polimorfismos neste gene pode resultar em alterações na expressão gênica e associação com a patogênese de algumas doenças [24]. Assim, o padrão de expressão local do *IFNG* é suficiente para iniciar e manter uma doença inflamatória hepática específica em camundongos, e a expressão aberrante desse gene mostrou-se associada à hepatite crônica [25].

A regulação da transcrição do gene *IFNG* é complexa, e vários fatores de transcrição tem mostrado interagir com a região promotora proximal constitutivamente ou por indução. A consequência da expressão aberrante do *IFNG* foi analisada em camundongos transgênicos, mostrando que uma expressão acentuada de IFNG resultou em redução de células B, T e progenitores hematopoiéticos, enquanto que a interrupção da produção de *IFNG* levou à susceptibilidade à patógenos intracelulares [26].

Em relação aos níveis de carga viral, ALT, AST, GGT e o sexo dos indivíduos não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as frequência genotípicas e alélicas, corroborando os estudos de Kimkong et al. (2013) que ao testarem associações entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos no *IFNA1* (-2529) e *IFNA5* (-1823) com a carga viral e enzimas hepáticas ALT e AST, não encontraram diferenças significantes entre essas variáveis [27]. No entanto, nos estudos de Chen et al. (2005), os elevados níveis séricos do HBV-DNA (≥10000cópias/mL) mostraram-se fortes preditores no desenvolvimento do HCC independente dos níveis de HBeAg, ALT, e da presença de cirrose hepática [28].

Os resultados indicam que a presença da variante polimórfica do gene *IFNA1*(-2) está associada com a cronicidade da infecção pelo HBV, e que altos níveis de expressão do gene *IFNAR1*

e baixos níveis de *IFNA1* contribuem para a patogênese da infecção crônica nestes indivíduos. Desses pacientes, os que apresentam genótipo polimórfico *IFNA1* (-2) CT e alelo T apresentam maior proteção para a cronicidade pelo HBV.

Desta forma, a estratificação precoce dos grupos baseados na identificação destes SNPs e do padrão de expressão das citocinas associados à carga viral poderão representar um papel importante como preditores de resultado pré-tratamento, auxiliando na escolha do período de início da terapia antiviral, da dosagem de medicamento a ser administrado e prever significativamente a resposta virológica sustentada em pacientes infectados pelo HBV.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia (CNPq) pelo apoio financeiro para este estudo e a todos os médicos e pacientes do ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas - UFPE e do Serviço de Assistência Especializada do Hospital Helvio Auto (UNCISAL).

6. REFERENCES

- [1] Lyra AC, Cavalcante LN, Lyra LGC. Hepatite crônica B. Rev Bras Med 2010;67:39–48.
- [2] WHO World Health Organization [Internet]. Hepatitis B, Fact sheet n°204; c2014 [updated 2013 Jul; cited 2014 March 3]. [about 3 screens]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- [3] Pereira LMMB, Ximenes RA de A, Moreira RC, Braga MC, Montarroyos UR. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2010.
- [4] Lin C-L, Kao J-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. J Gastroenterol Hepatol 2011; 26 Suppl 1:123–30.
- [5] Han Q, Duan S, Zhang G, Li Z, Li N, Zhu Q, et al. Associations between cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 polymorphisms and serum tumor necrosis factor- α and interferon- γ levels in patients with chronic hepatitis B virus infection. Inflamm Res 2011;60:1071–8.
- [6] Conde SRSS. Correlação dos níveis séricos e dos polimorfismos nos genes de citocinas (TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 e IL-10) com a apresentação clínica da hepatite crônica [dissertation]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2010.
- [7] Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. Viruses 2010;2:1394–410.
- [8] Kim SS, Cheong JY, Lee D, Lee SK, Kim M-H, Kwack K, et al. Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor accessory protein gene polymorphisms are associated with persistent hepatitis B virus infection. Hepatogastroenterology 2012;59:190–7.

- [9] He X-X, Chang Y, Jiang H-J, Tang F, Meng F-Y, Xie Q-H, et al. Persistent effect of IFNAR-1 genetic polymorphism on the long-term pathogenesis of chronic HBV infection. *Viral Immunol* 2010;23:251–7.
- [10] Qi S, Cao B, Jiang M, Xu C, Dai Y, Li K, et al. Association of the -183 Polymorphism in the IFN- γ Gene Promoter With Hepatitis B Virus Infection in the Chinese Population. *J Clin Lab Anal* 2005;19:276–81.
- [11] Cheong JY, Cho SW, Chung SG, Lee J a, Yeo M, Wang HJ, et al. Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. *Biochem Genet* 2006;44:246–55.
- [12] Gao Q-J, Liu D-W, Zhang S-Y, Li-Min W, Wu L-H, Wang S-Y, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 2009;15:5610–9.
- [13] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual. Protoc. 1- Isol. High-molecular-weight DNA from Mamm. Cells Using Proteinase K Phenol.* 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001, p. 6.4–6.11.
- [14] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167–85.
- [15] Manly KF. Reliability of statistical associations between genes and disease. *Immunogenetics* 2005;57:549–58.
- [16] Pan CQ, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005;2:36–40.
- [17] Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507–39.
- [18] Chu C, Yeh C, Lee C, Sheen I, Liaw Y. Precore Stop Mutant in HBeAg-Positive Patients with Chronic Hepatitis B: Clinical Characteristics and Correlation with the Course of HBeAg-to-Anti-HBe Seroconversion. *J Clin Microbiol* 2002;40:16–21.
- [19] Uno K, Suginoshta Y, Kakimi K, Moriyasu F, Hirosaki M, Shirakawa T, et al. Impairment of IFN- α production capacity in patients with hepatitis C virus and the risk of the development of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:7330–4.
- [20] Wu D, Liu F, Li J, Liu C, Liu L, Tang H, et al. Intrahepatic IFN- α expression in liver specimens from HBV-infected. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:2474–80.
- [21] Li Y, Wang J-J, Gao S, Liu Q, Bai J, Zhao X-Q, et al. Decreased peripheral natural killer cells activity in the immune activated stage of chronic hepatitis B. *PLoS One* 2014;9:e86927.
- [22] Diop G, Hirtzig T, Do H, Coulonges C, Vasilescu a, Labib T, et al. Exhaustive genotyping of the interferon alpha receptor 1 (IFNAR1) gene and association of an IFNAR1 protein variant with AIDS progression or susceptibility to HIV-1 infection in a French AIDS cohort. *Biomed Pharmacother* 2006;60:569–77.
- [23] Kreil S, Waghorn K, Ernst T, Chase A, White H, Hehlmann R, et al. A polymorphism associated with STAT3 expression and response of chronic myeloid leukemia to interferon α . *Haematologica* 2010;95:148–52.
- [24] Bream J, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young H. gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes Immun* 2002;3:165–9.

- [25] Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Sc]hichiri M, et al. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon- γ in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:614–8.
- [26] Young H a, Klinman DM, Reynolds D a, Grzegorzewski KJ, Nii A, Ward JM, et al. Bone marrow and thymus expression of interferon-gamma results in severe B-cell lineage reduction, T-cell lineage alterations, and hematopoietic progenitor deficiencies. *Blood* 1997;89:583–95.
- [27] Kimkong I, Tangkijvanich P, Hirankarn N. Association of interferon-alpha gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Immunogenet* 2013;40:476–81.
- [28] Chen C-C, Yang S-Y, Liu C-J, Lin C-L, Liaw Y-F, Lin S-M, et al. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Epidemiol* 2005;34:1310–8.

APÊNDICE B – Versão do artigo em inglês

Association of the -2 C>T polymorphism in the *IFNA1* gene and higher *IFNAR1* gene expression levels with chronic hepatitis B infection

Joelma Carvalho Santos^{1, 2}, Dayse Maria Vasconcelos de Deus^{1, 2}, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes^{1,3}, Maria Rosileide Bezerra Alves⁴, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2,5}

¹Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Health Sciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;

²Virology sector, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil;

³Department of Clinical Medicine, Clinical Hospital, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴Helvio Auto Hospital School (HEHA), Alagoas State University of Health Sciences (UNCISAL), Maceió, Alagoas, Brazil

⁵Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil.

