

DAYSE CÉLIA BARBOSA LINS AROUCHA

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO PROMOTOR DOS GENES
DA INTERLEUCINA-10 E FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA EM
PACIENTES COM HEPATITE C E CARCINOMA HEPATOCELULAR**

Tese 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 Doutor em Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho - PhD

Co-orientadora : Prof^a. Dra^a Leila Maria Beltrão Pereira - PhD

RECIFE-PE

2011

Catálogo na fonte
Biblioteca Giseani Bezerra, CRB4-1738

A771l Aroucha, Dayse Célia Barbosa Lins.
Investigação de polimorfismos no promotor dos genes da
Interleucina-10 e fator de necrose tumoral-alfa em pacientes com hepatite
C e carcinoma hepatocelular / Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha p
Recife: O autor, 2011.
159 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Tese (doutorado) p Universidade Federal de Pernambuco, CCS,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2011.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Interleucina-10. 2. Fator de necrose tumoral alfa. 3. Hepatite C.
4. Carcinoma Hepatocelular. 5. Polimorfismo de nucleotídeo único. I.
Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientador). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-098)



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

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DA DOUTORANDA

DAYSE CÉLIA BARBOSA LINS AROUCHA

No dia 13 de dezembro de 2011, às 08h30, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFPE), os Membros Doutores: a Prof.^a Dr.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza (Presidente da Banca - UFPE), a Prof.^a Dr.^a Regina Célia Moreira (IAL-SP), a Prof.^a Dr.^a Clarice Neuenschwander Lima de Moraes (CPqAM/FIOCRUZ), o Prof. Dr. Alex Vinay Callado França (UFSE) e a Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Cartaxo Muniz (UPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, seguiram a doutoranda DAYSE CÉLIA BARBOSA LINS AROUCHA sobre a sua Tese intitulada "INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO NO PROMOTOR DOS GENES DA INTERLEUCINA-10 E FATOR DE NECROSE TUMORAL-ALFA EM PACIENTES COM HEPATITE C E CARCINOMA HEPATOCELULAR CAUSADO PELO VÍRUS DA HEPATITE B", a qual foi orientada pela Prof.^a Dr.^a Maria Rostangela Cunha Duarte Ceêlho (UFPE) e co-orientada pela Prof.^a Dr.^a Leila Maria Moreira Beltrão Pereira (UPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas:

Prof.^a Dr.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza

Aprovada

Prof.^a Dr.^a Regina Célia Moreira

Aprovada

Prof.^a Dr.^a Clarice Neuenschwander Lima de Moraes

Aprovada

Prof. Dr. Alex Vinay Callado França

Aprovada

Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Cartaxo Muniz

Aprovada



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 Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
José Thadeu Pinheiro

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL
Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL
Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE
Ana Lúcia Coutinho Domingues
Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto
Fábio André dos Santos Brayner
Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Maria Amélia Vieira Maciel
Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque
Maria do Amparo Andrade
Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Marli Tenório Cordeiro
Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Valdênia Maria Oliveira de Souza
Vera Magalhães de Silveira
Vláudia Maria Assis Costa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Djalma e Dulce.

A minha família, Marcílio, meu esposo
e meus filhos Ludmila, Cecilia, Edylla
e Francisco de Assis.

A Ludmila e Moisés, minha filha e meu genro,
pelo grande presente do nascimento
de Luan, meu primeiro neto.

Aos meus pacientes, pela boa vontade em participar
da minha pesquisa, carinho e compreensão,
porque sem eles eu não poderia ter
realizado este trabalho.
Que Deus os abençoe sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades e conquistas e também por permitir exercer a missão do sacerdócio da medicina.

Aos meus pais, Djalma e Dulce, exemplo de amor, honestidade e simplicidade na minha vida, pelo incentivo nos estudos e por me fazer acreditar no meu potencial e nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu esposo Marcilio, pelo entusiasmo, colaboração, companheirismo e paciência com que me incentivou a realizar este doutorado.

A meus filhos Ludmila, Cecília, Edylla e Francisco de Assis, que sempre me incentivaram a continuar o meu trabalho, apoiando, vibrando com as minhas conquistas, compreendendo as minhas ausências, pelos sorrisos orgulhosos das minhas conquistas, fazendo tudo valer a pena. Eu sou um pouco de cada um deles, então esse trabalho também é um pouco deles.

À Profa. Maria Rosângela C. D. Coêlho, pela orientação, confiança desde o primeiro momento, atenção, carinho, apoio e ensinamentos em todos os momentos no desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Leila Maria Beltrão Pereira, minha co-orientadora, pela cooperação, parceria, autorização para o afastamento provisório das minhas atividades para me dedicar à realização desta pesquisa.

À Prof^a Dra. Márcia Carréra Campos Leal, Coordenadora e, Mário Roberto Agostinho da Silva, Secretário Administrativo, do Núcleo de Atenção ao Idoso (NAI/PROIDOSO/PROEXT/UFPE), pela autorização para o afastamento provisório das minhas atividades para me dedicar à realização desta pesquisa, pelo carinho, compreensão e apoio durante estes anos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ximenes pela ajuda, sempre que lhe foi solicitada de grande importância para esta pesquisa.

Ao Prof Marcelo Azevedo, diretor da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Pernambuco (FCM-UPE) pela autorização para o afastamento provisório das minhas atividades para me dedicar à realização desta pesquisa.

A Profa. Dra. Tereza Cartaxo, pelo incentivo e ajuda na elaboração do pré-projeto desta pesquisa para minha participação na seleção do doutorado da Pós-graduação em Medicina Tropical.

Ao grupo do laboratório de Biologia Molecular e Vírus, Instituto de Ciências Biológicas da FCM-UPE, na pessoa da Profa. Dra. Maria Socorro Cavalcanti e Profa. Dra. Patrícia Moura, pelo apoio e companheirismo e, especialmente a Luydson Vasconcelos e Rodrigo Carmo pela grande ajuda na execução de parte da investigação dos polimorfismos no promotor dos genes da IL-10 e TNF- α .

Ao Prof. José Luiz Lima Filho, diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami na Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), pelo acesso ao Setor de Virologia.

Ao grupo do Setor de Virologia do LIKA-UFPE, a Profa. Maria Rosângela C. D. Coêlho, pelo apoio e companheirismo, em especial a Jéfferson Almeida pela colaboração nas correções desse trabalho e juntamente com Georgea Cahú pela disponibilidade na execução de parte da dosagem dos níveis séricos da IL-10 e TNF- α .

A todos os funcionários que trabalham no Instituto do Fígado de Pernambuco (IFPE) e do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/UPE, pelo apoio, carinho, compreensão e que colaboraram para realização desta pesquisa.

À Coordenadora, Vice-Coordenadora, Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco pelos ensinamentos e apoio durante o doutorado.

RESUMO

AROUCHA, Dayse Célia Barbosa Lins, Investigação de polimorfismo de único nucleotídeo no promotor dos genes da interleucina-10 e fator de necrose tumoral-alfa em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C. 169 f. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de doença hepática crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) em todo o mundo. A progressão para o CHC pode ser influenciada por fatores genéticos, como os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no promotor dos genes da interleucina 10 (IL-10) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que regulam os níveis de expressão dessas citocinas. A interleucina 10 (IL-10) apresenta ação anti-inflamatória, antiangiogênica, possui um efeito modulatório na fibrogenese hepática e atua promovendo ou inibindo o desenvolvimento do tumor. Já o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta múltiplas funções no desenvolvimento e na progressão tanto *in vitro* como *in vivo* do câncer. Nossos objetivos foram determinar as frequências gênicas e genotípicas (SNPs) no promotor dos genes da IL-10 e do TNF- α , verificar sua associação com atividade inflamatória e o grau de fibrose hepática, determinar os níveis séricos de IL-10 e do TNF- α e verificar sua associação com atividade inflamatória e o grau de fibrose hepática, em pacientes com hepatite C e o carcinoma hepatocelular causado pelo HCV (CHC-HCV). Foram avaliados 174 pacientes com hepatite C, sendo 54 com fibrose leve e 65 com fibrose grave, além de 52 com CHC-HCV. A biópsia hepática foi classificada pelo score METAVIR e o diagnóstico do CHC-HCV seguiu os critérios da *Barcelona Clinic Liver Cancer*. Foi utilizada a PCR em tempo real para a investigação do SNPs e o ensaio

imunoenzimático para dosagem sérica do IL-10 e TNF- α segundo instruções de cada fabricante. As análises estatísticas utilizadas foram a univariada e multivariada. As concentrações séricas da IL-10 foram menores nos casos de CHC e mais elevadas na fibrose leve ($p < 0,0007$), atividade inflamatória A1 ($p < 0,0087$) e A2 ($p < 0,0079$) nos pacientes com hepatite C. Já a concentração sérica do TNF- α foi mais elevada nos pacientes com CHC-HCV quando comparadas aos pacientes com hepatite C com fibrose leve ($p < 0,0001$), fibrose grave ($p = 0,004$), atividade inflamatória leve ($p = 0,0004$) e atividade inflamatória grave ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas e genótípicas ou entre haplótipos e diplótipos do SNP no promotor do gene da IL-10 nos grupos avaliados. Por outro lado, as frequências do alelo -308 G e do genótipo GG do SNP no promotor do gene do TNF- α foram significativamente maiores nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C que apresentavam fibrose leve e atividade inflamatória leve. Em conclusão, houve uma relação inversa da concentração da IL-10 e TNF- α na hepatite C com fibrose grave e nos pacientes com CHC-HCV. Não foi encontrada relação com SNPs no promotor do gene da IL-10 nos pacientes com hepatite C e CHC. Houve uma maior frequência do alelo G e do genótipo GG do SNP no promotor do gene do TNF- α nos pacientes com CHC. O alelo GG foi fator de risco para a hepatite C com inflamação grave.

Palavras-chave: Interleucina 10, fator de necrose tumoral alfa, polimorfismo de único nucleotídeo, hepatite C, carcinoma hepatocelular, atividade inflamatória, fibrose hepática.

ABSTRACT

AROUCHA, Dayse Célia Barbosa Lins, Investigation of single nucleotide polymorphism in the promoter of the genes of interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma caused by hepatitis C. 169f. Tese de Doutorado Universidade Federal de Pernambuco - Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Recife. Pernambuco

Chronic infection with hepatitis C virus (HCV) is the major cause of chronic liver disease, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) worldwide. The progression to HCC may be influenced by genetic factors, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter of the genes of interleukin-10 (IL-10) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which regulate expression levels of these cytokines. The IL-10 is a multifunctional cytokine with anti-inflammatory and anti-angiogenics actions, has a modulator effect on hepatic fibrogenesis and acts by promoting or inhibiting tumor development. On the other hand, TNF- α is a pro-inflammatory cytokine with multiple roles, *in vitro* and *in vivo*, in the development and progression of cancer. Our aims were to determine the gene and genotypic frequencies of SNPs in the promoter of the IL-10 and TNF- α genes, determine the serum levels of IL-10 and TNF- α and assess its association with inflammatory activity and liver fibrosis in hepatitis C patients and patients with hepatocellular carcinoma caused by HCV (HCC-HCV). We evaluated 119 patients with hepatitis C (54 with mild fibrosis and 65 with severe fibrosis) and 52 with HCC-HCV. Liver biopsy was classified by the METAVIR score and HCV-HCC diagnosis followed the criteria of the Barcelona Clinic Liver Cancer. We used real-time PCR for the SNPs investigation and enzyme-linked immunosorbent assay for serum IL-10 and TNF- α following manufacturer's instructions. Serum levels of IL-10 were higher in mild fibrosis ($p < 0.0007$), A1 inflammatory activity ($p < 0.0087$) and A2 ($p < 0.0079$) in hepatitis C patients. The TNF- α serum levels were higher in patients with HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild fibrosis ($p < 0.0001$), severe fibrosis ($p = 0.004$), mild inflammatory activity ($p = 0.0004$) and severe inflammatory activity ($p < 0.001$). In the groups evaluated showed no significant differences in allelic or genotypic frequencies or in haplotypes or diplotypes at positions -1082 (G/A), -819 (C/T) and -592 (C/A) in IL-10

gene promoter. However, the frequencies of the -308 G allele and GG genotype of SNP in TNF- α gene promoter were significantly higher in patients with HCV-HCC compared to hepatitis C patients with mild fibrosis and mild inflammatory activity. In conclusion, we found that serum levels of IL-10 were higher in hepatitis C patients, whereas patients with HCV-HCC showed elevated TNF- α serum levels. The SNP in IL-10 gene promoter did not influence the degree of inflammatory activity and liver fibrosis, however, patients with HCV-HCC had a higher frequency of the G allele and GG genotype in TNF- α gene.

Keywords: Interleukin 10, tumor necrosis factor-alpha single nucleotide polymorphism, hepatitis C, hepatocellular carcinoma, inflammatory activity, liver fibrosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

TESE

Figura 1	Eletromicrografia do vírus da hepatite C.....	19
Figura 2	Organização genômica do HCV.....	20

ARTIGO 1

Figura 1	Associação dos níveis séricos de IL-10 entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com fibrose hepática leve e grave. Medianas: fibrose leve (33,60pg/mL), grave (25,10pg/mL) e CHC-HCV (14,15pg/mL).....	69
Figura 2	Associação dos níveis séricos de IL-10 entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com atividade inflamatória leve e grave. Medianas: A1 (34pg/mL), A2 (29.5pg/mL), A3 (25.1pg/mL) e CHC-HCV (14.1pg/mL).....	70

ARTIGO 2

Figura 1	Associação dos níveis séricos do TNF- α entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com fibrose hepática leve e grave. Medianas: fibrose leve (11 pg/mL), fibrose grave (11 pg/mL) e CHC-HCV (20.4 pg/mL).....	87
Figura 2	Associação dos níveis séricos do TNF- α entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com atividade inflamatória leve e grave. Medianas: atividade inflamatória A1(9.01 pg/mL), A2 (11.4 pg/mL), A3 (15.8 pg/mL) e CHC-HCV (20.4 pg/mL).....	88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1	Distribuição dos pacientes com hepatite C e fibrose leve ou grave e CHC-HCV segundo a faixa etária, sexo, fatores de risco para infecção, dosagens bioquímicas e genótipos do HCV.....	64
Tabela 2	Distribuição alélica e genotípica dos alelos <i>IL-10</i> -1082, <i>IL-10</i> -819, <i>IL-10</i> -592 e seus níveis séricos em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.....	65
Tabela 3	Distribuição dos haplótipos e diplótipos do SNP no promotor do gene <i>IL-10</i> de acordo com a gravidade da fibrose em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.....	66
Tabela 4	Análise multivariada dos fatores de risco associados à gravidade da fibrose hepática em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.....	67
Tabela 5	Análise multivariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória causada pelo HCV e CHC-HCV.....	68

ARTIGO 2

Tabela 1	Distribuição dos pacientes com fibrose leve, grave e CHC-HCV segundo a faixa etária, sexo, fatores de risco para infecção, dosagens bioquímicas e moleculares.....	83
Tabela 2	Distribuição (painel A) e associação (painel B) das frequências alélicas e genotípicas do SNP <i>TNF-α</i> -308 (G/A) em pacientes com hepatite C e CHC-HCV.....	84
Tabela 3	Análise multivariada dos fatores associados à progressão da fibrose em pacientes com hepatite C e CHC-HCV.....	85
Tabela 4	Análise multivariada dos fatores associados à progressão da atividade inflamatória em pacientes com hepatite C.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'NCR	Região não codificadora 5'
3'NCR	Região não codificadora 3'
A	Adenosina
Anti-HBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B
Anti-HBc	Anticorpo contra a proteína do core do vírus da hepatite B
AASLD	Associação Americana para o Estudo das doenças do Fígado
BCLC	Clínica de Câncer Hepático de Barcelona
C	Citosina
CD	Agrupamento de genes para diferenciação
E1	Proteína do envelope 1 do vírus da hepatite C
E2	Proteína do envelope 2 do vírus da hepatite C
EASL	Associação Européia para o Estudo do Fígado
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G	Guanina
CHC	Carcinoma hepatocelular
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HBsAg	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV-DNA	Ácido desoxirribonucleico do vírus da hepatite B
IARC/OMS	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IL	Interleucina
IFN	Interferon
IFN- γ	Interferon gamma
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK/STAT	Via de sinalização, transdução de sinal e ativador de transcrição Janus quinase
KB	Quilobases
NK	Linfócitos natural killer



OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo do único nucleotídeo
Th1	Linfócitos T-helper 1
Th2	Linfócitos T-helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. APRESENTAÇÃO.....	17
2. REVISAO DA LITERATURA.....	19
2.1 Características gerais do HCV.....	19
2.2 História natural da infecção pelo HCV.....	21
2.2.1 Fatores de progressão da doença.....	22
2.3 Aspectos epidemiológicos do HCV.....	26
2.4 Imunopatologia do HCV.....	28
2.5 Evolução clínica da hepatite C.....	30
2.6 Diagnóstico da hepatite C.....	31
2.6.1 Teste sorológico.....	31
2.6.2 Testes moleculares.....	31
2.6.3 Biópsia hepática.....	32
2.7 Carcinoma hepatocelular.....	32
2.8 Hepatite C e carcinoma hepatocelular.....	33
2.9 Evolução clínica e diagnóstico do CHC.....	34
2.10 Interleucina IL-10.....	35
2.10.1 Proteína, estrutura gênica.....	35
2.10.2 Função biológica da IL-10.....	35
2.11 Fator de necrose tumoral alfa.....	37
2.11.1 Proteína, estrutura gênica.....	37
2.11.2 Função biológica do TNF- α 2.....	37
2.12 Polimorfismos dos genes da IL-10 e TNF- α no CHC	38
3. HIPÓTESE.....	42
4. OBJETIVOS.....	43
4.1. Geral.....	43
4.2. Específicos.....	43
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1 Desenho do estudo.....	44
5.2 Local do estudo.....	44
5.3 População do estudo.....	44
5.4 Definição do tamanho amostral.....	44
5.5 Critérios de inclusão.....	45
5.6 Critérios de exclusão.....	45
5.7 Definição e categorização das variáveis de coleta de dados.....	46

5.7.1 Variáveis dependentes.....	46
5.7.2 Variáveis independentes.....	46
5.8 Coleta dos dados.....	48
5.9 Coleta e processamento das amostras.....	48
5.10 Exames laboratoriais.....	49
5.11 Exames de imagem.....	49
5.12 Dosagem sérica da IL-10 e TNF- α	49
5.13 Extração do DNA genômico.....	49
5.14 Polimorfismos de único nucleotídeo no promotor do gene da IL-10.	50
5.15 Polimorfismo de um único nucleotídeo no promotor do gene do TNF- α	50
5.2 Análise estatística.....	50
5.3 Considerações éticas.....	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1 ARTIGO 1	
Polimorfismos de único nucleotídeo e níveis séricos da IL-10 em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular.....	51
6.2 ARTIGO 2	
Relação entre o polimorfismo de único nucleotídeo TNF- α -308 (G/A) e a histologia hepática em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular	71
7. CONCLUSÕES DA TESE.....	89
8. RECOMENDAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
9. REFERÊNCIAS DA TESE.....	91
APÊNDICES.....	107
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido.....	107
APÊNDICE B - Ficha de Avaliação Clínica.....	108
APÊNDICE C - Ficha de Avaliação Laboratorial.....	110
APÊNDICE D - Versão do Artigo 1 em inglês.....	111
APÊNDICE E - Versão do Artigo 2 em inglês.....	130
ANEXOS.....	147
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	147
ANEXO B - Author Guidelines – Journal of Gastroenterology and Hepatology.....	148
ANEXO C - Author Guidelines – <i>Journal of Viral Hepatiti</i>	153
ANEXO D - Normalização Adotada.....	159

1. APRESENTAÇÃO

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de doenças hepáticas crônicas em todo o mundo (SHIFMANN, 2003; PALADINO et al., 2006; CRAXI et al., 2011). Estima-se que 20% dos pacientes cronicamente infectados progredirão para a cirrose hepática num período que varia entre 13 a 23 anos e, desse percentual, de 1 a 4% ao ano, desenvolverão o carcinoma hepatocelular (HCC) (NITA et al., 2002; SHIFMANN, 2003; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005). A hepatite C crônica conduzindo a doença hepática terminal constitui a principal indicação de transplante hepático em muitos países (BURRA, 2009).

O CHC é um dos cânceres mais prevalentes no mundo, sendo reportado como o quinto tipo de tumor sólido mais comum (ALJARIB; FRANCESCA e BURROUGS, 2007), a terceira causa de mortalidade por câncer no mundo (BRUIX e SHERMAN, 2005; FERENCI et al., 2010) e responsável por 500.000 mortes/ano (ALJARIB; FRANCESCA e BURROUGS, 2007). Nas áreas de baixa prevalência tem aumentado a incidência de casos de CHC relacionados à hepatite C (CHC-HCV) (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007). O risco de desenvolver o CHC aumenta com a gravidade da inflamação e fibrose hepática, entretanto, os fatores genéticos do hospedeiro que poderiam afetar o prognóstico clínico não são esclarecedores (WANG et al., 2003).

Investigar a base genética da doença em humanos é uma questão de grande importância na medicina (SANTAMARIA et al., 2010). Com a incorporação da genética e genômica, marcadores genéticos da doença são utilizados no diagnóstico e freqüentemente estão presentes antes do aparecimento dos sintomas clínicos e, com a informação genética o tratamento instituído pode ser mais precoce (JOSHI e KUCHERLAPATI, 2008).

Nos últimos anos foram descritos cerca de um milhão e meio de mutações ou polimorfismos no genoma humano, que podem afetar a expressão ou função das proteínas. A variabilidade fenotípica, a susceptibilidade individual, a resistência ou a progressão das doenças e diferentes respostas terapêuticas podem ser influenciadas por estes polimorfismos (SANTAMARIA et al., 2010).

O impacto dos estudos genéticos na prática médica ainda é limitado, embora possam explicar o motivo de diferentes evoluções clínicas de doenças hepáticas crônicas de mesma etiologia (JOSHI e KUCHERLAPATI, 2008).

Assim, considerando a influência de polimorfismos genéticos sobre a evolução clínica de doenças hepáticas crônicas, como o HCC, e o elevado número de atendimentos de pacientes com a hepatite C que apresentam cirrose com potencial de desenvolvimento do CHC nos serviços incluídos na pesquisa, fomos motivados a investigar os polimorfismos no promotor dos genes da interleucina (IL-10) e do fator de necrose tumoral (TNF- α).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais do HCV

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, do gênero *Hepacivirus*, possui RNA de fita simples de polaridade positiva de 9,6 quilobases de extensão. Foi identificado por Choo et al., (1989) e mede em torno de 50 a 60nm de diâmetro e contém um envoltório lipídico de aproximadamente 7nm de espessura que envolve o nucleocapsídeo de morfologia esférica. Quando visualizado pela microscopia eletrônica apresenta um tamanho em torno de 30 a 35nm (KAITO et al., 1994) conforme mostra a figura 1.

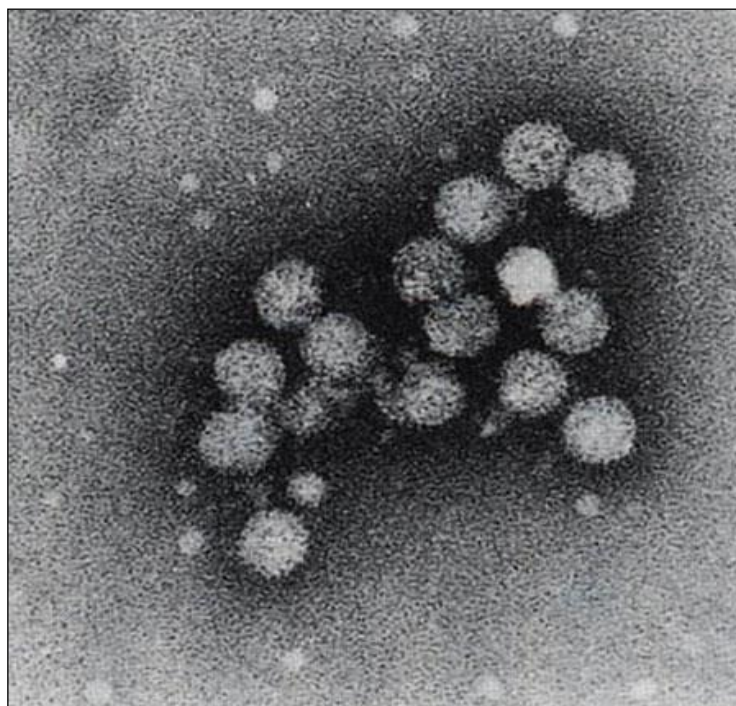


Figura 1. Eletromicrografia do vírus da hepatite C
Fonte: PENIN et al., (2004)

Esse vírus possui uma única fase de leitura aberta, que codifica uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos, flanqueadas por duas regiões terminais não codificadoras nas extremidades 5' (5'NCR) e 3' (3'NCR) (SHIMOIKE et al., 1999; PENIN et al., 2004).

Após a clivagem dessa poliproteína pela ação combinada de proteases virais e do hospedeiro, origina-se um grande número de proteínas, denominadas estruturais e não estruturais (SHARMA, 2010).

As proteínas estruturais, codificadas por genes localizados próximos à região 5'NCR, são: as proteínas do nucleocapsídeo, glicoproteínas do envelope (E1, E2) e a proteína p7. A 5'NCR é formada por 340 nucleotídeos, sendo a porção do genoma escolhida para amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e caracterização dos diversos genótipos do HCV. Essa região é composta pelo sítio que proporciona a síntese da fita de RNA e o sítio de entrada interno para os ribossomos que dá início a tradução da poliproteína viral (PENIN et al., 2004; SHARMA, 2010).

A figura 2 mostra as proteínas não estruturais designadas de NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B, codificadas por genes situados próximo a região 3' NCR e estão envolvidas na replicação e maturação do vírus (CHOO et al., 1989; PENIN et al., 2004; CRISTINA, 2005).

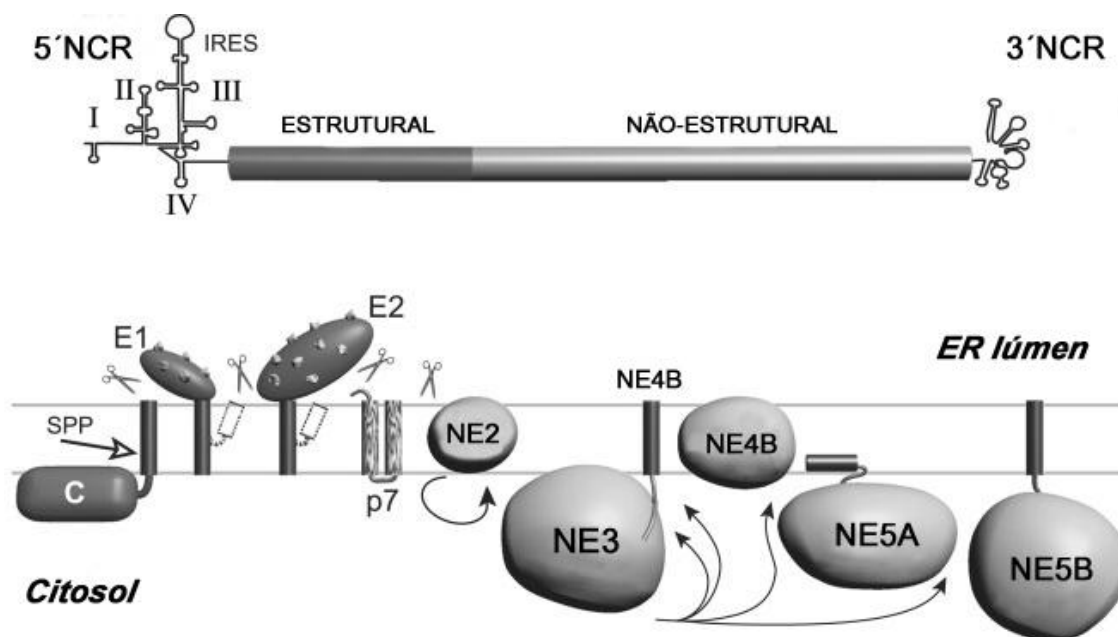


Figura 2. Organização genômica do HCV.

Fonte: Penin et al., (2004).

Já as proteínas do envelope do HCV estão envolvidas na ligação com receptores, entrada e fusão do vírus. A função da proteína p7 ainda não é conhecida (BARONE, 2008) e as proteínas do nucleocapsídeo interagem com várias proteínas celulares e afetam algumas funções das células do hospedeiro como a transcrição gênica, o metabolismo dos lipídeos, apoptose e várias vias de sinalização celular (PENIN et al., 2004; VISO, 2008).

A análise filogenética de cepas isoladas do HCV em diferentes regiões do mundo levou à identificação de seis genótipos. A classificação mais utilizada foi proposta por Simmonds et al. (1993) e baseia-se na similaridade da sequência de nucleotídeos. Foram identificados seis grandes grupos ou genótipos, numerados de 1 a 6, em algarismo arábico e mais de 50 subtipos que são identificados por letras minúsculas em ordem alfabética (NIHA, 2002). Há diferenças em torno de 31 a 33% nas sequências de nucleotídeos dos genótipos (SIMMONDS et al., 2005).

Os subtipos, por sua vez, apresentam um complexo de variantes genéticas com divergência na sequência de nucleotídeos de 1,0% a 9,2%. Essas variantes genéticas encontradas dentro de um único indivíduo são denominadas *quasispecies* e são resultantes do acúmulo de mutações durante a replicação viral (ZEIN, 2000). A coexistência destes múltiplos mutantes oferece um mecanismo rápido e eficiente para o vírus se evadir da resposta imune e permanecer no hospedeiro (BARONE, 2008).

A identificação do genótipo é importante por razões epidemiológicas e para definição do tempo e o tipo de tratamento (NOUSBAUM; POL e NALPAS, 1995).

2.2 História natural da infecção pelo HCV

A exposição ao HCV pode ocorrer em várias ocasiões durante a vida, não sendo possível estabelecer um tempo definido para a infecção inicial. A progressão da doença é extremamente lenta, por décadas com alta percentagem de casos que desenvolverão fibrose hepática progressiva, culminando em cirrose e/ou câncer de fígado (Di BISCEGLIE, 2000; SEEF, 2002; MISSIHA; OSTROWSKI e HEALTHCOTE, 2008; MARCELIN, 2009; SEEF, 2009). Estas complicações devidas a infecção crônica do HCV, é a indicação mais comum para o transplante de fígado na maioria dos países ocidentais (ALBERTI et al., 2004; BURRA, 2009).

O estadiamento da fibrose e a graduação da atividade necroinflamatória são excelentes preditores de progressão da hepatite crônica pelo HCV (MASSARD et al., 2006). A fibrose desenvolve-se em consequência da resposta imunológica do hospedeiro (FRIEDMAN, 2008). A inflamação local e a produção de fatores que ativam a fibrogênese são determinantes para o desenvolvimento da fibrose, cirrose e do carcinoma hepatocelular (PAWLOTSKY et al., 2010). A taxa de progressão da

fibrose hepática é determinante no prognóstico da doença, variando marcadamente entre os pacientes (HISSAR et al., 2009; MARCELIN, 2009).

A biópsia hepática continua a ser um método padrão ouro para avaliar o grau e estágio de lesão hepática, embora não seja isenta de contraindicações e complicações. Um método não invasivo como a elastografia utilizando o Fibroscan tem sido usado para identificar estágios de fibrose em pacientes cronicamente infectados pelo HCV (ALEH, 2010).

2.2.1 Fatores de progressão da doença

Dentre os fatores que têm um papel na progressão da doença podemos considerar aqueles relacionados ao vírus, ao hospedeiro e os ambientais (SEEF, 2009).

Em relação ao vírus, a carga viral e o genótipo não influenciam a taxa de progressão da doença (FREEMAN et al., 2003; FRIEDMAN, 2008; MARCELIN, 2009; SEEF, 2009). Há relatos de progressão mais rápida em pacientes com genótipo 1 do HCV (KOBAYASHI et al., 1996). Entretanto os pacientes analisados pertenciam a uma área geográfica onde outros cofatores para fibrose não foram controlados (MISSIHA; OSTROWSKI e HEALTHCOTE, 2008) e essas observações não foram reproduzidas por outros autores (POYNARD et al., 2001; HEZODE et al., 2005).

Por outro lado existem inúmeros fatores do hospedeiro que podem influenciar a progressão da fibrose, como o sexo, idade e raça (Di BISCEGLIE, 2000). Os homens possuem maior prevalência de hepatite C (PALADINO et al., 2006; SEEF, 2009) e demonstram maior progressão para cirrose do que as mulheres; como ficou evidente no estudo de mulheres irlandesas que receberam imunoglobulina anti-D contaminada com o HCV (KENNY-WALSH, 1999). Além disso, 70% dos transplantes hepáticos ocorrem em pacientes do sexo masculino infectados com HCV (MISSIHA; OSTROWSKI e HEALTHCOTE, 2008).

Nos pacientes infectados com idade superior a 40 anos há uma maior taxa de progressão da doença (HARRIS et al., 2001), de modo que cerca de 20% desses indivíduos desenvolverão cirrose num prazo de 20 anos. Esta faixa etária constitui um fator de risco importante para a doença hepática avançada, provavelmente devido ao processo natural do envelhecimento atuando no sistema imunológico e

sobre o fígado (SEEF, 2002). Já nos indivíduos infectados com idade entre 20 e 40 anos, a incidência de cirrose é de 3% a 8% (SEEF, 2002; 2009).