Abstract

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the variant expression of some interferon genes in patients with hepatitis B virus (HBV) chronic infection might be related to higher viral load and complications of the disease. Thereby, 208 Brazilian patients (94 HBV chronic infected patients and 114 HBV immune subjects) were enrolled in a case-control study to investigate the association between *IFNG* (-5A>G), *IFNA1* (-2C>T), *IFNAR1* (-97T>C) genes with their expression levels and HBV viral load. Genotyping was performed by qPCR according to the High Resolution Melting method. Viral quantification and gene expression were carried out using qPCR. Chronic infected HBV patients with *IFNA1* CT genotype and T allele were more likely to develop protection against HBV when compared to immune subjects with the wild-type genotype (*IFNA1* CT/CC: OR=0.45, p=0.01 and T/C allele: OR=0.54, p<0.01). In patients with *IFNAR1* wild-type TT genotype the expression levels of this receptor explains in 40% the lower viral load levels ($r^2=0.40$ | p=0.04) and a protection against the chronicity. These findings suggest that the polymorphic variant of *IFNA1*(-2) gene is associated with chronic HBV infection, and high expression levels of *IFNAR1* gene and low levels of *IFNA1* might contribute to the pathogenesis of chronic infection in these subjects.

Keywords: Hepatitis B virus; single nucleotide polymorphism; interferon-alpha; interferon-gamma; interferon-alpha receptor; gene expression.

1. INTRODUCTION

Hepatitis B virus (HBV) infection is a major global health problem related to significant morbidity and mortality causing chronic liver disease and chronic infection. Worldwide, two billion people have been infected with HBV [1], 360 million have chronic infection, and 600,000 die every year due to the acute or chronic consequences of hepatitis B [2]. In Brazil, the prevalence of seropositivity exposure to HBV infection (anti-HBc), in the population aged between 10 and 69 years was 7.4% [3].

The outcomes HBV infection are heterogeneous [4]. Among the risk factors for acute hepatitis B and its progression to chronic hepatitis, the imbalances in inflammation reactions [5] and the HBV genotype [4] play an important role in HBV-induced hepatocarcinogenesis.

The reasons for persistent HBV infection are not fully understood. Although, some studies [6–8] describe a relationship between HBV chronic infection and host immune factors, especially the patient's age at infection and also the presence of Single nucleotide polymorphisms (SNPs).

In addition to the SNPs identification, expression pattern of IFN- γ e IFN- α cytokines and the genetic variations in the subunit 1 of the interferon alpha receptor (IFN- α r1) might contribute to the determination of clearance or chronicity in the early stages of HBV exposure, but they also persistently influence pathogenesis over the long-term process of chronic HBV infection [9].

Recent studies, mainly in the Asian population [8,10–12] analyzed the relationship between the presence of gene polymorphisms and the serum levels of different cytokines related to the persistence of chronic HBV infection. However, there are disagreements concerning the host susceptibility to persistent HBV infection when considered the patterns of genotypic diversity.

There is not enough information available regarding *IFNG* (-5A>G), *IFNA1* (-2C>T) and *IFNAR1* (-97T>C) gene polymorphism in these regions. Thus, when these SNPs are described in other gene location there is a disagreement related to the presence of significant associations between the polymorphisms analyzed and the HBV persistent infection.

These SNPs identification and the expression pattern of cytokines associated with the viral load might be useful in clinical practice to stratify groups of higher or lower risk, and contribute into the development of a more effective treatment for each patient and provide a better understanding of the immune response in the chronic hepatitis B infection.

The aim of the present study was to investigate the relationship between genotypic and allelic frequencies of *IFNA1* (-5A>G), *IFNG* (-2C>T) and *IFNAR1* (-97T>C) gene polymorphisms with the expression levels of these cytokines and the HBV viral load in patients with chronic HBV infection (not receiving any antiviral treatment).

2. METHODS

2.1 Subjects

The case-control study included 208 Brazilian adults: 94 patients with HBV chronic infection not receiving any antiviral treatment (64 men and 30 women) and 114 immune subjects (84 men and 30 women) attending two outpatient referral centers for hepatitis (Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco and Helvio Auto Hospital School of Alagoas State University of Health Sciences) from October 2010 to August 2013. All patients gave informed consent to participate in the study.

The diagnostic criteria for chronic hepatitis B infection were positivity for hepatitis B surface antigen (HBsAg>125mU/mL) and presence of anti-Hepatitis B core total antibodies (anti-HBc total>1.5Unit PEI/mL) or IgG for more than 6 months. In addition, the immune controls had seropositivity for Hepatitis B surface antibody (anti-HBs>10mU/mL), lack of HBsAg and presence of anti-HBc total.

Patients receiving any antiviral treatment for less than 6 months from the date of inclusion, HIV and/or HCV co-infected and undergoing immunosuppressive therapy were excluded from the study.

2.2 SNP genotyping

Genomic DNA was isolated from white blood cells using the phenol (pH±8.0)/chloroform-based method [13]. The genomic DNA quantification measured by nanodrop 2000 (ThermoScientific®) was around 500ng (100-1000ng). Artificially constructed sequences were used as positive controls for wild-type and polymorphic alleles with 75bp amplicons related to each genotypes (table 1). Heterozygous genotypes were obtained by an equimolar mixture of the two alleles of the sequences.

To identify the *IFNG* (A>G, rs202055606), *IFNA1* (C>T, rs181407537) and *IFNAR1* (T>C, rs2850015) polymorphisms by real-time quantitative PCR (qPCR) and High Resolution Melting (HRM) method, the reaction of HRM-PCR contained 2µL of fluorophore master mix Eva Green 1x with BSA (Solis BioDyne®), 0.7 pmol/µL of each primer (forward and reverse) at 10 pmol/µL and 2µL of genomic DNA isolated. The conditions of the reaction were: denaturalization at 94°C for 15 seconds, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 15 seconds, and a final extension step at 72°C for 60 seconds.

The melting conditions were 50 to 90 degrees of gradual warming, rising 0.7 degrees in every 7 seconds for the formation of the dissociation curve, and waiting of 90s for the pre-melt conditions. The melting temperatures were between 88.4°C and 89.4°C for *IFNA1* genotypes, 88.4-89.7°C for *IFNG* and 75.9-76.9°C for *IFNAR1*. The percentage of confidence level accepted for genotyping accuracy was above 99%.

2.3 HBV-DNA detection and quantification

The HBV-DNA was isolated from 400 μ L of plasma using the phenol (pH $\pm$ 8.0)/chloroform-based method [13] and eluted in 100 μ L of rehydration solution (buffer TE 1x), obtaining a quantification measured by nanodrop 2000 of 1 to 1500 η g.

The PCR reaction contained 2 μ L of HBV-DNA isolated, 2 μ L of master mix Eva Green 1x without BSA (Solis BioDyne®) and 0.7 μ L of each primer at 10pmol/ μ L (table 1). PCR conditions were: denaturalization at 94°C for 15minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds, annealing at 60°C for 15 seconds, and final extension step at 72°C for 60 seconds.

The melting conditions were 50 to 90 degrees of gradual warming, rising 0.7 degrees in every 7 seconds for the formation of the dissociation curve, and waiting of 90s for the pre-melt conditions. The melting temperature was between 80.1°C and 80.6°C. A standard curve ($R^2=0.99$ | slope=-3.31 | efficiency = 1.00) consisting in 5 serial dilutions referring to international standard (NIBSC) code 97/746 was obtained in IU/mL and converted in $\log_{10}$.

HBV-DNA quantification results were stratified according to viral load levels: low viral load, if below 2,000 IU/mL or 3.3 $\log_{10}$ and high viral load, if greater than or equal to 3.3 $\log_{10}$ or 2,000 IU/mL. The cutoff value for viral load levels was according to the EASL Clinical Practice Guidelines for chronic hepatitis B infection [14] as one of the criteria for the initiation of antiviral therapy.