Os afro-americanos com hepatite C crônica apresentam uma elevada taxa de evolução para o CHC e uma menor taxa de resposta à terapia quando comparados com indivíduos brancos (WILEY; BROWN e CHAN, 2002; SEEF, 2009). Por outro lado, a progressão da doença parece ser mais lenta e as alterações histológicas no fígado com menor gravidade, apresentando baixa progressão para cirrose (WILEY; BROWN e CHAN, 2002).

A progressão rápida para a cirrose em pacientes latinos morando nos Estados Unidos e um curso mais benigno da doença em populações aborígenes são explicados pelas variações que ocorrem na resposta imune ao vírus e por influência de polimorfismos genéticos (MISSIHA, OSTROWSKI e HEALTHCOTE, 2008; SEEF, 2009)

O consumo de álcool está entre os principais fatores ambientais associados à progressão da fibrose (MARCELIN, 2009; SIU; FOONT e WANDS, 2009). Vários trabalhos demonstraram que nos pacientes infectados pelo HCV que fazem o uso crônico de álcool, a cirrose (SIU; FOONT e WANDS, 2009; SZABO et al., 2010) e o carcinoma hepatocelular (EL-SERAG, 2002; YUAN, et al., 2004; ASCHA et al., 2010; BRUIX e SHERMAN, 2010) desenvolvem-se mais rapidamente.

Diversos estudos mostram que a progressão da fibrose na hepatite C varia em função da dose diária de ingestão de álcool. Poynard, Bedossa e Opolon (1997) relataram que pacientes com ingestão de álcool superior a 50g/dia apresentavam chance de progressão para fibrose na ordem de 34%. Harris et al., (2001) mostraram um risco de desenvolver cirrose 4 vezes maior entre indivíduos com ingestão >80 g/dia. Peters e Terrault (2002) demonstraram uma taxa de 32% de progressão para cirrose com ingestão superior a 30g/dia. Boccato et al., (2006) encontraram progressão da doença com a ingestão de álcool maior que 40g/dia. Entretanto, outros descreveram um risco de 1,3 vezes maior de progressão para cirrose com a ingestão de álcool nas doses de 40g/dia em homens e 20 g/dia em mulheres (LEVISTKY e MAILLIARD, 2004; REUBEN, 2006).

Os mecanismos pelos quais o álcool provoca lesão hepática e prejudica a depuração do vírus ainda não estão totalmente esclarecidos (SZABO et al., 2010). Fatores importantes como maior replicação viral, aumento dos *stress* oxidativo, citotoxicidade nos hepatócitos, redução da resposta ao tratamento e sobrecarga de

ferro têm sido postulados como fatores indutores na progressão da doença hepática (GITTO et al., 2009; SIU; FOONT e WAND, 2009).

O tabagismo também tem sido implicado no maior desenvolvimento da fibrose e da atividade histológica (PESSIONE et al., 2001; HEZODE et al., 2005) na hepatite C crônica, elevação do risco para o carcinoma hepatocelular e menor taxa de resposta à terapia com o Interferon (PESSIONE et al., 2001; EL-ZAYADI, 2006; SCOGNAMIGLIO et al., 2007).

El-Zayadi et al., (2006) têm relatado uma associação entre o tabagismo e lesão celular hepática sobre a forma de necroinflamação, apoptose e deposição de ferro em excesso no fígado de pacientes com hepatite C crônica. Além, disso o tabaco induz efeitos tóxicos (aumentando o processo necroinflamatório e fibrose), imunológico (aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF-alfa) e oncogênico (em virtude da presença de produtos químicos com atividade citotóxica, genotóxica e tumorigênica na fumaça do cigarro) sob o fígado (PESSIONE et al., 2001).

As co-infecções constituem importantes fatores de progressão da hepatite C crônica. Nos co-infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) há menores taxas de clareamento do HCV após infecção aguda, maior carga viral e menor resposta ao tratamento (SULKOWSKI, 2008). A fibrose hepática é mais acelerada (SEEF, 2009) pelas alterações na resposta imune celular e aumento das taxas de apoptose, levando à progressão mais rápida da doença hepática e ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (ROE e HALL, 2008), quando comparados com indivíduos sem a infecção pelo HIV.

Pacientes com hepatite C crônica co-infectados pelo vírus da hepatite B (HVB) podem apresentar resposta imunológica e virológica diferentes (LIN et al., 2006), pois o HCV pode suprimir a replicação do HBV, resultando na redução dos títulos séricos do HBsAg, anti-HBc, HBeAg e HVB-DNA. Esta co-infecção está associada a formas mais graves da doença hepática, resultando no desenvolvimento mais rápido de fibrose e cirrose (CHU e LEE 2008; MISSIHA; OSTROWSKI e HEALTHCOTE, 2008). Adicionalmente, a prevalência do CHC é cerca de quatro vezes maior nesses pacientes do que naqueles monoinfectados pelo HCV (CHERUVU; MARKS e TALAL, 2007).

Outro fator de risco que poderia aumentar a progressão da fibrose em pacientes com o HCV é a infecção concomitante com o *Schistosoma mansoni*,

descrita no Egito associada ao genótipo 4, onde a infestação poderia prejudicar a resposta imune, promovendo uma elevada carga viral que afetaria um fígado já comprometido pela doença da esquistossomose (SEEF, 2002).

O impacto do sobrepeso e/ou obesidade sobre a hepatite C é indiscutível, devido à incidência mundial da síndrome metabólica. O excesso de peso está associado à esteatose, inflamação e resistência à insulina, os quais contribuem para o aumento da fibrose hepática (NEGRO e CLEMENT, 2009).

A esteatose hepática é uma característica histológica comum em aproximadamente 50% dos pacientes com hepatite C crônica (ASSELAH et al., 2007), mesmo na ausência de outros possíveis fatores esteatogênicos como o álcool, drogas ou síndrome metabólica (MIRANDOLA et al., 2010).

A importância da esteatose, obesidade e diabetes tem sido investigada a fim de compreender a relação entre os distúrbios metabólicos, a resistência à insulina, replicação do HCV e progressão da fibrose (MARCELIN, 2009; SEEF, 2009).

Existem dois tipos de esteatose nos pacientes com HCV. A esteatose metabólica está relacionada com o genótipo 1 do HCV, com aumento do índice de massa corporal (IMC), presença de hiperlipidemia e resistência à insulina. O outro tipo denomina-se esteatose viral, relacionada com o genótipo 3 do HCV desenvolvendo-se na ausência de outros fatores esteatogênicos por influência direta do vírus (ASADULAH; STERRY e VOLK, 2003; MIRANDOLA et al., 2010; PATEL et al., 2010; SERFATY e CAPEAU, 2009).

Um estudo com 3.068 pacientes com hepatite C crônica demonstrou que a esteatose hepática está associada ao aumento da atividade inflamatória e progressão da fibrose hepática. Os mecanismos envolvidos nessa progressão são o *stress* oxidativo, citocinas pró-inflamatórias, resistência à insulina e o aumento da susceptibilidade à apoptose que podem mediar o efeito fibrogênico da esteatose (LEANDRO et al., 2006; ASSELAH et al., 2007).

Em relação ao diabetes, foi relatada uma prevalência de 5 a 12% em pacientes com hepatite C, ou seja, superior àquela encontrada na população em geral (SERFATY e CAPEAU, 2009). Jadon et al., (2010) encontraram uma prevalência de 13,7% do HCV em 3.000 diabéticos quando comparada com 4,9% em doadores de sangue (não diabéticos). Outro estudo de caso-controle mostrou prevalência de 4,2% de infecção pelo HCV em diabéticos versus 1,6% nos pacientes controles (MASON et al., 1999).

A ocorrência de diabetes como fator de risco para o desenvolvimento de CHC em pacientes com hepatite C crônica foi relatada em diversos estudos (CONTE, 2000; BRUIX e SHERMAN, 2005, DAVILA et al., 2005; CHEN et al., 2008; VELDT et al., 2008; ASCHA et al., 2010). Esse fato ocorre porque a doença hepática causada pelo HCV pode causar intolerância à glicose e resistência à insulina, resultando no desenvolvimento de *diabetes mellitus* (DAVILA et al., 2005; VELDT et al., 2008).

A resistência à insulina (RI) é uma condição complexa que ocorre quando são necessárias concentrações de insulina superiores às normais para manter a glicemia normal e adequada utilização de glicose nos tecidos alvo (ARRESE; RIQUELME e SOZA, 2010). Essa condição é encontrada, em 30% a 70% dos pacientes cronicamente infectados com o HCV (HARRISON, 2006).

O HCV pode levar à RI através de um mecanismo direto do vírus ou devido à ativação da inflamação sistêmica e hepática. Tem sido sugerido que um aumento dos níveis de leptina e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, IL-6 e TNF- α , assim como a redução dos níveis de adiponectina podem contribuir diretamente para promoção da RI induzida pelo HCV (ARRESE; RIQUELME e SOZA, 2010). Além disso, a RI pode causar esteatose hepática e resistência ao tratamento antiviral (KAWAGUCHI e SATA, 2010).

2.3 Aspectos epidemiológicos do HCV

Estima-se que 170 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HCV em todo o globo, correspondendo a cerca de 3% da população mundial (ALTER, 2007; TE e JENSEN, 2010; CRAXI et al., 2011). A prevalência na região da Europa ocidental é 0,4 a 3%, enquanto na região do Norte da África corresponde a uma taxa maior que 2,9%, e é verificada no Egito a maior prevalência, de 9% (CRAXI et al., 2011; ALTER, 2007). Estima-se que a incidência anual de infecções sintomáticas seja de 1/100.000 pessoas, embora a real incidência seja muito mais elevada, devido à grande frequência de formas assintomáticas (CRAXI et al., 2011).

A prevalência da hepatite C crônica varia de 0,1 a 5% em diferentes países (MARCELLIN et al., 2008). Estados Unidos da América, Austrália, Turquia, Espanha, Itália e Japão apresentam uma prevalência média global de 1,0% a 1,9%, havendo diferentes padrões em relação à idade (TE e JENSEN, 2010).

Nos Estados Unidos da América, a prevalência é maior entre as pessoas de 30 a 49 anos de idade, indicando que a transmissão do HCV ocorreu nos últimos 20 a 40 anos, padrão semelhante àquele observado na Austrália. Por outro lado, na Turquia, Espanha, Itália, Japão e China, a descoberta da doença ocorreu entre as pessoas acima de 50 anos, sugerindo que a transmissão tenha ocorrido há um período de 40 a 60 anos (ALTER, 2007).

Em relação aos genótipos do HCV, os tipos 1, 2, e 3 têm distribuição mundial e sua prevalência varia de uma região geográfica para outra. Os subtipos 1a e 1b são os mais comuns nos Estados Unidos da América e Europa. No Japão predomina o subtipo 1b com 73% dos casos de hepatite C. O subtipo 2a e 2b são comuns na América do Norte, Europa e Japão e o 2c é comum na Itália. O genótipo 3 é prevalente em usuários de drogas intravenosas na Europa e Estados Unidos da América. Na África, América do Norte e Oriente Médio o genótipo 4 parece ser o mais prevalente e o genótipo 5 e 6 limitam-se à África do Sul e a Hong Kong (ZEIN, 2000).

No Brasil, estima-se que cerca de 1,5% da população esteja infectada pelo HCV. A soroprevalência varia nas diferentes regiões (LAMPE et al., 2010), sendo maior no Norte do Brasil, que apresenta 2,1%. Os genótipos mais frequentes são 1, 3 e 2 (PEREIRA et al., 2002; OLIVEIRA-FILHO et al., 2010).

A distribuição dos genótipos e suas frequências relatadas nos Estados Unidos da América são: 64,9% para o genótipo 1; 4,6% para o genótipo 2; 30,2% para o genótipo 3; 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. Os subtipos 1a, 1b e 3a são as cepas mais prevalentes no Brasil (PEREIRA et al., 2002; LAMPE et al., 2010). O genótipo 1 predomina na região do Norte (OLIVEIRA-FILHO et al., 2010), o tipo 2 na região Centro-Oeste e o genótipo 3 é comum no Sul. No Nordeste, o genótipo 1 é o mais prevalente, com 60,7% em Pernambuco, seguido do tipo 3 (36,9%) e o tipo 2 (2,4%) (CAMPIOTO et al., 2005).

A transmissão do HCV sofreu um grande impacto com a implantação da triagem obrigatória de doadores de sangue na maioria dos países no mundo. No entanto, o uso de drogas venosas ilícitas continua a ser um das principais fontes de infecção do HCV e na prática pode ser a origem dessa infecção em diferentes regiões (TE e JENSEN, 2010).

Os fatores de risco para a transmissão do HCV incluem procedimentos como cirurgia, hemotransfusão antes do ano de 1992 e hemodiálise; o uso de drogas

injetáveis e de cocaína intra-nasal; a utilização de equipamento contaminado, a promiscuidade sexual, a colocação de piercing, tatuagem, entretanto, em alguns casos nenhum fator de risco é identificado (ALTER, 2002).

2.4 Imunopatologia do HCV

O mecanismo pelo qual o HCV causa lesão hepática aguda e inicia uma cascata de eventos conduzindo ao estabelecimento de uma infecção persistente e o desenvolvimento de doença hepática crônica não estão claramente estabelecidos (SEEF, 2002).

Muitos fatores influenciam a progressão da doença incluindo idade, sexo, consumo de álcool, IMC, esteatose hepática, co-infecção com HIV ou HBV afetam o prognóstico da doença, mas são insuficientes para explicar esta evolução. Fatores virais e do hospedeiro, como genéticos e imunológicos podem ter importante papel na cronificação da doença (PALADINO et al., 2006).

O HCV infecta o hospedeiro susceptível, penetra na corrente sanguínea tendo tropismo primariamente pelos hepatócitos, embora diversos tecidos como pâncreas, tiróide, glândulas adrenais, baço, medula óssea, linfócitos B e T periféricos também possam ser comprometidos. No soro, as proteínas do envelope E1 e E2 do HCV penetram na célula por endocitose, mediada por um receptor CD81 da superfície dos hepatócitos e linfócitos, incluindo o CD81 e o receptor de lipoproteína de baixa densidade. Após a entrada na célula, há liberação do RNA viral no citoplasma (VISO, 2008).

O HCV é traduzido em proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais estão envolvidas na ligação do RNA e ribossomos promovem a formação do capsídeo. As proteínas não-estruturais codificam enzimas específicas que são importantes para a replicação viral. As proteínas virais se acumulam no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi, onde se fundem e o processo de liberação do vírion é iniciado (CHANG, 2003; POLIAK, 2003; THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006; VISO, 2008).

Portanto, logo após a infecção pelo HCV, o sistema imunológico responde ao RNA viral ativando uma cascata de sinalização nas células infectadas, acionando a resposta imune não específica, resultando na produção do interferon (IFN) tipo I e de células *natural killer* (NK) (PAWLOSTKY, 2004; VISO, 2008; CASTELO et al., 2010).

O IFN ativa proteínas antivirais, que são responsáveis pela expressão dos genes que inibem a replicação do vírus no interior dos hepatócitos, na tentativa de debelar a infecção (POLIAK, 2003; VISO, 2008).

As populações celulares do fígado que participam da resposta inata são as células NK, células de Kuppfer e células dendríticas (CHANG, 2003; ISHII e KOZIEL, 2008). As células NK inibem a replicação viral através da citólise das células infectadas, da produção de citocinas, como o interferon gama (IFN γ) que recruta células inflamatórias intra-hepáticas e estimulam a resposta Th1 (ISHII e KOZIEL, 2008).

Estudos sugerem que o HCV inibe genes de receptores da ativação de células NK, diminuindo a ação e número destas células em pacientes infectados (POLIAK, 2003; THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006). As células NK de indivíduos com HCV estão com sua capacidade comprometida devido a um aumento da IL-10 e fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), que pode inibir a ação das células dendríticas (THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006).

Na resposta imune adaptativa participam a resposta imune humoral com os anticorpos produzidos pelos linfócitos B e a resposta imune celular com produção dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (TILG, 2009). Os anticorpos da hepatite C (anti-HCV) são detectáveis com sete a oito semanas após a infecção. O HCV sofre pressão seletiva do hospedeiro, o que estimulará alterações na seqüência da região hipervariável da glicoproteína de envelope E2, um dos principais alvos da resposta dos anticorpos, conduzindo ao aparecimento de mutações nestas proteínas, levando ao escape viral (THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006; VISO, 2008).

Uma ampla resposta imunológica multi-específica e sustentada ao HCV pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ está associada à eliminação viral e à resolução da infecção (THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006). Por outro lado, a persistência viral está associada a uma resposta deficiente e disfuncional das células T específicas (BILLEBERT; BOTTLEER e THIME, 2007). Os linfócitos T CD8⁺ podem eliminar o HCV através da indução da apoptose em hepatócitos infectados ou pela supressão da replicação por produção de IFN γ (VISO, 2008).

Nos pacientes cronicamente infectados a resposta imune é menos vigorosa e pode ser resultado da imunotolerância ou da exaustão da resposta dos linfócitos T CD8⁺ ou pela alta carga viral que persiste nestes indivíduos (THIMME; LOHMANN e WEBER, 2006; VISO, 2008). Os linfócitos T CD4⁺ também parecem estar envolvidos

na lesão viral, mediados pelo aumento da expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (VISO, 2008).

Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ vírus específicos são detectáveis no sangue aproximadamente 3 a 4 semanas após a infecção pelo HCV, e a infiltração de células T no fígado correlaciona-se com o aumento das transaminases (REHERMANN, 2000).

As respostas e a atividade imunomoduladora das citocinas dos linfócitos T CD4⁺ podem ser categorizadas em duas respostas funcionais: a de tipo 1 ou Th1 (resposta da citocina pró-inflamatória que produz interleucina-2 (IL-2), IFN γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a de tipo 2 ou Th-2 (resposta da citocina antiinflamatória que inclui a IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e ativação das células B). Os pacientes com infecção aguda auto-limitada pelo HCV tem uma resposta predominantemente do tipo Th1 enquanto um perfil de citocinas do tipo Th2 predomina naqueles com infecção crônica (MIZUKOSHI e REHERMANN, 2001; CHANG, 2003).

2.5 Evolução clínica da hepatite C

A hepatite C apresenta perfis distintos de evolução, mas em geral apresenta curso lentamente progressivo. A infecção pelo HCV geralmente é descoberta durante doação de sangue, exames de rotina ou exames de diagnóstico realizados por outras doenças . A infecção se torna crônica em 85% dos casos (KATO et al., 2002).

Pacientes com infecção aguda pelo HCV são frequentemente assintomáticos em 50 a 90% dos casos (CRAXI et al., 2011) . Após a exposição inicial, o HCV-RNA pode ser detectado no sangue com 1 a 3 semanas e o anti-HCV está positivo em 50-70% com o início dos sintomas de fadiga, perda de peso, náuseas, dor abdominal, anorexia, artralgias, dores musculares e icterícia (NIHA, 2002). Uma pequena proporção de pacientes após a infecção aguda têm resolução espontânea mas a maioria evolui para a cronicidade (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

A progressão da forma aguda para a hepatite crônica é definida pela elevação das aminotransferases persistentemente por mais de 6 meses, com a persistência do vírus no sangue e esta transição acontece de forma assintomática (SEEF, 2002).

A cirrose representa o estágio final de qualquer doença crônica hepática e atualmente a hepatite C e o álcool são as principais causas dessa doença nos Estados Unidos da América (GARCIA-TSAO et al., 2009). Uma vez que os pacientes tenham desenvolvido a cirrose, terão risco de descompensação pelas complicações da hipertensão portal, como o sangramento das varizes, ascite e encefalopatia (SHIFFMAN, 2003). Outra complicação importante desta infecção crônica é o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (DI BISCEGLIE, 2000; SEEF, 2002).

2.6 Diagnóstico da hepatite C

2.6.1 Teste sorológico

O ELISA é o método mais utilizado no diagnóstico da infecção pelo HCV. O teste utilizando antígenos recombinantes do vírus (PAWLOTSKY, 1999; STRAUSS, 2001; GHANY et al., 2009) adquiriu maior sensibilidade e especificidade ao passar para segunda e terceira gerações (especificidade > 99%) (STRAUSS, 2001; GHANY et al., 2009).

2.6.2 Testes moleculares

a) Teste de detecção de ácidos nucleicos

Os testes moleculares que detectam o RNA viral no sangue periférico são a reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativa ou PCR em tempo real (PAWLOTSKY, 1999; STRAUSS, 2001; GHANY et al., 2009).

b) Teste de genotipagem

O exame de genotipagem utiliza testes moleculares baseados em amplificação do RNA viral, capaz de identificar os diversos genótipos, subtipos e populações mistas do HCV, sendo indicado na ocasião da confirmação do diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.6.3 Biópsia hepática

A biópsia hepática ainda é uma ferramenta valiosa para definição do estadiamento de fibrose e grau de atividade inflamatória na hepatite C crônica e avaliação dos

efeitos do tratamento (BEDOSSA e POYNARD, 1996). Desmet et al. (1994) propuseram uma classificação das hepatites crônicas incluindo a atividade necroinflamatória e a fibrose hepática. Os sistemas de estadiamento são baseados na avaliação dos graus da fibrose, sendo o score METAVIR considerado o melhor para o diagnóstico histológico da hepatite C crônica (BEDOSSA e POYNARD, 1996).

2.7 Carcinoma hepatocelular

O CHC é o câncer primário derivado das principais células do fígado, os hepatócitos.

O câncer de fígado a terceira principal causa de morte, após o câncer de pulmão e de estômago, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2008; FERENCI et al., 2010). O CHC é o quinto tumor mais frequente entre os homens e o oitavo entre as mulheres (FERENCI et al., 2010).

O Sudeste da Ásia, Japão e África do Sul apresentam uma incidência particularmente alta do CHC e a China responde por 50% dos casos no mundo, enquanto que nos Estados Unidos, América do Sul, Grã-Bretanha, nordeste da Europa e Oceania são consideradas regiões de baixa prevalência (BRUIX e SHERMAN, 2005; EL-SERAG e RUDOLPH, 2007; TSAI e CHUNG, 2010). Devido à história natural da hepatite C, nos últimos 20 a 30 anos a frequência do CHC vem aumentando nos Estados Unidos da América e Europa (ALJARIB, FRANCESCA e BURROUGS, 2007).

Na Ásia, a infecção crônica pelo HBV é responsável por 70% dos casos de CHC, enquanto que 20% são causados por HCV. No entanto, no Japão 75% dos casos do CHC são relacionados ao HCV (CHENG et al., 2009).

A incidência do CHC em relação às raças e sexo varia não somente entre as regiões, mas também entre diferentes grupos populacionais de uma mesma região. Nos Estados Unidos da América, as taxas são duas vezes mais elevadas em asiáticos do que em afro-americanos, que por sua vez apresentam taxas duas vezes maiores do que os brancos (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

Em relação ao sexo, o CHC ocorre em uma frequência de duas a quatro vezes maior em homens do que em mulheres (CONTE, 2000; BRUIX e SHERMAN, 2005).

A faixa etária mais acometida nos Estados Unidos da América e Europa está entre a sexta e sétima década de vida e, em áreas de grande incidência, como África e Ásia, o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre a terceira e quinta década (INCA, 2008).

Um taxa superior a 80% dos casos de CHC ocorre em pacientes com doença hepática crônica causada pela infecção pelo HBV ou HCV (McGLYNN, 2005). Entre as maiores causas de cirrose nos pacientes com CHC estão a infecção por HBV, HCV, a doença hepática alcoólica e esteatohepatite não-alcoólica (BRUIX e SHERMAN, 2005; ALJARIB, FRANCESCA e BURROUGS, 2007; ASCHA et al., 2010; BRUIX e SHERMAN, 2010). Entre outros fatores de risco para o desenvolvimento do CHC estão o uso do cigarro e condições genéticas como a hemocromatose, a tirosinemia e as porfirias (CONTE, 2000).

Outro importante fator de risco é a exposição à aflatoxina B1, produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. Em várias regiões da África, a quantidade estimada de aflatoxina ingerida nos alimentos correlacionou-se com a frequência do CHC (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007).

O desenvolvimento do CHC em pacientes co-infectados pelo HIV e HCV é mais agressivo do que aquele observado em pacientes monoinfectados (BRUIX e SHERMAN, 2010). A associação entre obesidade, diabetes e CHC tem sido relacionada à progressão da esteatose para cirrose (CONTE, 2000; BRUIX e SHERMAN, 2005; ASCHA et al., 2010).

2.8 Hepatite C e CHC

O CHC é um tumor altamente heterogêneo e a hepatocarcinogênese é um processo complexo que envolve uma série de alterações genéticas, epigenéticas, rearranjos cromossômicos, ativação de oncogenes celulares, ativação e ou inativação de genes supressores do tumor e a desregulação de várias vias de transdução de sinal, conduzindo a transformação maligna dos hepatócitos (CASTELO et al., 2010, THORGEIRSSON e GRISHAM, 2002; LLOVET; BURROUGHS e BRUIX, 2003; TSAI e CHUNG, 2010). Esta neoplasia surge em condições de fígado normal, fígado anormal sem cirrose e em 80% dos casos com cirrose (LLOVET e BRUIX, 2008).

A patogênese molecular do CHC em pacientes com hepatite C não está clara. A proteína do nucleocapsídeo do HCV pode estar envolvida na apoptose, transdução

de sinal, formação de espécies reativas do oxigênio, no metabolismo lipídico e na transformação e modulação da imunidade (CHA e DEMATTEO, 2005; TSAI e CHUNG, 2010). A resposta imune do hospedeiro desenvolve um papel ao redor da hepatocarcinogenese relacionada ao HCV, sugerindo que uma melhor compreensão dos eventos humorais e celular envolvidos na transformação hepática podendo conduzir a medidas preventivas, atingindo o microambiente pró e anti-tumoral. (CASTELO et al., 2010). A maioria do CHC desenvolve no fígado cirrótico, mas a ligação entre a cirrose e o CHC é provavelmente multifatorial (TSAI e CHUNG, 2010).

2.9 Evolução clínica e diagnóstico do CHC

Os pacientes com CHC podem apresentar grande diversidade de sinais clínicos. Caso o tumor seja pequeno pode não apresentar sintomas ou sinais da doença, mas também pode apresentar sinais relacionados com a doença hepática crônica ou cirrose (FERENCI et al., 2010).

As principais queixas incluem dor em quadrante superior direito e perda de peso. Outros sintomas incluem deterioração da função hepática, ascite de início recente, aumento da icterícia, febre, encefalopatia de início recente, sangramento varicoso em pacientes com cirrose, dor abdominal aguda com sinais de choque hipovolêmico pela rotura do tumor com sangramento intra-abdominal (CONTE, 2000; BEFELERR e DI BISCEGLIE, 2002; EL-SERAG et al., 2008; FERENCI et al., 2010).

Entre os diversos marcadores tumorais hepáticos, aquele mais frequentemente investigado é a alfa-fetoproteína (FORNER, 2009). Níveis persistentemente elevados podem ser úteis como critérios de diagnóstico do câncer hepático, desde que associados a outros exames, tais como a ultrassonografia abdominal, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética (FERENCI, 2010).

No entanto, a alfa-fetoproteína possui baixa sensibilidade, pois há relatos de valores normais mesmo quando o tumor já está presente. Por isso é considerada um marcador de doença avançada, não sendo mais uma ferramenta de rastreamento eficaz (FORNER, 2010). Portanto, necessita de sensibilidade e especificidade adequadas para uma vigilância eficaz e diagnóstico do CHC (BRUIX e SHERMAN, 2010).

Há diversos sistemas para o manejo do CHC, mas o sistema de estadiamento proposto pela Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) (BRUIX e SHERMAN, 2010) foi proposta como a classificação padrão. Este sistema considera variáveis ligadas ao estadio de evolução do tumor, à função hepática, ao estado físico e os sintomas ligados ao câncer correlacionando estas variáveis com as opções de tratamento e a expectativa de vida (BRUIX e SHERMAN, 2010; FERENCI et al., 2010; GIGLIA et al., 2010).

Essa classificação foi endossada pela Associação Americana para o Estudo das doenças do Fígado (AASLD) e Associação Européia para o Estudo do Fígado (EASL) (FERENCI et al., 2010; LLOVET e BRUIX, 2008) e vem sendo amplamente aceita na prática clínica como também para muitos ensaios clínicos de novos medicamentos para o tratamento do carcinoma hepatocelular tais como a utilização da quimioterapia sistêmica (BRUIX e SHERMAN, 2011, LLOVET e BRUIX, 2008)

2.10 Interleucina IL-10

2.10.1 Proteína, estrutura gênica

Descrita inicialmente como um fator inibidor da síntese de citocinas por Fiorentino em 1989, posteriormente identificada por Mosmann et al., (1990) e denominada de IL-10 (MOORE et al., 1990). O gene da IL-10 contém cinco éxons e ocupa aproximadamente 5,1Kb no cromossomo 1 (KIM et al., 1992) entre 1q31 e 1q32, sendo esta região rica em genes que codificam proteínas importantes para o sistema imunológico (ESKDALE et al., 1997).

A IL-10 é uma citocina da resposta Th2, que pertence a uma família de citocinas com organização genômica exon-intron similar, ligam-se a receptores com estruturas semelhantes e ativam a via de sinalização, transdução de sinal e ativador de transcrição Janus quinase (JAK/STAT) (MOSSER e ZHANG, 2008), resultando na inibição de ativação dos macrófagos (MOORE et al., 2001).

2.10.2 Função biológica da IL-10

Os monócitos e macrófagos ativados são os tipos celulares predominante responsáveis pela síntese da IL-10. A lista de células produtoras de IL-10 se

expandiu rapidamente, assim como o número de células que são capazes de responder a essa citocina. As quatro principais fontes de células T de IL-10 são as células da resposta Th2 e células da subpopulação de células T reguladoras (MOSSER e ZHANG, 2008). Outros produtores são as células B, eosinófilos, células dendríticas e queratinócitos (ASSADULLAH; STERRY e VOLK, 2003).

A principal função biológica da IL-10 parece ser exercida sobre as células apresentadoras de antígenos e os linfócitos (ASSADULLAH; STERRY e VOLK, 2003; VICARI e TRINCHIERI, 2004; MOSSER e ZHANG, 2008). Os efeitos diretos sobre essas populações explicam o grande impacto desta citocina, incluindo a regulação do equilíbrio Th1/Th2 (ASSADULLAH; STERRY e VOLK, 2003).

A IL-10 inibe a síntese de vários mediadores inflamatórios secretados por monócitos e macrófagos ativados, tais como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade, fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos, fator inibidor da leucemia e fator ativador de plaqueta (NELSON et al., 2000; MOORE et al., 2001; ASSADULLAH; STERRY e VOLK, 2003).

A IL-10 apresenta efeitos imunossupressores sobre as células dendríticas que são consistentes com a inibição da resposta Th1 (NELSON et al., 2000; MOORE et al., 2001), inibindo a produção de IL-2, INF γ e TNF- α , que são necessárias a resposta imune celular (EDWARDS-SMITH et al., 1999).

A IL-10 pode bloquear a nível regional uma etapa de maturação das células dendríticas (tem elevada capacidade de captura, mas potência estimulativa baixa) e o resultado é uma célula inativada que não vai estimular as células T, mas vai se ligar a quimiocinas pró-inflamatórias, sem, no entanto, responder a elas (D'AMICO et al., 2000; MOSSER e ZHANG, 2008).

A inibição das células da resposta Th1 pela IL-10 parece ser mediada via inibição da síntese de IL-12, um co-estimulador que é necessário para a produção de citocinas deste perfil. A secreção das diferentes citocinas contribui de forma eficaz para as diferenças entre os subtipos de células T e assim, a regulação da resposta humoral e celular pode ser explicada, em parte, pela regulação cruzada da diferenciação e ativação das células das respostas Th1 e Th2 no processo de resposta imune (MOSSER e ZHANG, 2008).

A presença da base nitrogenada adenina na posição -1082 do promotor do seu gene foi correlacionada com baixa produção da IL-10 após estimulação de

células T *in vitro* (TURNER et al., 1997). Esta variante parece ter aplicabilidade clínica tendo em vista que alguns alelos da região promotora podem determinar a produção da IL-10 (ESKDALE et al., 1998)

2.11 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

2.11.1 Proteína, estrutura gênica

O TNF- α é uma citocina inflamatória pleiotrópica que foi isolada pela primeira vez por Carswell et al., (1975) na tentativa de identificar uma substância ou um fator que produzia hemorragia e necrose em sarcoma.

O gene do TNF- α foi clonado em 1985, está mapeado no cromossoma 6 região p213, mede cerca de 3Kb e contem 4 éxons. O TNF- α liga-se a receptores específicos na membrana celular denominados receptores do TNF I e II. Estão presentes em quase todas as células do nosso organismo, e no citoplasma ativam uma família de proteínas denominadas de fatores associados aos receptores do fator de necrose tumoral (VITALE e RIBEIRO, 2007).

2.11.2 Função biológica do TNF- α

Os efeitos biológicos do TNF- α podem variar dependendo da sua concentração, do tempo de exposição da célula e da presença de outros mediadores (HIRONO et al., 2000). A principal função do TNF- α é promover a ativação dos neutrófilos e monócitos para o local da infecção (VITALE e RIBEIRO, 2007).

Nas células endoteliais, atua promovendo vasodilatação, estimulando a secreção de um grupo de quimiocinas com ação quimiotática para leucócitos, juntamente com outras interleucinas (IL-1 e IL-6), como estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, levando à liberação do hormônio liberador de corticotropina, suprimindo a febre e o apetite (VITALE e RIBEIRO, 2007).

No fígado, participa da resposta de fase aguda, estimulando a produção das proteínas de fase aguda do processo inflamatório (proteína C-reativa) e uma série de outros mediadores (TILG, 2009). Tem sido atribuída ao TNF- α propriedades anti-cancerígenas pelos efeitos citolíticos e ou citostáticos diretos sobre as células tumorais renais (CARSWELL et al., 1975).

2.12 Polimorfismos dos genes da IL-10 e TNF- α no CHC

Foi descrita a associação de níveis elevados de IL-10 em certos tipos de câncer, como o de ovário, melanomas, mieloma e linfomas, podendo ser um indicador de uma resposta inflamatória ou de uma imunossupressão (MOORE et al., 2001). Nos últimos anos, tem havido enorme esforço por numerosos laboratórios de todo o mundo para identificar as mutações genéticas que desempenham um papel importante na predisposição genética para a progressão de doenças e determinados cânceres (HOWEEL e ZERILLIS, 2007).

Polimorfismo do nucleotídeo simples (SNPs) são variações da sequência do DNA que ocorrem quando um único nucleotídeo (adenina, timina, citosina ou guanina) na sequência do genoma é alterado (SNP, 2010).

Muitos polimorfismos podem não ter efeito sobre a função das células, no entanto, as variações na sequência do DNA podem ter um impacto importante sobre a forma de como os seres humanos respondem a doenças, fatores ambientais, tais como bactérias, vírus, toxinas, produtos químicos, drogas e outras terapias (SNP, 2010).

Estudos revelam uma forte correlação entre a prevalência de doenças e polimorfismos do gene *IL-10*, no entanto, faz-se necessário desenvolver estudos que correlacionem “causa e efeito” para demonstrar como estes polimorfismos contribuem para o desenvolvimento destas doenças (MOSSER e ZHANG, 2008).

A extraordinária diferença individual entre a habilidade de produzir IL-10, TNF- α ou INF γ após estimulação *in vitro* tem sido atribuída aos polimorfismos dentro das regiões reguladoras do genoma ou dentro da sequência dos sinais dos respectivos genes. Vários locais de polimorfismos dentro das regiões promotoras do gene da IL-10 foram descritos e a combinação de três polimorfismos nucleotídeos simples da transcrição iniciam a produção local de três diferentes haplótipos (GCC, ACC, e ATA) que são associados a diferentes expressões de IL-10 (HAUKIM et al., 2002; MANGIA et al., 2004). Os seis SNPs são por convenção agrupados em distais e proximais, de acordo com a sua localização na sequência do gene *IL-10*, em relação ao início da transcrição. Consideram-se distais os SNPs situados nas posições -3575 (T/A), -2849 (G/A) e -2763 (C/A), e proximais os situados nas posições -1082 (G/A), -819(C/T) e -592(C/A) (ESKDALLE et al., 1999; MOOSER e ZHANG, 2008).

Uma análise dos efeitos sinérgicos dos diferentes polimorfismos pode ser realizada a partir da combinação destes em haplótipos. Os diferentes genótipos e haplótipos do gene da IL-10 foram associados, em estudos *in vitro* e *in vivo*, com uma produção diferencial da proteína (ESKDALE, KUBE e GALLAGHER, 1996). Isto é condizente com estudos que identificaram seqüências reguladoras negativas e positivas nessa região. Desta maneira, as diferenças herdáveis na produção de IL-10 estão fortemente relacionadas à estrutura gênica (ESKDALLE et al., 1998).

O haplótipo distal dos SNPs -3575T/-2849G/-2763C foi associado com uma alta produção de IL-10, enquanto o haplótipo -3575A/-2849(A/G)/-2763A foi associado com baixa produção de IL-10 (ESKDALE et al., 1998; MOOSER e ZHANG, 2008). Entretanto, para o haplótipo proximal -1082A/-819T/-592A existem diferentes interpretações, segundo o método utilizado para aferir os níveis de produção de IL-10.

Estudos com linfócitos de sangue periférico estimulados *in vitro* associaram o haplótipo ATA com baixa produção de IL-10 e resultados opostos foram encontrados em estudos *in vivo* (HELMINEN; LAMDENPOHJA e HUME, 1999). No SNP -1082, quando analisado isoladamente, o alelo (G) foi associado com uma produção maior de IL-10 (TURNER et al., 1997).

Um polimorfismo genético que afeta diretamente a regulação do TNF- α está localizada na posição -308 na região do promotor do gene de TNF- α , que define os alelos TNF1 (-308G) e TNF2 (-308A). Associações positivas foram encontradas entre o alelo TNF2 e alguns tumores malignos como linfomas não-Hodgkin, carcinomas de mama e próstata. Entretanto nenhuma associação foi encontrada entre o promotor do TNF- α -308 e câncer de estômago, colo do útero, câncer de colón e carcinoma de células renais. O TNF- α foi detectado em altas concentrações em pacientes com câncer e, alguns relatos sugerem que ele pode agir como um promotor endógeno do tumor *in vivo*, tendo, portanto um papel na hepatocarcinogênese (HO et al., 2004).

A maior parte das doenças hepáticas são caracterizadas por processos inflamatórios com maior expressão local de diferentes citocinas pró- e anti-inflamatórias. Estas citocinas são a força motriz de muitos distúrbios hepáticos inflamatórios e muitas vezes resultam em fibrose e cirrose (TILG, 2009).

A distribuição do polimorfismo do promotor do gene do TNF- α foi relatada por diversos autores. Yee et al., (2000) verificaram a associação entre os SNPs no

promotor do gene do TNF nas posições -238A e -308A em pacientes com hepatite C; demonstrando um risco de cirrose de 3,2 vezes e 5,1 vezes para cada polimorfismo, respectivamente. Kusumoto et al., (2006) estudaram os mesmos polimorfismos em pacientes com HCV, analisando adicionalmente o clareamento viral, níveis de transaminases e o colágeno tipo IV (um marcador de fibrose hepática). Este marcador foi significativamente maior em indivíduos que apresentaram com os polimorfismos estudados, demonstrando uma associação com a fibrose hepática. Ho et al., (2004), estudando pacientes com CHC por HVB e HCV encontraram uma associação do alelo TNF2 com o risco aumentado de desenvolver o CHC.

Estudos sobre os polimorfismos na região promotora dos genes da IL-10 e TNF- α , indicam que estes influenciam a eliminação espontânea da infecção pelo HCV, embora outros afirmem que não existe associação significativa destes polimorfismos. Estas discrepâncias podem ser devidas as diferenças étnicas entre as populações analisadas. Sendo assim o papel destes polimorfismos na infecção pelo HCV continua sendo um desafio (KUSUMOTO et al., 2006) .

Há uma grande variação inter-individual na produção da IL-10 que pode ser transmitida geneticamente (VICARI, TRINCHIERI, 2004). Por isso, alguns estudos SHIN et al., 2003; PALADINO et al., 2006) investigaram um possível papel da IL-10 em doenças virais e outras patologias, analisando a correlação entre o polimorfismo na IL-10 e parâmetros clínicos. Shin et al., (2003) demonstraram uma associação entre o haplótipo genótipo do polimorfismo do promotor do gene da IL-10 nas posições HT2 com a progressão ao CHC.

A influência dos genótipos dos polimorfismos das citocinas sobre diferentes características clínicas da doença hepática ou sobre a resposta terapia antiviral foi avaliada em vários estudos e os dados são controversos, com alguns mostrando uma possível associação e outros rejeitando esta ligação (CACCIARELI et al., 1996; EDMITH-SMITH et al., 1999), evido às diferenças entre as amostras clínicas e avaliação do clareamento viral (CONSTANTINI et al., 2002).

Mangia et al., (2004) identificaram uma associação entre o haplótipo ATA do promotor do gene da IL-10 e o curso favorável da infecção HCV, refletindo em uma redução da expressão da IL-10 que poderia favorecer o clareamento viral. Os achados neste trabalho levantam a possibilidade que a variabilidade individual da IL-10 poderia justificar algumas diferenças no curso clínico de pacientes com HCV,

sendo indivíduos geneticamente baixos produtores de IL-10 mais propensos a clarear o HCV-RNA.

A IL-10 possui considerável importância no desenvolvimento do câncer humano (ESKDALE et al., 1998), devido a sua ação anti-angiogênica e imunossupressora, levando a uma modulação da susceptibilidade ao câncer (HOWELL e ZERILLIS, 2007). Wang et al., (2003), estudando o polimorfismo da gene da IL-1 β associado ao carcinoma hepatocelular nos pacientes com hepatite C relataram que o genótipo IL-1 β -31T/T e o haplótipo IL-1 β -511/-31 foram associados com o HCC em japoneses com hepatite C crônica.

Uma série 23 estudos em 13 diferentes tipos de cânceres investigou a associação entre os polimorfismos da IL-10, susceptibilidade ao câncer e prognóstico clínico. Em alguns dos cânceres (melanoma cutâneo, câncer gástrico e carcinoma de células renais), os genótipos associados com baixa expressão de IL-10 constituíram um fator risco para desenvolvimento da doença. Já outros cânceres como cervical, hepático causado pelo HBV e mieloma múltiplo, os genótipos ou haplótipos estavam associados com alta expressão de IL-10 (HOWELL e ZERILLIS, 2007).

Diante do exposto fomos motivados a investigar em nossa região a presença dos polimorfismos no promotor dos genes da IL-10 e TNF- alfa em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C.

3. HIPÓTESE

A presença dos polimorfismos no promotor dos genes da IL-10 e do TNF- α está associada com a histologia hepática em pacientes com hepatite C e o carcinoma hepatocelular .

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- ❖ Determinar os níveis séricos de IL-10 e TNF- α , as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos no promotor dos genes da IL-10 e do TNF- α e verificar sua associação com a histologia hepática em pacientes com hepatite C e o carcinoma hepatocelular.

4.2. Específicos

Nos pacientes com hepatite C e o carcinoma hepatocelular :

- ❖ Determinar os níveis séricos de IL-10 e do TNF- α e verificar sua associação com a atividade inflamatória e o grau de fibrose hepática;
- ❖ Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos em substituições nas posições -1082 AG, -819 CA e -592 CT no promotor do gene da IL-10;
- ❖ Determinar as frequências alélicas e genotípicas do SNP em substituição na posição -308 GA no promotor do gene do TNF- α ;
- ❖ Comparar as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs no promotor dos genes da IL-10 e do TNF- α ;
- ❖ Verificar a associação entre os SNPs com atividade inflamatória e o grau de fibrose hepática

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo prospectivo do tipo corte transversal com comparação de grupos.

5.2 Local do estudo

Serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco e Instituto do Fígado de Pernambuco, centros de referência para tratamento de doenças hepáticas na cidade do Recife, Pernambuco.

5.3 População do estudo

Pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico da hepatite C através do exame sorológico, molecular e genotipagem. Todos submetidos à biópsia hepática para definição do estadiamento da fibrose e grau de atividade inflamatória pelo Score METAVIR (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002)

Pacientes maiores de 18 anos com diagnóstico do CHC definido por exames de ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, arteriografia hepática e alguns com a biópsia do tumor, seguindo os critérios de BCLC (Bruix & Sherman (2005).

Os dados da biópsia hepática dos pacientes com hepatite C foram coletados em prontuários médicos e classificados segundo o Score METAVIR [16]. Foi considerada fibrose leve com gradação de F1 a F2 e fibrose avançada, caso com gradação de F3 a F4 (BOUZGARROU et al., 2010). Com relação à atividade inflamatória, foi considerada caso leve com gradação igual a A1 e atividade inflamatória grave, caso com gradação de A2 a A3 (ASSELAH et al., 2009).

5.4 Definição do tamanho amostral

Para comparação da frequência dos genótipos do polimorfismo do promotor do gene da TNF-alfa -308 e IL-10 (-819, -1082, -519) entre os grupos foram utilizados os seguintes dados:

Frequência	Comparação	
	1	2
Proporção no grupo com fibrose leve	59.2%	43.4%
Proporção no grupo CHC-HCV	82.6%	82.6%
Nível de significância	5%	5%
Poder do teste	80%	80%
Teste de hipótese	bicaudal	bicaudal
Tamanho da amostra calculado para TNF-alfa -308	58	23
Tamanho da amostra calculado para IL-10 -819	48	48
Tamanho da amostra calculado para IL-10 -1082	46	46
Tamanho da amostra calculado para IL-10 -519	43	43

5.5 Critérios de inclusão

Pacientes maiores de 18 anos portadores do HCV e pacientes com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV

5.6 Critérios de exclusão

Foram excluídos os pacientes menores de 18 anos de idade, que apresentaram positividade para o HBsAg e anti-HIV ou em tratamento antiviral para hepatite C, uso de imunossupressores e os transplantados.

5.7 Definição e categorização das variáveis de coleta de dados

5.7.1 Variáveis dependentes

Nome da variável	Definição/categorização												
Fibrose Hepática	Definida como acúmulo de componentes da matriz extracelular no hepatócito em resposta a uma lesão aguda ou crônica por vírus, auto-imune e metabólicos tóxicos (FRIEDMANN, 2008; MANNING; AFDHAL, 2008), sendo categorizada pelo escore METAVIR (BEDOSSA, POYNARD, METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP, 1996) <table> <tr> <th>Score METAVIR</th><th>Significado clínico</th></tr> <tr> <td>F0</td><td>Ausência de fibrose hepática</td></tr> <tr> <td>F1</td><td>Fibrose septal sem pontes</td></tr> <tr> <td>F2</td><td>Fibrose septal com raras pontes</td></tr> <tr> <td>F3</td><td>Numerosas pontes sem cirrose hepática</td></tr> <tr> <td>F4</td><td>Cirrose hepática</td></tr> </table>	Score METAVIR	Significado clínico	F0	Ausência de fibrose hepática	F1	Fibrose septal sem pontes	F2	Fibrose septal com raras pontes	F3	Numerosas pontes sem cirrose hepática	F4	Cirrose hepática
Score METAVIR	Significado clínico												
F0	Ausência de fibrose hepática												
F1	Fibrose septal sem pontes												
F2	Fibrose septal com raras pontes												
F3	Numerosas pontes sem cirrose hepática												
F4	Cirrose hepática												
Atividade inflamatória	Definida pela intensidade das lesões necroinflamatórias periportal e intralobular sendo categorizada em pelo score METAVIR (BEDOSSA, POYNARD, METAVIR COOPERATIVE STUDY GROUP, 1996) <table> <tr> <th>Score METAVIR</th><th>Significado clínico</th></tr> <tr> <td>A0</td><td>Ausência de atividade inflamatória</td></tr> <tr> <td>A1</td><td>Atividade inflamatória leve</td></tr> <tr> <td>A2</td><td>Atividade inflamatória moderada</td></tr> <tr> <td>A3</td><td>Atividade inflamatória grave</td></tr> </table>	Score METAVIR	Significado clínico	A0	Ausência de atividade inflamatória	A1	Atividade inflamatória leve	A2	Atividade inflamatória moderada	A3	Atividade inflamatória grave		
Score METAVIR	Significado clínico												
A0	Ausência de atividade inflamatória												
A1	Atividade inflamatória leve												
A2	Atividade inflamatória moderada												
A3	Atividade inflamatória grave												

5.7.2 Variáveis independentes

Nome da variável	Definição/categorização
Gênero	Definida pelo gênero do paciente, sendo categorizada como variável nominal dicotômica (masculino / feminino).
Idade	Definida como o intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta sanguínea, sendo categorizada como variável quantitativa discreta.
Tabagismo	Considerou-se tabagista todo indivíduo que declarou ser fumante no momento da entrevista, independentemente da quantidade de cigarros ou que fumou pelo menos um dia nos últimos 30 dias, sendo categorizado como fumantes (diário e ocasional), ex-fumantes e pessoas que nunca fumaram (PESSIONE et al., 2001; STRAMARI; KURTZ e SILVA 2009).
Consumidor de bebida alcoólica	Considerou-se todo aquele que referir fazer uso de tal bebida, independentemente do tipo, quantidade ou frequência de uso Sendo categorizada em homens com ingestão de >40g/dia e em mulheres >20g/dia (REUBEN, 2006; LEVISTKY e MAILLIARD, 2004).