2.4 Absolute gene expression of cytokines

The polymorphonuclear cells (PBMC) were harvested by Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare®) separation and stored in a guanidine isothiocyanate solution (4M) at -80°C. The mRNA was extracted from the PBMC solution using the acid phenol (pH $\pm$ 5.0)/chloroform-based method [13], and stored in a 0.1% (v/v) DEPC aqueous solution at -80°C. The cDNA was synthesized using ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega®) and random primers.

The expression levels of these cytokine genes were evaluated using RT-PCR containing 5 μ L of master mix Sybr Green-I, 0.7 μ L of each primer (table 1) at 10pmol/ μ L and 2 μ L of cDNA synthesized, with qPCR cycles at 94°C/ for 15 minutes, 45 cycles at 95°C for 15 seconds, 60°C for 20 seconds, followed by a final extension of 25 seconds at 72°C. The melting conditions were the same as for SNP genotyping and viral load, with the melting temperatures at 62°C for *IFNA1* gene expression, 68°C for *IFNG* and 66°C for *IFNAR1*.

The absolute expression (AE) was quantified using as constitutive genes (housekeepings), the *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) and the β -actin (table 1), in which: AE = [reporter gene] / [*GAPDH* x β -actin].

The gene expression levels were analyzed only for the HBV chronic infected group and they were stratified in low expression levels (values below the median level of expression) and high expression levels (values equal or above the median level of expression) corresponding to each gene analyzed. The specificity of the expression primers was confirmed by the melting curve related to each gene.

Table 1 – Polymorphism position, NCBI number, PCR primer sequences, annealing temperature and product size in *IFNG*(-5), *IFNA1*(-2), *IFNAR*(-97) genes, *GAPDH* and β *actin* housekeeping genes and in HBV.

SNP position	Polimorphism	NCBI number	PCR Primer sequences (Forward / Reverse)	Annealing temperature	pb*
<i>IFNG</i> (-5) (rs181407537)	A → G		(F): 5'-AACTACTGATTTCAACTTCTTTG-3' (R): 5'-TGAAAAGCCAAGATATAACTTGT-3'		
Positive control <i>IFNG</i> (-5)	Allele G	NM000619.2	5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC <u>G</u> GA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3'	68°C	75
Positive control <i>IFNG</i> (-5)	Allele A		5'-AAC TAC TGA TTT CAA CTT CTT TGG CTT AAT TCT CTC <u>A</u> AA AAC GAT GAA ATA TAC AAG TTA TAT CTT GGC TTT TCA-3'		
<i>IFNA1</i> (-2) (rs202055606)	C → T		(F): 5'-CCCATCTCAGCAAGCCCAGAA-3' (R): 5'-CACCAGGACCATCAGTAAAGCA-3'		
Positive control <i>IFNA1</i> (-2)	Allele T	BC112302.1	5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT <u>A</u> TG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3'	62°C	75
Positive control <i>IFNA1</i> (-2)	Allele C		5'-CCC ATC TCA GCA AGC CCA GAA GTA TCT GCA ATA TCT <u>A</u> CG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GTC CTG GTG-3'		
<i>IFNAR1</i> (-97) (rs2850015)	T → C		(F): 5'-GTAGAGGGGCGGTGAGAGCTA-3' (R): 5'-CGCCATCGCCCCGTCCTAAG-3'		
Positive control <i>IFNAR1</i> (-97)	Allele T	NM000629.2	5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT <u>G</u> TG CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3'	66°C	75
Positive control <i>IFNAR1</i> (-97)	Allele C		5'-GTA GAG GGG CGG TGA GAG CTA AGA GGG GCA GCG CGT <u>G</u> CG CAG AGG GGC GGT GTG ACT TAG GAC GGG GCG ATG GCG-3'		
<i>GAPDH</i>	Constitutive gene	XM005253678.1	(F): 5'-CCAAAATCAAGTGGGGCGATG-3' (R): 5'- AAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCG-3'	50°C	200
β-actina	Constitutive gene	XM005249820.1	(F): 5'- ATTAAGGAGAAGCTGTGCTACG-3' (R): 5'- TCATTGCCAATGGTGATGACCT-3'	50°C	125
HBV	Viral load	JQ000009.1	(F): 5'-GGACCCCTGCTCGTGTTACA-3' (R): 5'-GAGAGAAGTCCACCACGAGTCTAGA-3'	60°C	90

2.5 Statistical analysis

The frequencies of the alleles and genotypes among the groups were tested by the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) between the observed and expected genotype values according to the HWE.

The chi-square (χ^2) test was performed to identify the association between age, sex, viral load, and gene expression, allelic and genotypic frequencies. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals were calculated. *Mann Whitney* and *Kruskal Wallis* Nonparametric tests were performed to compare the genotype frequencies with the gene expression levels and the viral load.

Non-linear association between the variables (gene expression and viral load) and the degree of association (significant p value) were verified using the coefficient of determination (r^2) based on Spearman's rank correlation coefficient (ρ).

P-values < 0.05 were considered to indicate statistical significance throughout the study using *BioEstat 5.0* e *GraphPad Prism 5.0* softwares.

3 RESULTS

3.1 Characterization of patient population and laboratory parameters

The clinical and laboratory characteristics of the case-control population were compared. There was no significant difference ($p > 0.05$) between HBV infection in terms of sex between cases and controls (M/F = 64:30 and 84:30, respectively). However, a difference was observed between the age of the HBV infected patients and the control group ($p = 0.01$), with the largest number of cases aged between 40 and 60 years, while most of the controls were in the age group of 19-39 years. The mean age was 44.54 (± 13.52 years-old) for patients with HBV infection was 37.74 (± 11.40) years-old for controls.

Eleven (29.72%) chronic HBV infected patients with low viral load showed positive anti-HBe. Regarding to the high viral load group, 15 (26.31%) were HBeAg-negative patients, indicating the absence of replication, or possible basal core promoter or precore mutations of HBV.

Table 2 summarizes the data regarding the laboratory characteristics of patients with HBV chronic infection according to viral load levels. In patients with HBV chronic infection, the mean viral load was 3.2 $\log_{10}$ and for *IFNA1*, lower expression levels were observed (median = 2.56×10^{-1} ng/ μ L) when compared to *IFNG* (median = 4.54×10^5 ng/ μ L) and *IFNAR1* genes (median = 6.92×10^9 ng/ μ L). There was no significant difference ($p > 0.05$) according to viral load between ALT, AST, γ GT enzymes, expression levels of cytokines, white blood count, total and indirect bilirubin (table 2).

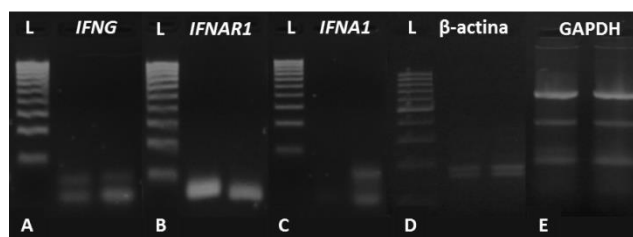
Table 2 – Laboratory characteristics of the 94 chronic HBV infected patients according to viral load levels.

Laboratory characteristics	Low viral load (<3.3log ₁₀) n=37		High viral load (≥3.3log ₁₀) n=57		p*
	(Male/Female: 26/11)		(Male/Female: 38/19)		
	Median	Maximum/minimum interval	Median	Maximum/minimum interval	
White blood count (x10 ⁹ /L)	4,600	[3,400-8,800]	6,600	[2,600-12,130]	0.0522
Serum quantification					
ALT (IU/L)	25	[13-102]	25	[9.9-70.0]	0.1773
AST (IU/L)	24	[12-104]	24	[10.9-81.3]	0.3256
γGT (IU/L)	33	[13-171]	25	[10-426]	0.1911
Total bilirubin (mg/dL)	0.60	[0.20-1.50]	0.52	[0.20-2.20]	0.4106
Indirect bilirubin (mg/dL)	0.30	[0.1-1.0]	0.30	[0.10-1.70]	0.7622
Gene expression					
<i>IFNG</i> (ng/μL)	13.0	[9.6x10 ⁻¹⁰ -6.9x10 ⁶]	3.0	[1.5x10 ⁻⁸ -1.2x10 ⁷]	0.8400
<i>IFNA1</i> (ng/μL)	6.7x10 ⁻⁷	[2.8x10 ⁻¹² -5.4]	1.7x10 ⁻⁷	[1.7x10 ⁻¹⁰ -11.4]	0.8730
<i>IFNAR1</i> (ng/μL)	11.7	[0-1.1x10 ¹¹]	168.0	[3.5x10 ⁻⁸ -1.2x10 ⁷]	0.1784

*p value for *Mann-Whitney* test.

The PCR products were visualized by electrophoresis in agarose gel and stained with Blue Green. Each product size corresponds to the expression of an interferon and constitutive genes, as shown in figure 1.

Figure 1 – PCR products in agarose gel (2%) referring to *IFNG* (75pb, with primer-dimer), *IFNAR1* (75pb), *IFNA1* (75pb with primer-dimer), β-actina (±125pb), GAPDH (±200pb) gene expression. Ladder (L, 100pb).



The frequencies fit and the criteria as set out by Manly in 2005 [15]. The distribution of observed genotypes was not significantly different from expected distribution according to HWE for the three genes analyzed ($p > 0.05$). This indicates that these populations had a relatively stable genetic background and were suitable for genetic statistical analysis.

3.2 Genotype and allele distribution of *IFNA1* (-5A>G), *IFNG* (-2C>T) and *IFNAR1* (-97T>C) in HBV chronic infected patients and immune controls

The *IFNA1*(-2) CT heterozygous genotype showed association with protection against HBV chronicity when compared to subjects with wild-type *IFNA1*(-2) CC genotype (OR=0.45, 95%CI=0.25-0.81). Regarding to allele frequencies, *IFNA1*(-2) T polymorphism was associated as well with an increased protection against HBV chronicity (OR=0.54, 95%CI=0.35-0.82) when compared with *IFNA1*(-2) C allele ($p=0.0054$). However, *IFNA1*(-2) CC/TT polymorphisms did not differ significantly between the groups (table 3).

The *IFNAR1*(-97) and the *IFNG*(-5) gene polymorphism did not reach statistical significance neither in genotype nor in allele distribution between any of the groups analyzed (table 3).

Table 3 - Genotypic and allelic frequency of *IFNA1* (-5 A>G), *IFNG* (-2 C>T) and *IFNAR1* (-97 T>C) in HBV chronic infected patients and immune controls.

Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms	HBV chronic infection (Cases)	Immune individuals (Controls)	OR	95% CI	p*
	n=94	n=110			
	n (%)	n (%)			
<i>IFNG</i>					
AA	42 (44.7)	56 (49.1)	1	-	
AG	40 (42.5)	48 (42.1)	1.11	0.62-1.98	0.8350
GG	12 (12.8)	10 (8.8)	1.60	0.63-4.05	0.5995
A	124 (66.0)	160 (70.2)	1	-	
G	64 (34.0)	68 (29.8)	1.21	0.80-1.84	0.4156
<i>IFNA1</i>					
CC	53 (56.4)	41 (36.0)	1	-	
CT	35 (37.2)	60 (52.6)	0.45	0.25-0.81	0.0109
TT	6 (6.4)	13 (11.4)	0.36	0.13-1.02	0.0850
C	142 (75.5)	142 (62.3)	1	-	
T	46 (24.5)	86 (37.7)	0.54	0.35-0.82	0.0054
<i>IFNAR1</i>					
TT	44 (46.8)	53 (46.5)	1	-	
TC	45 (47.9)	43 (37.7)	1.26	0.71-2.25	0.5236
CC	5 (5.3)	18 (15.8)	0.34	0.12-0.97	0.0663
T	133 (70.7)	149 (65.4)	1	-	
C	55 (29.3)	79 (34.6)	0.78	0.52-1.18	0.2863

3.3 Genotype and allele distribution according to viral load levels and gene expression of cytokines

Comparing the expression levels of the three genes analyzed. It was observed that patients with *IFNAR1*(-97) TC genotype showed higher expression levels (mean= 1.38×10^{10} ng/ μ L, $p=0.0166$). The *IFNA1*(-2) CC genotype showed higher expression levels (mean= 3.84×10^{-1} ng/ μ L) when compared with *IFNA1*(-2) CT and TT genotypes, although they did not differ significantly ($p=0.7488$). Also, the *IFNG*(-5) polymorphisms did not reach statistical significance (figure 2).

Figure 2 – *IFNA1* (-2 C>T), *IFNAR1* (-97 T>C) and *IFNG* (-5 A>G) gene expression according to the genotypes of chronic HBV infected patients.

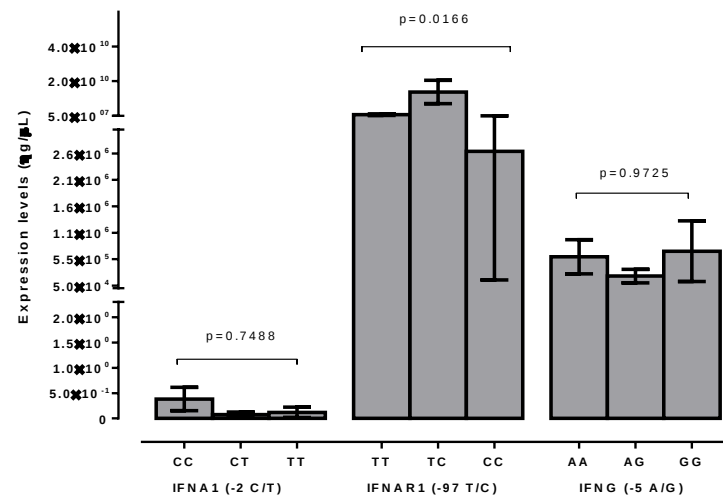


Table 4 shows the comparison between genotype and allele frequencies with viral load levels. The *IFNG*(-5) polymorphism's G allele showed higher frequency ($p=0.03$) with high viral load quantification, independent of the *IFNG* expression levels in these subjects. However, *IFNG*(-5) AA/GG genotypes and A alleles did not differ significantly between any of the groups analyzed (table 4).

The polymorphic C allele of the *IFNA1*(-2) gene showed higher frequency ($p=0.04$) with high viral load and low levels of *IFNA1* expression. However, no statistically significant association with the *IFNA1*(-2) T allele was observed (table 4).

A genotypic and allelic association was observed between high viral load and *IFNAR1*(-97) low levels of gene expression in TT genotype subjects ($p = 0.02$) and wild-type T allele ($p=0.01$). The *IFNAR1*(-97) TC/CC genotypes and the C allele of the *IFNAR1* did not reach statistical significance (table 4).

Table 4 – Genotype and allele distribution of *IFNA1* (-5A>G), *IFNG* (-2C>T) and *IFNAR1* (-97T>C) according to viral load and gene expression of the 94 HBV chronic infected patients.