Diabetes mellitus	Definida pelo nível da glicose sanguínea em jejum ≥ 126 mg/dl, de acordo com a <i>American Diabetes Association</i> e a Sociedade Brasileira de Diabetes (2011). Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
Índice de massa corporal (IMC)	Definida pelo peso (kg)/ dividido pelo quadrado da sua altura(m)². Sendo o resultado comparado com um quadro que indica o grau de obesidade do indivíduo, categorizada da seguinte forma <table> <tr> <th>IMC</th><th>Resultado</th></tr> <tr> <td>< 18,5</td><td>Abaixo do peso</td></tr> <tr> <td>18,5 – 24,9</td><td>Peso normal</td></tr> <tr> <td>25,0 – 29,9</td><td>Sobrepeso</td></tr> <tr> <td>30,0 – 34,9</td><td>Obesidade grau I</td></tr> <tr> <td>35,0 – 39,9</td><td>Obesidade grau II</td></tr> <tr> <td>> 40,0</td><td>Obesidade grau III</td></tr> </table>	IMC	Resultado	< 18,5	Abaixo do peso	18,5 – 24,9	Peso normal	25,0 – 29,9	Sobrepeso	30,0 – 34,9	Obesidade grau I	35,0 – 39,9	Obesidade grau II	> 40,0	Obesidade grau III
IMC	Resultado														
< 18,5	Abaixo do peso														
18,5 – 24,9	Peso normal														
25,0 – 29,9	Sobrepeso														
30,0 – 34,9	Obesidade grau I														
35,0 – 39,9	Obesidade grau II														
> 40,0	Obesidade grau III														
AST	Definida como enzima predominantemente mitocondrial e obtida pela dosagem sérica da aspartato aminotransferase, categorizada como variável quantitativa discreta.														
ALT	Definida como enzima predominantemente citoplasmática e obtida pela dosagem sérica da alanino aminotransferase, categorizada como variável quantitativa discreta.														
GGT	Definida como enzima mais relacionada com fenômenos colestatícos obtida pela dosagem sérica da gamaglutamiltranspeptidase, categorizada como variável quantitativa discreta.														
FA	Definida como uma enzima encontrada principalmente nos microvilos dos canaliculos biliares e obtida pela dosagem sérica da fosfatase alcalina, categorizada como variável quantitativa discreta.														
BT	Definida como o principal componente dos pigmentos biliares e obtida pela dosagem sérica da bilirrubina total, categorizada como variável quantitativa discreta.														
Glicemia	Definida pela dosagem sérica do nível de glicose, categorizada como variável quantitativa discreta														
Plaquetas	Definido como a contagem das células plaquetárias obtida através do hemograma do paciente e categorizada como variável quantitativa discreta.														
AFP	Definida como uma glicoproteína produzida normalmente no desenvolvimento fetal e neonatal pelo fígado, saco gestacional e trato gastrointestinal, obtida pela dosagem sérica de alfafetoproteína e categorizada como variável quantitativa discreta.														
Seringa de vidro	Definida como utilização de seringas de vidro para aplicação intra-venosa ou intra-muscular de qualquer substância. Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
Cirurgia	Definida pela realização de qualquer procedimento operatório. Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
Hemotransfusão	Definida pelo recebimento transfusão de sangue e/ou derivados. Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
UDI	Definida pelo usuário de drogas que compartilha equipamentos para auto-administração de drogas injetáveis. Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
Tatuagem	Definida como a prática de marcar a pele com pinturas, desenhos, utilizando agulha para inserir os pigmentos. Categorizada como variável nominal (Presente / Ausente).														
Alelo IL-10-1082 (G/A)	Definido pela presença do nucleotídeo guanina ou adenina na posição -1082 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (IL-10-1082 G / IL-10-1082 A).														
Alelo IL-10-819 (C/T):	Definido pela presença do nucleotídeo citosina ou timina na posição -819 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (IL-10-819 C / IL-10-819 T)														

Alelo IL-10-592 (C/A)	Definido pela presença do nucleotídeo citosina ou adenina na posição -592 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (IL-10-592 C / IL-10-592 A).
Alelo TNF- α -308 (G/A)	Definido pela presença do nucleotídeo guanina ou adenina na posição -308 da sequência no promotor do gene do TNF- α , em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (TNF- α -308 G / TNF- α -308 A).
Genótipos do SNPs IL-10-1082	Definido pela junção dos alelos IL-10-1082 G e IL-10-1082 A da posição -1082 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (GG / GA / AA).
Genótipos do SNPs IL-10-819	Definido pela junção dos alelos IL-10-819 C e IL-10-819 T da posição -819 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (CC / CT / TT).
Genótipos do SNPs IL-10-592	Definido pela junção dos alelos IL-10-592 C e IL-10-592 A da posição -819 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (CC / CA / AA).
Genótipos do SNP TNF- α -308	Definido pela junção dos alelos TNF- α -308 G e TNF- α -308 A da posição -819 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (GG / GA / AA).
Haplótipos do SNP no promotor do gene IL-10	Definido pela junção dos alelos referentes aos SNPs nas posições -1082, -819 e -592 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (GCC / ACC / ATA).
Diplótipos do SNP no promotor do gene IL-10	Definido pela junção dos haplótipos nas posições -1082, -819 e -592 da sequência no promotor do gene da IL-10, em relação ao início da transcrição. Categorizada como variável nominal (GCC/GCC, GCC/ACC, GCC/ATA, ACC/ACC, ACC/ATA, ATA/ATA).

5.8 Coleta dos dados

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A), os dados de cada paciente foram coletados em um protocolo previamente elaborado para este estudo. Os dados referentes à identificação, anamnese e exame físico foram obtidos exclusivamente pelo pesquisador durante a consulta médica segundo a rotina dos serviços de Gastrohepatologia. Foram solicitados exames laboratoriais, de imagem e os resultados registrados na ficha clínica e no protocolo de avaliação (APÊNDICES B e C).

5.9 Coleta e processamento das amostras

Foram coletados dois tubos de 05 mL de sangue periférico por punção venosa, sendo um tubo com anticoagulante (EDTA) e outro sem anticoagulante.

A amostra com anticoagulante foi encaminhada para o Laboratório de Biologia Molecular e Vírus, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco(UPE) para a realização dos testes moleculares.

A amostra sem anticoagulante foi encaminhada ao setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) na Universidade de Federal de Pernambuco (UFPE) para processamento, que consistiu na centrifugação a 1500 g por 10 minutos para obtenção do soro, aliquotado em microtubos e armazenados à -20°C até a realização dos testes sorológicos.

5.10 Exames laboratoriais

Durante atendimento dos pacientes, foram solicitadas sorologias para HIV (anti-HIV), HBV (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc-total) e HCV (anti-HCV). Nos pacientes com anti-HCV positivo foram solicitados a PCR qualitativa e genotipagem do HCV. Todos os exames laboratoriais foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco:

5.11 Exames de imagem

Os pacientes foram submetidos a exames de ultrassonografia do abdômen superior, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética e arteriografia hepática realizadas no Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), Instituto do Fígado de Pernambuco e na rede credenciada do HUOC-UPE.

5.12 Dosagem sérica da IL-10 e TNF- α

As dosagens séricas da IL-10 (Quantikine Human IL-10, R&D System) e do TNF- α (Quantikine Human TNF- α , R&D System) foram realizadas por meio do ensaio imunoenzimático seguindo as instruções do fabricante.

5.13 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada com o Wizard Genomic Blood DNA Isolation Kit (Promega, UK), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi armazenado a -80°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

5.14 Polimorfismos de único nucleotídeo no promotor do gene da IL-10

Para análise do polimorfismo do gene promotor da IL-10 três substituições nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) foram determinados por PCR em tempo real utilizando o *TaqMan*® SNP Genotyping Assays ID: C___1747360_10, C___1747362_10 e C___1747363_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com instruções do fabricante.

5.15 Polimorfismo de um único nucleotídeo no promotor do gene do TNF- α

Para análise do SNP do gene promotor do TNF- α na posição -308 (G/A) foi utilizando o *TaqMan*® SNP Genotyping Assays por PCR em tempo real com ID: C___7514879_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com instruções do fabricante.

5.2 Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney or Kruskal-Wallis foram empregados, quando apropriado, para comparação das variáveis quantitativas entre os pacientes com hepatite C e com CHC-HCV, utilizando o programa. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para as variáveis categóricas, foi considerado significativo um $p < 0.05$. O programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, USA) foi utilizado para essas análises e construção das figuras.

Para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg o programa ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Swiss) foi utilizado. Na análise multivariada foi utilizado o método *Stepwise* com *backward* utilizando o software SSPS v.17 (Statistical Package for Social Science).

5.3 Considerações éticas

O estudo foi aprovado pelo comitê em de pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário (HUOC) da Universidade de Pernambuco sob o protocolo número 144/2008 (ANEXO A).

6. RESULTADOS

6.1. ARTIGO 1

Artigo submetido à *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (Apêndice D)

Polimorfismos de único nucleotídeo e níveis séricos da IL-10 em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular*

Polimorfismos e níveis séricos da IL-10

Aroucha, D.C.B.L.^{1,5,7,8}; Carmo, R.F.⁶; Silva, J.L.A.^{1,2}; Vasconcelos, L.R.S.^{6,8} Moura, P.⁶, Cavalcanti, M.S.M.⁶, Muniz, M.T.C.⁶; Aroucha, M.L.⁴ Siqueira, E.R.F.^{7,8}; Cahú, G.G.O.M.², Pereira, L.M.B.^{7,8}; Coêlho, M.R.C.D.^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ²Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil; ³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, Brasil; ⁴Departamento de Medicina Materno Infantil, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ⁵Núcleo de Atenção ao Idoso, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ⁶Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brasil; ⁷Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brasil; ⁸Instituto do Fígado de Pernambuco (IFPE), Recife, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Rua Clóvis Beviláqua, 50 - Aptº 101

Madalena - 50710-330 - Recife, PE, Brasil.

Fone/fax: (81) 3082-5111

E-mail: daysearoucha@yahoo.com.br

* Artigo Original submetido para publicação e formatado de acordo com as normas do *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. <http://mc.manuscriptcentral.com/jgh> (ANEXO B)

RESUMO

Introdução e objetivos: Interleucina-10(IL-10) é uma citocina com ação na resposta imune do hospedeiro à infecção pelo vírus da hepatite C (HCV). Foi investigado a associação dos níveis séricos da IL-10 e os polimorfismos(SNPs) no promotor do gene da IL-10 com a histologia hepática na infecção pelo HCV e carcinoma hepatocelular(CHC) em pacientes do nordeste do Brasil.

Métodos: Foram avaliados 171 pacientes com HCV, sendo 119 sem câncer, com biópsia hepática classificada de acordo com o escore METAVIR e 52 com CHC, diagnosticados segundo os critérios de BCLC. Para o estudo dos SNPs foi utilizando a PCR em tempo real e a dosagem sérica da IL-10 o ELISA. As análises estatísticas utilizadas foram a univariada e multivariada.

Resultados: Nos pacientes com HCV-CHC houve maior frequência de *diabetes mellitus* tipo II ($p<0,01$), níveis elevados de aspartato aminotransferase, gamaglutamiltranspeptidase, fosfatase alcalina, alfa-fetoproteína, bilirrubina total e plaquetopenia ($p<0,0001$). Níveis séricos de IL-10 foram mais elevados nos pacientes com HCV, F1/F2 ($p<0,0007$), A1 ($p<0,0087$) e A2 ($p<0,0079$) quando comparadas aos pacientes com HCV-CHC. Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas, genotípicas, haplótipos e diplótipos nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) no promotor do gene da IL-10.

Conclusão: Nós concluímos que os SNPs na região promotora da IL-10 não influenciaram a progressão da fibrose e atividade inflamatória na hepatite C e no HCV-CHC. No entanto, os pacientes apresentaram níveis séricos de IL-10 menores à medida que houve a progressão da atividade inflamatória, fibrose e o CHC.

Palavras-chave: Interleucina 10, polimorfismo de único nucleotídeo, hepatite C, carcinoma hepatocelular, fibrose hepática.

Introdução

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é a causa mais comum das doenças crônicas hepáticas em todo o mundo.¹ Estima-se que 20% dos pacientes cronicamente infectados progredirão para a cirrose hepática num período de 13 a 23 anos e 1 a 4 % destes pacientes desenvolverão carcinoma hepatocelular (CHC).^{2,3}

A hepatocarcinogênese é um processo complexo que envolve alterações genéticas, epigenéticas, rearranjos cromossomais, ativação de oncogenes celulares, ativação e/ou inativação de genes supressores do tumor e a desregulação de várias vias de transdução de sinal.^{4,5,6}

O risco para o desenvolvimento do CHC aumenta com a gravidade da inflamação e fibrose hepática.⁷ A inflamação hepática causada pelo HCV envolva diversos mecanismos, como a resposta imune regulatória do hospedeiro por meio das citocinas⁷ e os polipeptídeos virais que interagem com as células envolvidas na imunidade inata e adaptativa.⁸

Os pacientes com infecção aguda autolimitada pelo HCV apresentam uma resposta predominantemente T-helper 1 (Th1), enquanto um perfil de citocinas da resposta T-helper 2 (Th2) com expressão da interleucina 10 (IL-10), predomina naqueles com infecção crônica, estimulando a formação de anticorpos e inibindo a resposta Th1.^{9,10} A resposta Th1 tem sido associada à eliminação viral¹¹ e a resposta Th2, promove a persistência viral.¹²

Assim, constituiu objetivo deste estudo investigar a presença de polimorfismos de única base (SNPs) nas posições -1082, -819, -592 no promotor do gene da IL-10, determinar os níveis séricos desta citocina e verificar sua associação com a histologia hepática em pacientes com hepatite C e outros com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV.

Métodos

Seleção dos pacientes

Este estudo é do tipo corte transversal com comparação de grupos, onde foram avaliados 119 pacientes com hepatite C, sendo 54 com fibrose leve e 65 com fibrose avançada, além de 52 pacientes com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV (CHC-HCV) atendidos no Serviço de Gastrohepatologia do Hospital

Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco e do Instituto do Fígado de Pernambuco no período de Janeiro 2009 a Março de 2011.

Os pacientes foram submetidos a dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), glicemia, alfa-fetoproteína (AFP), contagem de plaquetas e sorologia para HIV (anti-HIV), hepatite B (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total) e hepatite C (anti-HCV). Nos casos com anti-HCV positivo, foram realizados a pesquisa do HCV-RNA e genotipagem viral.

O diagnóstico do carcinoma hepatocelular pelo HCV foi definido por exames de ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, arteriografia hepática e biópsia do tumor, seguindo os critérios de BCLC¹³

Os dados da biópsia hepática dos pacientes com hepatite C foram coletados em prontuários médicos e classificados segundo o Score METAVIR.¹⁴ Foi considerada fibrose leve com gradação de F1 a F2 e fibrose avançada, caso com gradação de F3 a F4.¹⁵ Com relação à atividade inflamatória, foi considerada caso leve com gradação igual a A1 e atividade inflamatória grave, caso com gradação de A2 a A3.¹⁶

Foram excluídos pacientes com soropositividade para o HBsAg e HIV, além daqueles em tratamento antiviral para hepatite C, transplantados e em uso de imunossupressores.

O estudo foi aprovado pelo comitê em de pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário (HUOC) da Universidade de Pernambuco sob o protocolo número 144/2008.

Coleta de dados

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os dados sobre idade, sexo, fontes de infecção, consumo de álcool (homens>40g/dia; mulheres>20g/dia), tabagismo, diabetes mellitus tipo II e índice de massa corpórea foram coletados por meio de questionário aplicado por único pesquisador.

Dosagem sérica da IL-10

Foi coletado por punção venosa um tubo de 5,0 mL de sangue periférico sem anticoagulante de cada paciente. Os soros foram obtidos por centrifugação e armazenados a -20°C até a realização da dosagem. A dosagem sérica da IL-10 foi

realizada pelo método imunoenzimático utilizando o Quantikine® Human IL-10 (R&D System, USA), executado de acordo com as instruções do fabricante.

Extração do DNA genômico

Utilizando-se o Wizard Genomic Blood DNA Isolation Kit (Promega, UK) de acordo com as instruções do fabricante, foi extraído o DNA genômico de uma amostra de 5,0 mL de sangue periférico coletado por punção venosa com anticoagulante (EDTA) de cada paciente. O DNA extraído foi armazenado a -80°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Polimorfismos de único nucleotídeo no promotor do gene da IL-10

Três substituições nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) foram investigados no promotor do gene da IL-10 por PCR em tempo real utilizando o *TaqMan® SNP Genotyping Assays* ID: C__1747360_10, C__1747362_10 e C__1747363_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com instruções do fabricante.

Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney or Kruskal-Wallis foram empregados, quando apropriado, para comparação das variáveis quantitativas entre os pacientes com hepatite C e com CHC-HCV. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparação das variáveis categóricas, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

O programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, USA) foi utilizado para essas análises e construção das figuras. Para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Switzerland) e para a análise multivariada foi aplicado o método *Stepwise* com *backward* utilizando o software SSPS v.17 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL).

Resultados

Características clínicas

Houve maior frequência do sexo masculino ($p = 0,005$) e idade média mais elevada ($p = 0,0001$) nos pacientes com CHC-HCV. Quanto às características clínicas e laboratoriais, foi identificada maior frequência de *diabetes mellitus* tipo II (p

= 0.01), maiores níveis séricos de AST, GGT, FA, BT, AFP ($p < 0,0001$) e plaquetopenia ($p < 0,0001$) nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C e fibrose leve e/ou grave (tabela 01).

Níveis séricos de IL-10

Foram detectados níveis séricos mais elevados de IL-10 nos pacientes com hepatite C e fibrose leve quando comparados àqueles com fibrose grave ($p = 0.00176$) e HCC-HCV ($p < 0.0007$) (figura 01).

Além disso, observaram-se maiores níveis séricos de IL-10 nos pacientes com hepatite C e atividade inflamatória leve ($p = 0,0087$) e grave ($p < 0.0079$) quando comparados aos pacientes com CHC-HCV (figura 02).

Polimorfismos de único nucleotídeo no promotor do gene da IL-10

A distribuição das frequências genotípicas encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, entretanto não houve diferença significativa entre as frequências alélicas e genotípicas (tabela 02) ou entre haplótipos e diplótipos (tabela 03) dos SNPs no promotor do gene da IL-10 nas posições -1082 (G/A), -819 (C/T) e -592 (C/A) nos grupos avaliados.

Análise multivariada dos fatores de risco associados à fibrose hepática

Os níveis elevados de GGT, BT e AFP foram fatores de risco independentes para o HCC em pacientes com hepatite C e fibrose leve (tabela 04). Por outro lado, plaquetopenia e níveis séricos elevados de IL-10 foram fatores de proteção para o CHC-HCV (tabela 04).

O sexo masculino e os níveis elevados de BT e AFP foram fatores de risco independentes para o CHC em pacientes com hepatite C e fibrose grave (tabela 04). No entanto, níveis séricos elevados de IL-10 foram fatores de proteção para o CHC-HCV (tabela 04).

Análise multivariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória

Níveis elevados de GGT, BT e AFP foram fatores de risco independentes para o CHC em pacientes com hepatite C e atividade inflamatória leve (tabela 05). Ao passo que, plaquetopenia e níveis séricos elevados de IL-10 foram fatores de proteção para o CHC-HCV (tabela 04).

O sexo masculino, níveis elevados de BT e AFP foram fatores de risco independentes para o CHC em pacientes com hepatite C e atividade inflamatória grave (tabela 05). Enquanto níveis séricos elevados de IL-10 foram fatores de proteção para o CHC-HCV (tabela 05).

Discussão

A presente pesquisa não encontrou associação entre as variantes alélicas, genotípicas e haplotípicas do gene *IL-10* com a gravidade da inflamação e fibrose na hepatite C crônica. Da mesma forma, numa metanálise sobre o polimorfismo no promotor do gene da IL-10 -592 (A/C) em pacientes com infecção pelo HCV não foi evidenciado que o alelo A fosse associado com esta infecção na população mundial. No entanto, quando a meta-análise foi realizada por etnia, envolvendo as apenas populações da Ásia, a associação foi encontrada¹⁷.

Uma outra pesquisa também não encontrou associação da suscetibilidade à infecção pelo HCV com os polimorfismos de várias citocinas (TNF-alfa, IL-10 -1082, -819, -592, IL-6 e IFN-γ) em indivíduos sadios e infectados pelo vírus¹⁸.

A associação do polimorfismo da IL-10 na posição -1082 (G/A) com a atividade necroinflamatória e na -819 (C/T) com o grau de fibrose hepática, foi demonstrada por Abbas et al.,(2005) estudando 40 pacientes com hepatite C crônica e que apresentavam o genótipo 3¹⁹.

A correlação de polimorfismos do gene da IL-10 com HVB e HCV é importante pelo papel desses polimorfismo na progressão da fibrose e cirrose. Foi demonstrado que o polimorfismo deste gene pode afetar a transcrição, tradução e secreção de IL-10 e interferindo na resposta imunológica dos vírus¹⁷.

A divergência dos nossos resultados com a literatura pode ser explicada pelo tamanho amostral uma vez que ao dividirmos a nossa amostra em dois grupos tanto

para os graus de fibrose (F1+F2 e F3+F4) como para os graus de atividade inflamatória (A1, A2+A3). Assim, o número de pacientes em cada subgrupo tornou-se pequeno o que pode ter interferido na confirmação da associação da IL-10 com as lesões na hepatite C crônica.

Nenhuma associação entre o CHC na hepatite C e os polimorfismos do gene da *IL-10* foi encontrada em nosso estudo, assim como na meta-análise conduzida por Yang et al. (2011).²⁰ Por outro lado, também uma meta-análise realizada por Wei et al. (2011) relataram que a presença do alelo da IL-10 na posição -592 (A/C) aumentou o risco para CHC na população asiática, enquanto que os polimorfismos IL-10 nas posições -1082 (G/A) e -819 (T/C) não se relacionaram ao CHC²¹. Assim, os resultados dos estudos acima são discordantes, seja pelo pequeno tamanho amostral ou pela etnicidade unificada.

Em relação aos níveis séricos da IL-10, nossos resultados demonstraram uma associação interessante e significativa dessa citocina na hepatite C crônica e no CHC, os quais apresentaram expressão reduzida à medida que houve progressão da fibrose e da atividade inflamatória até o CHC.

Vários estudos forneceram evidências das propriedades anti-inflamatórias e anti-fibrogênicas da IL-10. Louis et al., (1998)²² demonstraram que a deficiência da IL-10 potencializaria a fibrogenese hepática aumentando a inflamação ou um efeito sobre a regulação da matrix, já Thompson et al., (1998)²³ estudaram camundongos com deficiência da IL-10 que apresentaram fibrose mais severa e maior níveis hepáticos de TNF- α do que outros animais. Estes pesquisadores demonstraram a importância e complexidade do papel da IL-10 na inflamação crônica e fibrogenese.^{22,23}

A ineficiente erradicação do HCV na doença crônica poderia ser responsável para uma continua estimulação da resposta imune celular conduzindo a danos hepáticos e uma inflamação de longa duração aumentaria o risco do desenvolvimento da hepatocarcinogenese. De fato, na hepatite C crônica um tratamento com drogas anti-inflamatórias demonstrou redução desse risco²⁴ e o tratamento com IL-10 recombinante demonstrou uma redução da lesão histológica .²⁵

Foi detectado que os níveis séricos de IL-10 no soro dos pacientes com CHC-HCV apresentaram concentrações mais baixas quando comparados aos pacientes com HCV. Nosso resultados corroboram com os relatados por Hassoba et al., que encontraram níveis indetectáveis de IL-10 em pacientes egípcios com cirrose e CHC relacionada ao HCV.²⁶ No entanto os achados são bastante diferentes de outros estudos, onde os níveis desta citocina estavam elevados em pacientes com CHC ressecáveis e irressecáveis^{27,28}, possivelmente devido a um relativo estado de imunossupressão, como um mecanismo de escape das células tumorais de vigilância do sistema imune do hospedeiro e potencialização de metastase ou a progressão da doença.^{27,28,29,30}

Em conclusão, os níveis séricos da IL-10 foram mais elevados nos pacientes com hepatite C e os SNPs no promotor do gene da IL-10 não influenciaram o grau de atividade inflamatória e fibrose hepática.

Comunicado

Os autores que participaram deste estudo declaram que não têm nada a declarar sobre financiamento ou conflito de interesses com relação a este manuscrito.

Referências

1. Paladino N, Fainboim H, Theiler G et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *J. Virol.* 2006; **80**(18): 9144-50.
2. Shiffman ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; **9**(11): S14-20.
3. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**(3): 215-29.
4. Thorgeirsson S, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 2002; **31**: 339-46.
5. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003; **362**(9399): 1907-17.
6. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J. Hepatol.* 2008; **48**(1): S20-S37.
7. Wang YY, Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Lin CK, Hsu PI. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. *J. Chin. Med. Assoc.* 2003; **66**(10): 593-98.
8. Mondelli MU, Barnaba V. Viral and host immune regulatory mechanisms in hepatitis C virus infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; **18**(4): 327-31.
9. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver. Dis.* 2003; **7**(1): 89-105.
10. Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol.* 2001; **36**(12): 799-808.
11. Cramp M, Carucci P, Rossol S et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut.* 1999; **44**(3): 424-29.
12. Reiser M, Marousis CG, Nelson DR et al. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 1997; **26**(3): 471-78.
13. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005; **42**(5): 1208-36.

14. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996; **24**(2): 289-93.
15. Bouzgarrou N, Hassen E, Gabbouj S *et al*. Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34**: 297–304.
16. Asselah T, Boyer N, Guimont M-C *et al*. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Scand. J. Gastroenterol*. 2009; **44**(6): 1638-43.
17. Lu YL, Wu X, Huang HL, Dai LC. Allele polymorphisms of interleukin-10 and hepatitis B, C virus infection. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2010; **123**(10): 1338-44
18. Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart JF *et al*. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2008; **80**(1):58-64).
19. Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J. Gastroenterol*. 2005; **11**(42): 6656-61.
20. Yang Y, Luo C, Feng R, Bi S. The TNF- α , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2011; **137**(6): 947-52.
21. Wei YG, Liu F, Li B *et al*. Interleukin-10 gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol*. 2011; **17**(34): 3941–47.
22. Louis H, Van Laethem J-L, Quertinmont E *et al*. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; **28**(6):1607-1615.
23. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J *et al*. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 1998; **28**(6):1597-606
24. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y *et al*. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology*, 1999; **29**(4):1124-30.

25. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C : a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; **118**(4):655-60.
26. Hassoba H, Leheta O, Sayed A et al. IL-10 and IL-12p40 in Egyptian patients with HCV-related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; **10** (1): 1-8.
27. Chau GY, Wu CW, Lui WY et al. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* 2000; **231**(4): 552-58.
28. Hattori E, Okumoto K, Adachi T. Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; **27**(4):309-314
29. Kitaoka S, Shiota G, Kawasaki H. Serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and soluble interleukin-2 receptor in chronic liver disease type C. *Hepatogastroenterology*. 2003; **50**(53): 1569-74.
30. Shin HD, Park BL, Kim LH et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human Mol Genet* 2003; **12** (8):901-6

Legenda das figuras

Figura 1. Associação dos níveis séricos de IL-10 entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com fibrose hepática leve e grave. Medianas: fibrose leve (33,60pg/mL), grave (25,10pg/mL) e CHC-HCV (14,15pg/mL).

Figura 2. Associação dos níveis séricos de IL-10 entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com atividade inflamatória leve e grave. Medianas: A1 (34pg/mL), A2 (29.5pg/mL), A3 (25.1pg/mL) e CHC-HCV (14.1pg/mL).

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com hepatite C e fibrose leve ou grave e CHC-HCV segundo a faixa etária, sexo, fatores de risco para infecção, dosagens bioquímicas e genótipos do HCV.

	Fibrose Leve (n=54)	Fibrose Grave (n=65)	CHC-HCV (n=52)	p
Idade (anos)	53.5±11.0	59.7±10.1	61.6±8.8	0.0001
Gênero (M:F) (%)	31:23 (57:43)	24:41 (37:63)	34:18 (65:35)	0.005
Fontes de infecção				
Seringa de vidro	44 (81.4%)	48 (73.8%)	45 (86.5%)	0.22
Cirurgia	37 (68.5%)	41 (63.0%)	37 (71.1%)	0.63
Hemotransfusão	17 (31.4%)	34 (52.3%)	19 (36.5%)	0.05
UDI	9 (16.6%)	4 (6.1%)	4 (7.6%)	0.13
Tatuagem	3 (5.5%)	1 (1.5%)	0	0.14
Fatores de risco				
Consumo de álcool	8 (14.8%)	3 (4.4%)	7 (13.4%)	0.13
Tabagismo	4 (7.4%)	2 (2.9%)	4 (7.6%)	0.48
Diabetes mellitus tipo II	3 (5.5%)	11 (16.9%)	14 (26.9%)	0.01
IMC	26.9±6.4	26.4±4.6	26.0±3.9	0.69
Dosagens bioquímicas				
AST (UI/mL)	50 (20-286)	76 (24-438)	94 (18-257)	<0.0001
ALT (UI/mL)	63 (12-271)	79 (25-458)	74 (22-307)	0.09
GGT (UI/mL)	67 (11-588)	106 (23-849)	179 (52-778)	<0.0001
FA (UI/mL)	69 (16-392)	92 (23-418)	144 (61-354)	<0.0001
BT (mg/dL)	0.69 (0.2-4.0)	0.96 (0.3-4.0)	1.40 (0.5-7.2)	<0.0001
AFP (ng/mL)	2.8 (0.5-45.1)	6.5 (0.8-112.0)	87.4 (1.9-100000)	<0.0001
Contagem de plaquetas	193500 (55000-391000)	140000 (10800-252000)	106000 (13000-314000)	<0.0001
Genótipos do HCV				
1	35 (64.8%)	49 (75.3%)	37 (71.1%)	0.44*
2	1 (1.8%)	0	1 (1.9%)	
3	18 (33.4%)	16 (24.7%)	14 (27.0%)	

CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, UDI: usuário de droga injetável, IMC: índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, GGT: gamaglutamiltranspeptidase, FA: fosfatase alcalina, BT: bilirrubina total, AFP: alfa-fetoproteína.

*Genótipo 1 vs. Não-1.

Variáveis contínuas com distribuição normal estão representadas como média ± desvio padrão. As demais estão representadas como mediana (intervalo).

Tabela 2. Distribuição alélica e genotípica dos alelos *IL-10* -1082, *IL-10* -819, *IL-10* -592 e seus níveis séricos em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.

	Leve (n=54)	Grave (n=65)	CHC-HCV (n=52)	<i>p</i>
IL-10 -1082				
Alelos				
A	71 (65.7%)	82 (63.0%)	67 (64.4%)	0.9
G	37 (34.3%)	48 (37.0%)	37 (35.6%)	
Genótipos				
AA	22 (40.7%)	25 (38.4%)	22 (42.3%)	0.9
GA	27 (50.0%)	32 (49.2%)	23 (44.2%)	
GG	5 (9.3%)	8 (12.4%)	7 (13.5%)	
IL-10 -819				
Alelos				
C	73 (67.5%)	90 (69.2%)	67 (64.4%)	0.7
T	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.5%)	
Genótipos				
CC	25 (46.2%)	31 (47.6%)	21 (40.3%)	0.7
CT	23 (42.5%)	28 (43.0%)	25 (48.0%)	
TT	6 (11.3%)	6 (9.4%)	6 (11.7%)	
IL-10 -592				
Alelos				
C	73 (67.5%)	90 (69.2%)	67 (64.4%)	0.7
A	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.6%)	
Genótipos				
CC	25 (46.2%)	31 (47.6%)	21 (40.3%)	0.7
CA	23 (42.5%)	28 (43.0%)	25 (48.0%)	
AA	6 (11.3%)	6 (9.4%)	6 (11.7%)	

HCC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, IL-10: interleucina 10.

Tabela 3. Distribuição dos haplótipos e diplótipos do SNP no promotor do gene IL-10 de acordo com a gravidade da fibrose em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.

	Leve	Grave	CHC-HCV	Leve vs	Grave vs
	(n=54)	(n=65)	(n=52)	CHC	CHC
				<i>p</i>	<i>p</i>
Haplótipo					
GCC	37 (34.2%)	48 (36.9%)	37 (35.5%)	0.8	0.8
ACC	36 (33.3%)	42 (32.3%)	30 (28.8%)	0.4	0.5
ATA	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.7%)	0.6	0.4
Diplótipo					
GCC/GCC	5 (9.2%)	8 (12.3%)	7 (13.4%)	0.5	0.9
GCC/ACC	15 (27.7%)	16 (24.6%)	7 (13.4%)	0.09	0.1
GCC/ATA	12 (22.2%)	16 (24.6%)	16 (30.7%)	0.3	0.5
ACC/ACC	5 (9.2%)	7 (10.7%)	7 (13.4%)	0.5	0.7
ACC/ATA	11 (20.3%)	12 (18.4%)	9 (17.3%)	0.8	0.9
ATA/ATA	6 (11.4%)	6 (9.4%)	6 (11.8%)	0.9	0.7

CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C.

Tabela 4. Análise multivariada dos fatores de risco associados à gravidade da fibrose hepática em pacientes com hepatite C com fibrose leve e grave e CHC-HCV.

	Fibrose leve vs. CHC		Fibrose grave vs. CHC	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Gênero masculino	2.27 (0.39-14.3)	0.363	8.33 (1.75-50.0)	0.008
Plaquetopenia	0.98 (0.96-0.99)	0.002	0.99 (0.99-1.01)	0.219
GGT (UI/mL)	1.01 (1.02-1.01)	0.035	1.01 (1.00-1.01)	0.239
BT (mg/dL)	5.26 (1.64-20.0)	0.006	2.77 (1.09-7.14)	0.034
AFP (ng/mL)	1.10 (1.04-1.16)	0.002	1.07 (1.04-1.11)	<0.0001
Níveis séricos elevados de IL-10	0.87 (0.79-0.94)	0.001	0.88 (0.82-0.96)	0.002

CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, OR: Odds Ratio, 95% IC: intervalo de confiança de 95%, GGT: gamaglutamiltranspeptidase, BT: bilirrubina total, AFP: alfa-fetoproteína, IL-10: interleucina 10.

Tabela 5. Análise multivariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória causada pelo HCV e CHC.