Genotypic and allelic frequencies of polymorphisms	Viral load levels (log ₁₀) n=94		Gene expression levels (ng/μL) n=94		p***
	<3.3 log ₁₀ (n=37)	≥3.3 log ₁₀ (n=57)	Low* (n=47)	High** (n=47)	
<i>IFNG</i>					
AA	17 (45.95)	25 (43.86)	20 (42.55)	22 (46.81)	0.66
AG	16 (43.24)	24 (42.11)	22 (46.81)	18 (38.29)	0.26
GG	4 (10.81)	8 (14.03)	5 (10.64)	7 (14.90)	0.50
A	50 (67.57)	74 (64.91)	62 (65.96)	62 (65.96)	0.16
G	24 (32.43)	40 (35.09)	32 (34.04)	32 (34.04)	0.03
<i>IFNA1</i>					
CC	19 (51.35)	34 (64.82)	29 (61.70)	25 (53.19)	0.09
CT	17 (45.95)	18 (31.48)	15 (31.92)	19 (40.43)	0.89
TT	1 (2.70)	5 (3.70)	3 (6.38)	3 (6.38)	0.54
C	55 (74.32)	86 (80.56)	73 (77.66)	69 (73.40)	0.04
T	19 (25.68)	28 (19.44)	21 (22.34)	25 (25.60)	0.49
<i>IFNAR1</i>					
TT	16 (43.24)	28 (59.58)	28 (59.57)	16 (34.04)	0.02
TC	18 (48.65)	27 (57.45)	16 (36.17)	29 (59.58)	0.83
CC	3 (8.11)	2 (4.26)	2 (4.26)	3 (6.38)	0.53
T	50 (67.57)	85 (7.28)	72 (77.66)	61 (63.83)	0.01
C	24 (32.43)	31 (26.72)	22 (22.34)	33 (36.17)	0.70

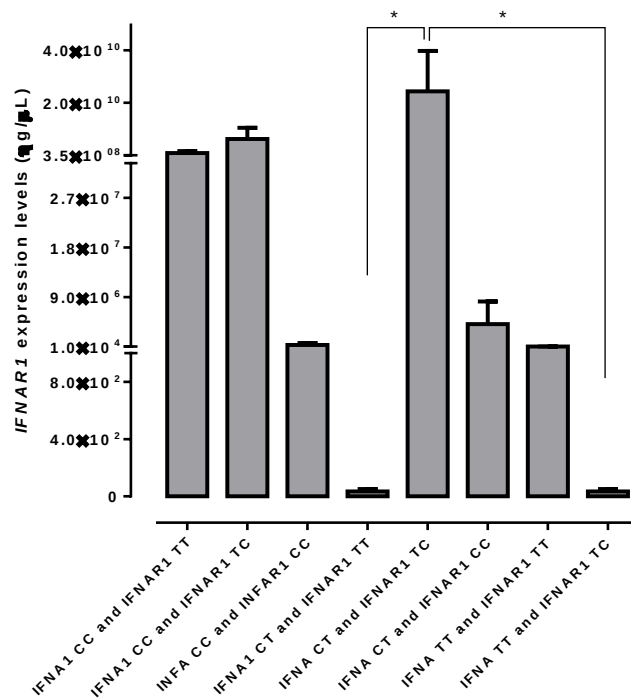
*Low expression levels: Values below the median expression levels. The *IFNG* median corresponds to 3.70ng/μL. *IFNA1* equals 4.83x10⁻⁷ng/μL and *IFNAR1* corresponds to 5.02x10¹ng/μL.

**High expression levels: greater than the median of all samples according to the expression levels.

***p value for qui-square regarding to viral load levels and gene expression according to genotypes and alleles.

Figure 3 shows the *IFNAR1* expression levels regarding to the *IFNAR1*(-97) and *IFNA1*(-2) genotypes combination. It was observed that subjects with *IFNA1* (A/G) and *IFNAR1* (T/C) heterozygote genotype have higher levels of *IFNAR1* transcript expression when compared with individuals with a polymorphic allele in one of the genes (*IFNA1* CT and *IFNAR1* TT, n=13 vs. *IFNA1* CT and *IFNAR1* TC, n=18, *p=0.0124 | *IFNA1* CT and *IFNAR1* TC, n=18 vs. *IFNA1* TT and *IFNAR1* TC, n=13, *p=0.0124).

Figure 3 - *IFNAR1* gene expression according to *IFNA1* (CC, CT and TT) and *IFNAR1* (TT, TC and CC) genotype combination in patients with HBV chronic infection.



3.4 Gene expression and viral load correlation

Table 5 shows only the strong and substantial correlations and obtained *p* values above 0.60. Among the combinations, it was observed that *IFNA1*(-2) CT and *IFNG*(-5) AA; *IFNA1*(-2) CT and *IFNG*(-5) AG patients showed significant correlation. However, they did not reach statistical significance.

Regarding to *IFNA1* polymorphism, it was observed that subjects with *IFNA1*(-2) CC and wild-type *IFNG*(-5) AA genotype presented a Spearman's rank correlation coefficient of -0.60, indicating the existence of a negative correlation among the expression of the genotypes analyzed (*p*=0.043). Thus, an *IFNA1* increased expression in *IFNA1*(-2) CC genotype subjects explains 36% of the *IFNG* gene decrease expression in subjects with *IFNG*(-5) wild-type AA genotype (table 5).

Subjects with *IFNAR1*(-97) TC and *IFNG*(-5) AG heterozygous genotypes showed a statistically significant (*p*=0.025) positive correlation (*p*=0.62). Thus, *IFNAR1* increased expression in subjects with TC heterozygote genotype is assigned in 38% to lower *IFNG* expression levels in subjects with *IFNG*(-5) GA genotype. Likewise, high viral load levels in patients with wild-type *IFNAR1*(-97) TT genotype may also to be attached in 40% (*p* =0.63) to low expression levels of this gene (*p*=0.040).

Regarding to the *IFNG* gene, the low expression levels of this gene in wild-type *IFNG*(-5) AA genotype patients explain in 60% (*p*=0.77) the viral load elevation detected in these patients (*p*=0.005).

Table 5 – *Spearman's* rank correlation between the gene expression levels and viral load levels in patients with HBV chronic infection

	n	<i>Spearman's</i> rank correlation coefficient (ρ)	Determination Coefficient (r^2)	* <i>p</i>
<i>IFNA1</i> CC and <i>IFNG</i> AA	12	-0.60	0.36	0.043
<i>IFNA1</i> CT and <i>IFNG</i> AA	7	0.75	0.56	0.066
<i>IFNA1</i> CT and <i>IFNG</i> AG	4	-0.80	0.64	0.333
<i>IFNAR1</i> TT and viral load	11	-0.63	0.40	0.040
<i>IFNAR1</i> TC and <i>IFNG</i> AG	13	0.62	0.38	0.025
<i>IFNG</i> AA and viral load	12	-0.77	0.60	0.005

**p* value for *Spearman's* rank correlation test.

4. DISCUSSION

The outcome of HBV infection and the severity of HBV-induced liver disease vary widely between patients. In approximately 95% of the adults infected with HBV, is observed an acute infection that is rapidly resolved without long-term consequences, whereas 5% fail to control viral infection, leading to chronicity [7]. The majority of HBV chronic infected patients are at great risk of developing complications such as cirrhosis, liver failure and hepatocellular carcinoma [16].

Host and viral risk factors for HCC include family history of HCC, male gender, HBV-DNA levels above 2,000 IU/mL in patients above 40 years of age older age, presence of cirrhosis and HBV core promoter mutation [17].

Some cytokines play a crucial role in regulating the HBV immune and inflammatory responses in the early stages of exposure to HBV, and still influence the pathogenesis of chronic infection in long-term [12]. Therefore, the SNP investigation in the regulatory regions and expression of the cytokine related genes are important as genetic predictors of the disease susceptibility or clinical outcome.

Polymorphic variants in these genes influence the cytokines serum levels and the clinical outcomes of chronic hepatitis B [6]. The outcome can be influenced by many factors such as host immune status, especially age at infection and the patient's immune response.

Different prevalence of HBV chronic infected subjects in other regions and countries lead to the hypothesis that there are genetic factors that may lead to the susceptibility of chronic disease [6]. No studies relating the SNPs in the interferon genes in the proposed regions with gene expression and viral load were identified.

The results suggest that polymorphisms in the interferon analyzed genes, associated with expression levels and viral load may be important in the risk of chronic HBV infection development. The subjects were mainly inactive HBV carriers ($n=24$ | 25.5%). However, patients with anti-HBe and high viral load $>3.3\log_{10}$ ($n=15$ | 26.31%) were identified indicating possible basal core promoter or precore mutations of HBV [18].

The present study showed that *IFNA1*(-2) CT genotype patients had association with protection against HBV chronicity when compared to subjects with wild-type *IFNA1*(-2) CC genotype (OR=0.45 |

$p=0.01$), which may lead to a major protection against HBV infection. Thus, the presence of the *IFNA1*(-2) T allele can be also considered a protection factor for these individuals contributing in 1.85 times to the protection ($OR=0.54$; $p<0.01$).

When stratified by viral load and expression levels, it is confirmed the chronicity risk in *IFNA1*(-2) C polymorphic allele subjects. Wild-type *IFNA1*(-2) CC was associated with an increased risk for developing chronic hepatitis B infection, since in these patients the *IFNA1*(-2) expression levels (median $2.4 \pm 1.70 \times 10^7 \text{ ng}/\mu\text{L}$) explain 36% ($p=0.6$ | $p=0.04$) of the *IFNG*(-5) gene expression decreasing (median $21.35 \pm 2.1 \times 10^6 \text{ ng}/\mu\text{L}$) in wild-type *IFNG*(-5) AA genotype subjects.

Uno et al. in 2005 showed an individual variation in the IFN- α production levels, showing that the IFN- α production capacity is determined by both the genetic background and by the physical condition, such as the presence/absence of infection, metabolic disorder and cancer. These differences in expression could be based on polymorphic changes in promoter regions of the *IFNA* gene, influencing the course of viral infection [19].

According to Wu et al. in 2013, the intrahepatic expression levels of IFN- α were higher in the HBV infected patients than the normal group and the intrahepatic IFN- α expression was also significantly higher in the cases with severe and chronic hepatitis groups. Thus, the intrahepatic IFN- α expression might correlate with liver inflammation after HBV infection, and confirming that high levels of IFN- α may play an important role in the occurrence of severe hepatitis B [20].

The *IFNAR1*(-97) gene polymorphism did not reach statistical significance neither in genotype nor in allele distribution between any of the groups analyzed. Although, when stratified according to the gene expression and viral load median levels, it was observed that high levels of viral load and low levels of gene expression in wild-type *IFNAR1*(-97) TT genotype ($p = 0.02$) and T allele ($p = 0.01$).

Therefore, in HBV chronic infected patients with wild-type *IFNAR1*(-97) TT genotype, this gene expression levels (mean $8.24 \pm 3.0 \times 10^9 \text{ ng}/\mu\text{L}$) explain 40% of the lower viral load ($p=0.63$ | $p=0.04$) and a possible protection for the chronic infection development regarding the expression levels and the *IFNAR1*(-97) CC polymorphic genotype ($OR=0.34$).

Regarding to *IFNAR1*(-97) TC and *IFNG*(-5) AG polymorphic genotypes patients, a positive significant correlation was observed ($p=0.62$ | $p=0.03$). Thus, the *IFNAR1* and *IFNG* higher expression levels simultaneously, suggests that *IFNAR1*(-97) gene high expression levels (median $409 \pm 4.5 \times 10^{10} \text{ ng}/\mu\text{L}$) contribute to the chronicity. Similarly, the increased *IFNAR1* TC heterozygote genotype expression is assigned in 62% to the *IFNG*(-5) low expression levels in GA genotype subjects. Which according to Li et al. in 2014, the expression of IFN- γ as well as TNF- α was remarkable down regulated in natural killer (NK) cells from patients with chronic hepatitis B in the immune activated stage as compared to patients in the immune tolerant stage and healthy individuals [21].

However, no studies correlating the *IFNAR1*(-97) polymorphism at position 97 in the promoter region and the HBV infection susceptibility were found. Nevertheless, when the same region was analyzed according to the progression and susceptibility to HIV-I in a cohort France [22] and the response to IFN- α in chronic myeloid leukemia cases [23] no significant differences were identified. The present study though confirms the allelic distribution identified by Diop et al. in 2006, in both case and control groups.

Regarding the *IFNG*(-5) gene polymorphism, the G polymorphic allele showed a higher frequency ($p=0.03$) among the patients with high viral load levels, regardless of the *IFNG*(-5) expression levels in these subjects. It was also found that the *IFNG*(-5) expression levels (median $3.7 \pm 1.7 \times 10^6 \text{ ng}/\mu\text{L}$) in *IFNG*(-5) AA genotype patients is considered a protection for chronic HBV, since they result in a 60% viral load reduction.

According to Bream et al. in 2002, the regulation of *IFNG* expression is stringently controlled at the transcriptional level and polymorphisms in this gene have been shown to modify expression of this genes and the association of SNPs with disease pathogenesis [24]. Thereby, the *IFNG* expression pattern is sufficient to induce chronic inflammatory disease and this mouse is a transgenic model of chronic active hepatitis [25].

The regulation of *IFNG* gene is complex and several transcription factors have been shown to interact with the proximal promoter region constitutively or by induction. The consequence of aberrant *IFNG* expression was analyzed in transgenic mice, showed a pronounced reduction in B-lineage cells in the bone marrow, T cells and myeloid progenitors in the bone marrow, whereas the interruption of *IFNG* production leads to susceptibility to intracellular pathogens [26].

The interferon's gene polymorphisms analyzed in this study had no significant association with viral load, ALT, AST, GGT levels, which agree with the studies of Kimkong et al. in 2013. In this research they did not find any significant association between *IFNA1* (-2529) and *IFNA5* (-1823) gene polymorphisms with the level of HBV-DNA, AST and ALT liver enzymes [27]. However, in the studies of Chen et al. in 2005 a high HBV-DNA quantification ($\geq 10^5 \text{ copies/mL}$) proved to be a strong predictor in the development of HCC regardless of the HBeAg, ALT levels, and the presence of liver cirrhosis [28].

Therefore, these findings suggest that the presence of a polymorphic variant of *IFNA1* (-2) gene is associated with chronic HBV infection, and high expression levels of *IFNAR1* gene and low levels of *IFNA1* contribute to the pathogenesis of chronic infection in these subjects. However, in these patients, those with the *IFNA1* (-2) CT polymorphic genotype and T allele were likely to show increased protection against HBV chronicity.

Thus, early group stratification according to the HBV chronicity risk based on SNPs identification, cytokine expression pattern and viral load can play a role as pretreatment predictors to select the best time of treatment initiation, the dosage of medication to be administered and to predict sustained virologic response in patients with chronic hepatitis B infection.

5. ACKNOLEDGMENTS

The authors thank to National Council for Scientific and Technology Development (CNPq) by the financial support for this study and all the doctors and patients from the hepatology outpatient service of the Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco and from the Specialized Assistance Services of Helvio Auto Hospital at Alagoas State University of Health Sciences.

6. REFERENCES

- [1] Lyra AC, Cavalcante LN, Lyra LGC. Hepatite crônica B. Rev Bras Med 2010;67:39–48.

- [2] WHO World Health Organization [Internet]. Hepatitis B, Fact sheet n°204; c2014 [updated 2013 Jul; cited 2014 March 3]. [about 3 screens]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.
- [3] Pereira LMMB, Ximenes RA de A, Moreira RC, Braga MC, Montarroyos UR. Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2010.
- [4] Lin C-L, Kao J-H. The clinical implications of hepatitis B virus genotype: Recent advances. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26 Suppl 1:123–30.
- [5] Han Q, Duan S, Zhang G, Li Z, Li N, Zhu Q, et al. Associations between cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 polymorphisms and serum tumor necrosis factor- α and interferon- γ levels in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Inflamm Res* 2011;60:1071–8.
- [6] Conde SRSS. Correlação dos níveis séricos e dos polimorfismos nos genes de citocinas (TNF- α , IFN- γ , TGF- β 1 e IL-10) com a apresentação clínica da hepatite crônica [dissertation]. Belém (PA): Universidade Federal do Pará; 2010.
- [7] Ait-Goughoulte M, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Innate antiviral immune responses to hepatitis B virus. *Viruses* 2010;2:1394–410.
- [8] Kim SS, Cheong JY, Lee D, Lee SK, Kim M-H, Kwack K, et al. Interleukin-1 β and interleukin-1 receptor accessory protein gene polymorphisms are associated with persistent hepatitis B virus infection. *Hepatogastroenterology* 2012;59:190–7.
- [9] He X-X, Chang Y, Jiang H-J, Tang F, Meng F-Y, Xie Q-H, et al. Persistent effect of IFNAR-1 genetic polymorphism on the long-term pathogenesis of chronic HBV infection. *Viral Immunol* 2010;23:251–7.
- [10] Qi S, Cao B, Jiang M, Xu C, Dai Y, Li K, et al. Association of the -183 Polymorphism in the IFN- γ Gene Promoter With Hepatitis B Virus Infection in the Chinese Population. *J Clin Lab Anal* 2005;19:276–81.
- [11] Cheong JY, Cho SW, Chung SG, Lee J a, Yeo M, Wang HJ, et al. Genetic polymorphism of interferon-gamma, interferon-gamma receptor, and interferon regulatory factor-1 genes in patients with hepatitis B virus infection. *Biochem Genet* 2006;44:246–55.
- [12] Gao Q-J, Liu D-W, Zhang S-Y, Li-Min W, Wu L-H, Wang S-Y, et al. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol* 2009;15:5610–9.
- [13] Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Protoc. 1- Isol. High-molecular-weight DNA from Mamm. Cells Using Proteinase K Phenol. 3rd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001, p. 6.4–6.11.
- [14] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012;57:167–85.
- [15] Manly KF. Reliability of statistical associations between genes and disease. *Immunogenetics* 2005;57:549–58.
- [16] Pan CQ, Zhang JX. Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005;2:36–40.
- [17] Lok ASF, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007;45:507–39.

- [18] Chu C, Yeh C, Lee C, Sheen I, Liaw Y. Precore Stop Mutant in HBeAg-Positive Patients with Chronic Hepatitis B: Clinical Characteristics and Correlation with the Course of HBeAg-to-Anti-HBe Seroconversion. *J Clin Microbiol* 2002;40:16–21.
- [19] Uno K, Sugimoto Y, Kakimi K, Moriyasu F, Hiroaki M, Shirakawa T, et al. Impairment of IFN- α production capacity in patients with hepatitis C virus and the risk of the development of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:7330–4.
- [20] Wu D, Liu F, Li J, Liu C, Liu L, Tang H, et al. Intrahepatic IFN- α expression in liver specimens from HBV-infected. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17:2474–80.
- [21] Li Y, Wang J-J, Gao S, Liu Q, Bai J, Zhao X-Q, et al. Decreased peripheral natural killer cells activity in the immune activated stage of chronic hepatitis B. *PLoS One* 2014;9:e86927.
- [22] Diop G, Hirtzig T, Do H, Coulonges C, Vasilescu a, Labib T, et al. Exhaustive genotyping of the interferon alpha receptor 1 (IFNAR1) gene and association of an IFNAR1 protein variant with AIDS progression or susceptibility to HIV-1 infection in a French AIDS cohort. *Biomed Pharmacother* 2006;60:569–77.
- [23] Kreil S, Waghorn K, Ernst T, Chase A, White H, Hehlmann R, et al. A polymorphism associated with STAT3 expression and response of chronic myeloid leukemia to interferon α . *Haematologica* 2010;95:148–52.
- [24] Bream J, Ping A, Zhang X, Winkler C, Young H. gamma promoter alters control of gene transcription. *Genes Immun* 2002;3:165–9.
- [25] Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Sc]hichiri M, et al. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon- γ in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:614–8.
- [26] Young H a, Klinman DM, Reynolds D a, Grzegorzewski KJ, Nii A, Ward JM, et al. Bone marrow and thymus expression of interferon-gamma results in severe B-cell lineage reduction, T-cell lineage alterations, and hematopoietic progenitor deficiencies. *Blood* 1997;89:583–95.
- [27] Kimkong I, Tangkijvanich P, Hirankarn N. Association of interferon-alpha gene polymorphisms with chronic hepatitis B virus infection. *Int J Immunogenet* 2013;40:476–81.
- [28] Chen C-C, Yang S-Y, Liu C-J, Lin C-L, Liaw Y-F, Lin S-M, et al. Association of cytokine and DNA repair gene polymorphisms with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *Int J Epidemiol* 2005;34:1310–8.

APÊNDICE C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Resolução 196/96-CNS)

Pesquisa: Análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) em genes de citocinas envolvidas na resposta imunológica desencadeada pelo vírus da hepatite B.

Pesquisadora: Dayse Maria Vasconcelos de Deus, Joelma Carvalho Santos.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE)

Você está sendo convidado a participar voluntariamente desta pesquisa cujo objetivo é estudar algumas alterações genéticas que podem alterar a carga viral e alanina aminotransferase (ALT) em pacientes com da hepatite B.

Será necessária a coleta de 10mL de sangue de uma veia para realizar os exames genéticos. Os materiais que serão utilizados na coleta de sangue são estéreis e descartáveis, o que reduzirá o risco de contaminação. Além disso, os profissionais que realizarão a coleta são experientes e tomarão os cuidados necessários para diminuir o risco de que o local onde a veia for mexida fique arroxado e/ou dolorido. Informo esta pesquisa busca investigar alterações genéticas do paciente com hepatite B que podem influenciar o agravamento da doença.

A coleta sanguínea no braço poderá acarretar uma leve dor e pequenos hematomas, contudo, não comprometerá a sua saúde. O questionário poderá constrangimento, porém será realizado em ambiente restrito.

Os pacientes analisados na pesquisa contribuirão para uma análise que visa associar um perfil genotípico – carga viral. Em outras pesquisas futuras, essa associação facilitará a estratificação de pacientes bons respondedores e maus respondedores do tratamento com antivirais, podendo nesses casos, direcionar os manejos terapêuticos e o combate do vírus da hepatite B. Como benefício direto o seu médico receberá informações quanto à quantificação da carga viral analisada em seu sangue. O material coletado será processado e armazenado no laboratório de virologia do LIKA/UFPE, por um período mínimo de cinco anos, sob a responsabilidade da professora Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho da UFPE.

Assinatura do pesquisador

Eu _____, RG _____
CPF _____ entendi que as informações fornecidas serão confidenciais, ou seja, na apresentação dos resultados da pesquisa não serão publicados dados que possam me identificar como participante da mesma. Sei que tenho a liberdade de me recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo da continuidade do meu tratamento. Entendo também que poderei buscar qualquer esclarecimento sobre a pesquisa por meio do pesquisador responsável e do comitê de ética nos endereços abaixo.

Assinatura do paciente

Assinatura da testemunha 1

Assinatura da testemunha 2

Recife, _____ de _____ de 201____.

Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical
Avenida Professor Moraes Rego, s/n – Bloco “A” Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. Cidade Universitária 50670-420, Recife – PE. Responsável: Dayse Maria Vasconcelos de Deus, Joelma Carvalho Santos (81) 2126-8527 (dayvasconcelos@hotmail.com)

Comitê de Ética em Pesquisa – UFPE

Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife-PE CEP: 50670-901 Tel.: (81) 2126-8588

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE

PROJETO DE PESQUISA

Título: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNP) EM GENES DE CITOCINAS ENVOLVIDAS NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DESENCADEADA PELO VÍRUS DA HEPATITE B

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 3

CAAE: 04034312.1.0000.5208

Pesquisador: Dayse Maria Vasconcelos de Deus

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 96.288

Data da Relatoria: 18/09/2012

Apresentação do Projeto:

No Brasil, estima-se que 15% da população tenham estado em contacto com o HBV e 1% das pessoas é portadora de fase crônica, ou seja, a persistência da infecção por mais de 6 meses. Vários estudos indicam determinadas interleucinas sendo essenciais respostas imunes contra o HBV. Diversos trabalhos associam polimorfismos de único nucleotídeo à redução ou aumento da expressão e consequentemente ao desempenho das interleucinas nas infecções virais. Este estudo tem como objetivo: Investigar a associação entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1 (-511), 2 (-330), 4 (-589), 6 (-572), 12 (rs 568408), 17 (rs73439726), 18 (-148), interferon α (rs624704), receptor do interferon α (rs 2257167), interferon γ (+874) e β defensina 1 (-44) em pacientes com hepatite B aguda ou crônica (não submetidos ao tratamento com antivirais) com a carga viral do vírus da hepatite B e aos níveis de alanina aminotransferase (ALT). Serão analisados pacientes com diagnóstico de hepatite B aguda ou crônica, atendidos no ambulatório de hepatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, estimando o tamanho amostral em 100 pacientes por ano. As amostras controles serão os pacientes que apresentarem menor quantificação viral (abaixo do cut off). A quantificação viral será considerada de acordo com o cut off de 30.000 cópias de DNA/mL referente à hepatite aguda, no qual valores acima de 30.000 e abaixo de 100.000 cópias de DNA/mL serão considerados níveis altos de carga viral para a hepatite aguda. Valores acima do cut off de 100.000 cópias de DNA/mL serão considerados níveis altos de carga viral e abaixo de 100.000 cópias de DNA/mL níveis baixos de carga viral para a hepatite crônica. Os níveis de ALT serão considerados altos quando ultrapassarem 1,5 vezes do limite superior (55UI). O paciente será submetido a um questionário, qualificando seu comportamento de risco. Os valores de ALT serão adquiridos através de prontuários dos pacientes com HBV, referentes à data da coleta. As amostras serão processadas para a extração (baseado na adição de fenol equilibrado, pH $\pm$ 8.0 e clorofórmio) do DNA genômico e armazenadas (-20°C) no setor de virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). A metodologia para a amplificação e identificação HBV será através da PCR em tempo real quantitativo (qPCR), utilizando o quantificador de ácidos nucleicos nanodrop (2000), o fluoróforo Sybr Green I como marcador de DNA e o termociclador Rotor Gene Qiagen®. A identificação dos polimorfismos SNP será através da PCR em tempo real, utilizando a técnica da alta resolução de melting (High Resolution Melting-HRM) a qual utilizará o fluoróforo Eva Green. Para as análises estatísticas serão utilizados os testes qui-quadrado, Fisher, Mann Whitney e Kruskal Wallis, Odds Ratio de acordo com o tamanho das amostras assim como a análise de regressão logística múltipla, destinada à verificação do polimorfismo com maior associação relacionado à carga viral.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Objetivo da Pesquisa:

UFPE Objetivo

Geral: Investigar a associação entre as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1 (rs 16944), 2 (rs 2069762), 4 (rs 2243250), 6 (rs 1800796), 12 (rs 3212227), 17 (rs 73439726), 18 (rs187238), interferon α (rs 624704), receptor do interferon α (rs 2257167), interferon γ (rs2430561) e β defensina 1 (rs 1800972) em pacientes com hepatite B aguda ou crônica (não submetidos ao tratamento com antivirais) com a carga viral do vírus da hepatite B, com a expressão dos genes do interferon γ , receptor do interferon γ , interferon γ e aos níveis de alanina aminotransferase (ALT). Quantificar a carga viral do HBV em pacientes com hepatite B aguda e/ou crônica;

Objetivos Específicos: Identificar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1, 2, 4, 6, 12, 17, 18, interferon α , receptor do interferon α , interferon γ e β defensina 1;

Verificar a possível associação da carga viral com os níveis de ALT entre os genótipos dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1, 2, 4, 6, 12, 17, 18, interferon α , receptor do interferon α , interferon γ e β defensina 1; Estimar o risco conferido entre os genótipos e os alelos dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1, 2, 4, 6, 12, 17, 18, interferon α , receptor do interferon α , interferon γ e β defensina 1 ao relacionar com a maior e menor carga viral do vírus da hepatite B;

Determinar quais os genótipos, alelos dos polimorfismos dos genes das interleucinas 1, 2, 4, 6, 12, 17, 18, interferon α , receptor do interferon α , interferon γ e β defensina 1, faixa etária e gênero sexual que estão mais associados à maior carga viral e elevados níveis de ALT;

Verificar se existe associação entre os polimorfismos dos genes interferon α , receptor do interferon α , interferon γ com os níveis de carga viral e expressão desses genes;

Determinar o risco entre os genótipos e os alelos dos polimorfismos dos genes interferon α , receptor do interferon α , interferon γ com a expressão gênica relacionando com a maior carga viral de HBV;

Realizar análises comparativas em relação ao polimorfismo dos genes das interleucinas 1, 2, 4, 6, 12, 17, 18, interferon α , receptor do interferon α , interferon γ e β defensina 1 e à carga viral com a presença de hábitos de etilismo e ausência desse hábito;

Realizar análises comparativas em relação à carga viral e expressão dos genes interferon α , receptor do interferon α e interferon γ com a presença de hábitos de etilismos e ausência desse hábito.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A coleta sanguínea na veia cubital poderá acarretar uma leve dor e pequenos hematomas, contudo, não comprometerá a homeostasia do paciente. Para a coleta serão utilizados materiais estéreis e descartáveis.

Os pacientes analisados na pesquisa contribuirão para uma análise que visa associar um perfil genotípico e carga viral. Em outras pesquisas futuras, essa associação facilitará a estratificação de pacientes bons respondedores e maus respondedores do tratamento com antivirais. É sabido que algumas citocinas (ex.: alguns interferons) são produzidas sinteticamente e fornecidas a indivíduos maus respondedores do tratamento, podendo nesses casos, direcionar os manejos terapêuticos e o combate do vírus da hepatite B.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de grande interesse na área de clínica médica, para melhor compreensão da hepatite tipo B.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Acompanham o projeto toda a documentação exigida e apresentada de forma satisfatória.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Situação do Parecer:

Aprovado.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer do protocolo em questão para início da coleta de dados. Projeto foi avaliado e sua APROVAÇÃO definitiva será dada, por meio de ofício impresso, após a entrega do relatório final ao Comitê de Ética em Pesquisa/UFPE.

RECIFE, 13 de Setembro de 2012

Assinado por:

GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

Fax: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B – Normas para publicação da revista



Human Immunology

Instructions for Authors

Human Immunology, the official journal of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), publishes full-length original articles, brief communications and reviews covering a wide range of subjects including immunogenetics, innate and adaptive immunity, transplantation immunology, autoimmunity, infectious diseases and tumor immunology. The scope of the journal is to disseminate information that may contribute to understanding the mechanisms involved in the genetic control of organ and tissue allograft rejection, alloimmunity, chronic infections and progression of malignant diseases.

Research areas include:

1. Immunogenetic studies on structure and function of molecules involved of immune responses; immunogenetic markers including polymorphism of immunogenetics markers such as HLA, minor histocompatibility antigens, immune receptors (KIR, NK, Toll-like, ILT, MICA/B, PAMPs, etc); population frequencies and disease association studies.
2. Cellular Immunology and Immune Regulation covering the broad areas of in vitro and in vivo studies of innate and adaptive immunity in health and disease.
3. Clinical Immunology including transplantation, cancer immunology, autoimmunity, delayed-type-hypersensitivity, immunological deficiencies, immunologic monitoring, immunotherapy, and immunomodulation.
4. Biotechnological innovations for detection of new genes and gene products including genomics and proteomics strategies.

Types of paper

a) Full-Length Articles

Limit 4000 words excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 50

b) Brief Communications

Limit 2500 words

Abstract 150 words

References up to 30

c) Review Articles

Limit 5000 words, excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 80

The manuscript should include the following sections: Title Page, Abstract (not more than 200 words), Keywords (up to 5), Abbreviations (list of abbreviations used), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure Legends, and Figures.

The title page should include the names and affiliations of the authors, the complete address, e-mail address, and telephone and facsimile numbers of the corresponding author, five keywords, and an abbreviated title of not more than 45 characters and spaces. Footnotes in the text should be defined on the page on which they appear and be numbered consecutively with superscript Arabic numerals.

Contact details for submission

Submission of manuscripts to this journal proceeds totally online, by means of the electronic submission tool (EES) at <http://ees.elsevier.com/him>

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results

and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**).

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, footnotes in the text should be defined on the page on which they appear. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Each table should be typed double-spaced on a separate page, and numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. Table titles should be informative, with detailed information appearing as footnotes. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Use only horizontal rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word

Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.