	AI A1 vs. CHC		AI A2/A3 vs. CHC	
	OR (IC 95%)	p	OR (IC 95%)	p
Gênero masculino	2.22 (0.06-3.09)	0.420	7.14 (1.51-33.3)	0.013
GGT (UI/mL)	1.02 (0.97-0.99)	0.024	1.01 (1.00-1.01)	0.193
BT (mg/dL)	4.54 (0.05-0.89)	0.034	2.94 (1.15-7.69)	0.026
AFP (ng/mL)	1.17 (0.73-0.99)	0.049	1.07 (1.04-1.11)	<0.0001
Plaquetopenia	0.98 (1.00-1.04)	0.008	0.99 (0.98-1.01)	0.097
Níveis séricos elevados	0.88 (1.04-1.25)	0.003	0.88 (0.82-0.96)	0.002

de IL-10

AI: Atividade inflamatória, A1: atividade inflamatória grau 1, A2: atividade inflamatória grau 2, A3: atividade inflamatória grau 3, CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, OR: Odds Ratio, 95% IC: intervalo de confiança de 95%, GGT: gamaglutamiltranspeptidase, BT: bilirrubina total, AFP: alfa-fetoproteína, IL-10: interleucina 10.

Figura 1

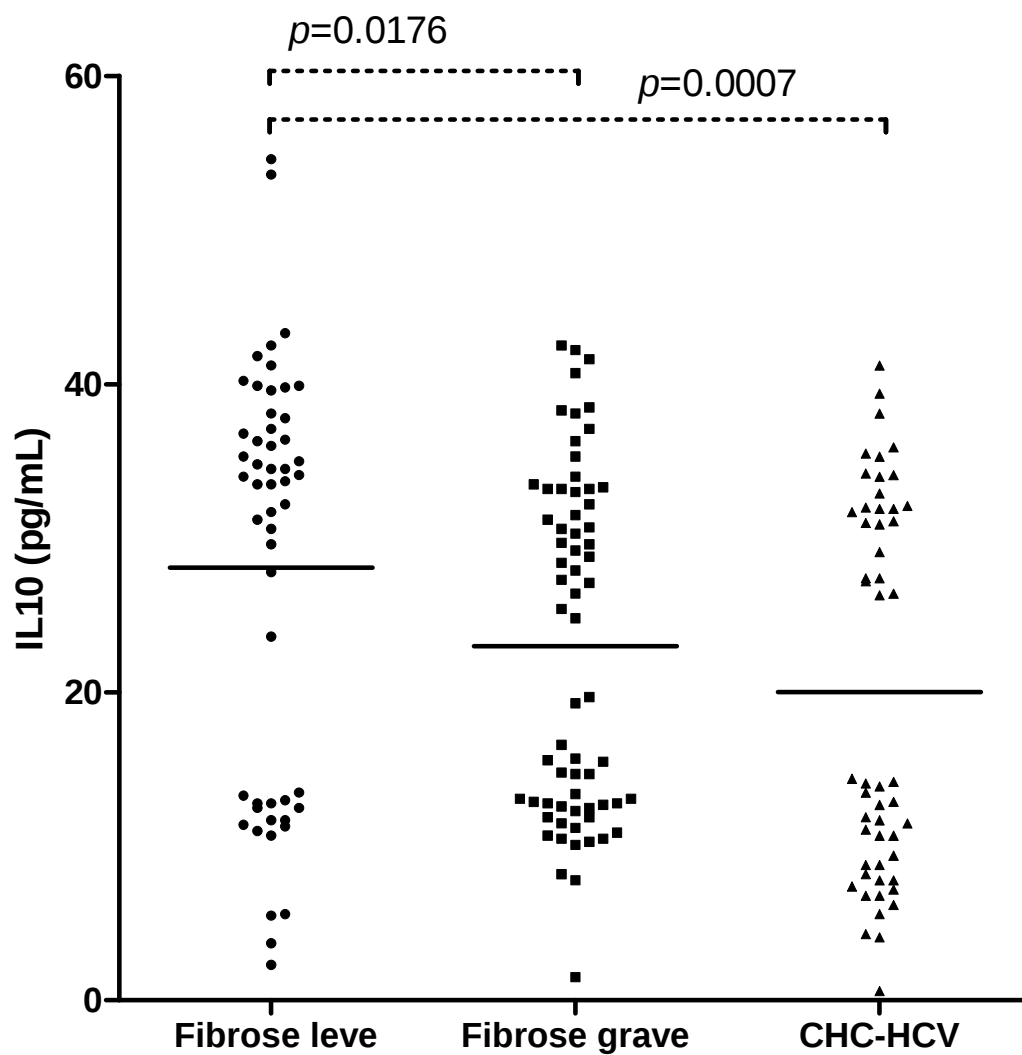
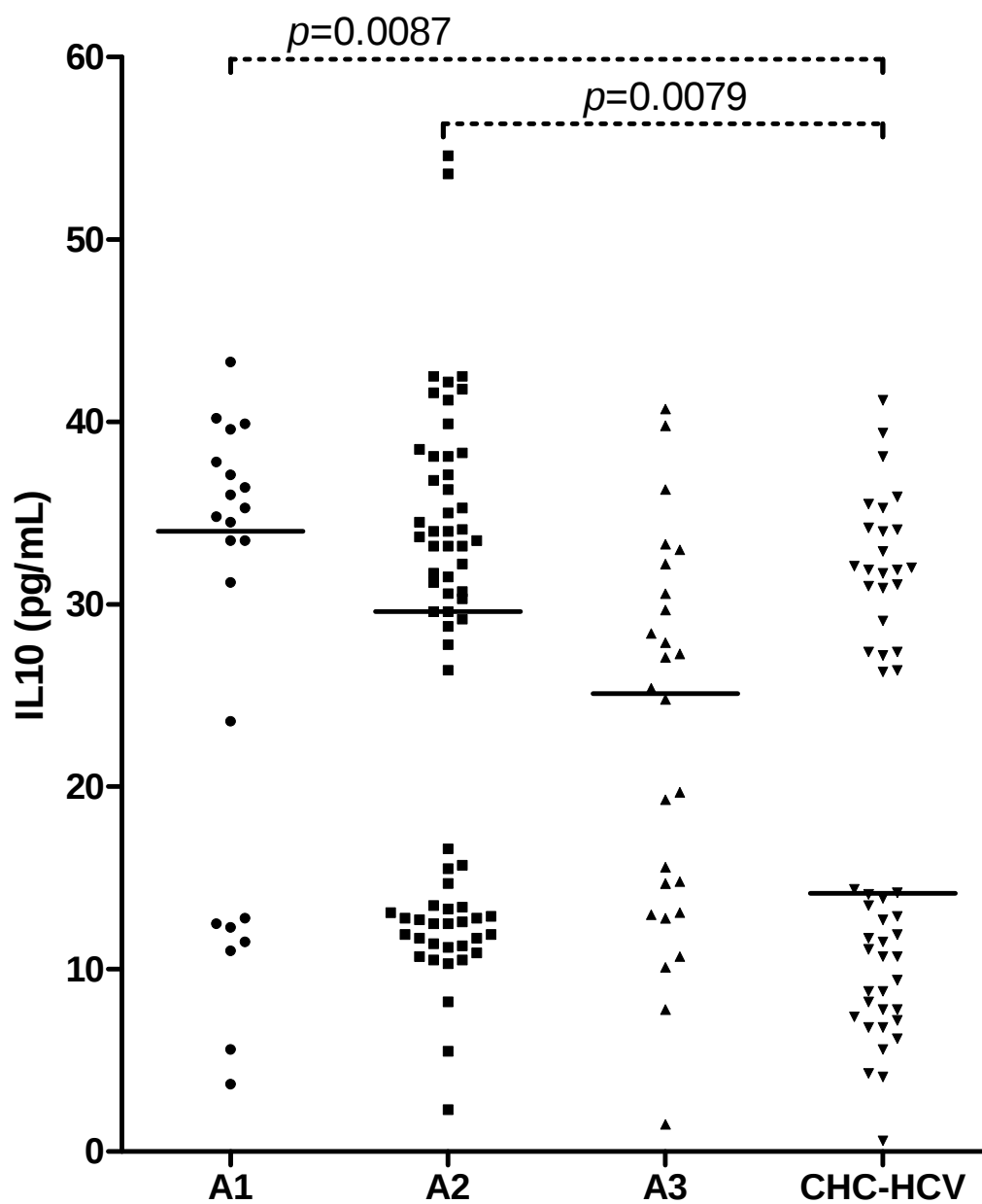


Figura 2



6.2 ARTIGO 2

Artigo submetido à Revista *Journal of Viral Hepatitis* (Apêndice E)

Relação entre o polimorfismo de único nucleotídeo TNF- α -308 (G/A) e a histologia hepática em pacientes com hepatite C e carcinoma hepatocelular[♥]

Polimorfismo TNF- α -308 (G/A) e histologia hepática

Aroucha, D.C.B.L.^{1,5,7,8}; Silva, J.L.A.^{1,2}; Carmo, R.F.⁶, Vasconcelos, L.R.S.^{6,8} Moura, P.⁶, Cavalcanti, M.S.M.⁶, Muniz, M.T.C.⁶; Aroucha, M.L.⁴ Siqueira, E.R.F.^{7,8}; Cahú, G.G.O.M.², Pereira, L.M.B.^{7,8}; Coêlho, M.R.C.D.^{1,2,3}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ²Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil;

³Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Recife, Brasil; ⁴Departamento de Medicina Materno Infantil, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ⁵Núcleo de Atenção ao Idoso, Centro de Ciências da Saúde, UFPE, Recife, Brasil; ⁶Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brasil; ⁷Departamento de Gastroenterologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Pernambuco (UPE), Recife, Brasil; ⁸Instituto do Fígado de Pernambuco (IFPE), Recife, Brasil.

Endereço para correspondência:

Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Rua Clóvis Beviláqua, 50 - Aptº 101

Madalena 50710-330 - Recife, PE, Brasil.

Fone/fax: (81) 3082-5111

E-mail: daysearoucha@yahoo.com.br

[♥]Artigo Original submetido para publicação e formatado de acordo com as normas do *Journal of Viral Hepatitis*. <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>. (ANEXO C)

RESUMO

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória que pode interferir no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática, persistência viral e resposta terapêutica na hepatite C. O polimorfismo de único nucleotídeo (SNP) TNF- α -308 (G/A) no promotor do gene do TNF- α pode influenciar seus níveis séricos e pode exercer papel na patogênese da fibrose hepática causada pelo vírus da hepatite C (HCV). O objetivo deste estudo foi determinar os níveis séricos do TNF- α e o SNP TNF- α -308 (G/A) e verificar suas associações com a histologia hepática em 174 pacientes com hepatite C, sendo 54 com fibrose leve e 65 com fibrose grave, além de 52 com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV (CHC-HCV). Foi utilizada a PCR em tempo real para a investigação do SNP TNF- α -308 (G/A) e o ensaio imunoenzimático para dosagem sérica do TNF- α . A concentração sérica de TNF- α foi mais elevada nos pacientes com CHC-HCV quando comparada aos pacientes com hepatite C com fibrose leve ($p < 0,0001$), fibrose grave ($p = 0,004$), atividade inflamatória leve ($p = 0,0004$) e atividade inflamatória grave ($p < 0,001$). As frequências do alelo -308 G e do genótipo GG do SNP TNF- α -308 (G/A) foram significativamente maiores nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C que apresentavam fibrose leve e atividade inflamatória leve. Em conclusão, constatamos que pacientes com CHC-HCV apresentaram elevada concentração sérica do TNF- α e maior frequência do alelo G e do genótipo GG do SNP TNF- α -308 (G/A).

Palavras-chaves: Atividade inflamatória, carcinoma hepatocelular, fator de necrose tumoral alfa, fibrose hepática, hepatite C, polimorfismo de único nucleotídeo.

Introdução

Cento e setenta milhões de pessoas no mundo estão cronicamente infectadas com o vírus da hepatite C (HCV) [1]. Cerca de 60-80% dos pacientes com hepatite C crônica, podem evoluir para cirrose e destes 20% para o carcinoma hepatocelular (CHC), cuja incidência mundial é de 2% a 8% ao ano [2-4]. O CHC é o quinto tipo de tumor mais freqüente no mundo e quando causado pelo HCV é uma das indicações para o transplante hepático [5].

As citocinas estão entre os mecanismos de defesa do hospedeiro contra a ação do HCV, podendo induzir a resposta inflamatória com lesão hepática [6] devido a respostas imunes ou ação citopática do vírus. Células T citotóxicas e citocinas podem ser responsáveis por grande parte do dano que ocorre no fígado de pacientes infectados pelo HCV [7].

As lesões hepáticas na hepatite C crônica se caracterizam por infiltração linfóide portal, necrose focal em pontes e lesões lobulares degenerativas, provavelmente devido à resposta imune local [8,9]. Estes danos podem ser influenciados pela expressão local de citocinas da resposta T-helper (Th1), como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferindo no desenvolvimento e progressão da fibrose hepática, persistência viral e resposta terapêutica [10,11].

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ativados e em menor quantidade por outros tipos de células [12]. Vários polimorfismos genéticos do TNF- α têm sido descritos. O polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) TNF- α -308 G/A no promotor do gene do TNF- α apresenta duas formas alélicas. A presença de guanina (G) define a forma mais comum, o alelo TNF1 e, a presença de adenina (A) define a variante menos comum, o alelo TNF2 [13]. O SNP TNF- α -308 (G/A) tem sido associado à inflamação grave, doenças autoimunes, infecciosas e malignas [14].

Devido à ação do TNF- α como promotor de tumores, o objetivo deste estudo foi realizar a sua dosagem sérica e avaliar as freqüências gênicas e genotípicas do SNP TNF- α -308 G/A em pacientes com hepatite C e com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV.

Materiais e métodos

Seleção dos pacientes

Este estudo é do tipo corte transversal com comparação de grupos, onde foram avaliados 119 pacientes com hepatite C, sendo 54 com fibrose leve e 65 com fibrose avançada, além de 52 pacientes com carcinoma hepatocelular causado pelo HCV (CHC-HCV) atendidos no Serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, da Universidade de Pernambuco e do Instituto do Fígado de Pernambuco no período de Janeiro 2009 a Março de 2011.

Os pacientes foram submetidos a dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltranspeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total (BT), glicemia, alfa-fetoproteína (AFP), contagem de plaquetas e sorologia para HIV (anti-HIV), hepatite B (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc total) e hepatite C (anti-HCV). Nos casos com anti-HCV positivo, foram realizados a pesquisa do HCV-RNA e genotipagem viral.

O diagnóstico do carcinoma hepatocelular pelo HCV foi definido por exames de ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, arteriografia hepática e biópsia do tumor, seguindo os critérios BCLC[15].

Os dados da biópsia hepática dos pacientes com hepatite C foram coletados em prontuários médicos e classificados segundo o Score METAVIR [16]. Foi considerada fibrose leve com gradação de F1 a F2 e fibrose avançada, caso com gradação de F3 a F4 [17]. Com relação à atividade inflamatória, foi considerada caso leve com gradação igual a A1 e atividade inflamatória grave, caso com gradação de A2 a A3 [18].

Foram excluídos pacientes com a positividade para o HBsAg e HIV, além daqueles em tratamento antiviral para hepatite C.

O estudo foi aprovado pelo comitê em de pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário (HUOC) da Universidade de Pernambuco sob o protocolo número 144/2008.

Coleta de dados

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, os dados sobre idade, sexo, fontes de infecção, consumo de álcool (homens>40g/dia;

mulheres > 20g/dia), tabagismo, diabetes mellitus tipo II e índice de massa corpórea foram coletados por meio de questionário aplicado por único pesquisador.

Dosagem sérica do TNF- α

Foi coletado por punção venosa um tubo de 5,0 mL de sangue periférico sem anticoagulante de cada paciente. Os soros foram obtidos por centrifugação e armazenados a -20°C até a realização da dosagem. A dosagem sérica do TNF- α foi realizada pelo método imunoenzimático utilizando o Quantikine Human TNF- α (R&D System, Minneapolis, MN, USA), executado de acordo com as instruções do fabricante.

Extração do DNA genômico

Utilizando-se o Wizard Genomic Blood DNA Isolation Kit (Promega, UK) de acordo com as instruções do fabricante, foi extraído o DNA genômico de uma amostra de 5,0 mL de sangue periférico coletado por punção venosa com anticoagulante (EDTA) de cada paciente. O DNA extraído foi armazenado a -80°C até a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

Polimorfismo de um único nucleotídeo no promotor do gene do TNF- α

Para análise do SNP TNF- α -308 (G/A) foi utilizando o *TaqMan*® SNP Genotyping Assays por PCR em tempo real com ID: C__7514879_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com instruções do fabricante.

Análise estatística

Os testes de Mann-Whitney or Kruskal-Wallis foram empregados, quando apropriado, para comparação das variáveis quantitativas entre os pacientes com hepatite C e com CHC-HCV. O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para comparação das variáveis categóricas, sendo considerado significativo um $p < 0,05$.

O programa GraphPad Prism (versão 5.0, San Diego, USA) foi utilizado para essas análises e construção das figuras. Para verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Switzerland) e para a análise multivariada foi aplicado o método *Stepwise* com *backward* utilizando o software SPSS v.17 (Statistical Package for Social Science, Chicago, IL).

Resultados

Características clínicas

Houve maior frequência do sexo masculino ($p=0.005$) e idade média mais elevada ($p=0.0001$) nos pacientes com CHC-HCV. Quanto às características clínicas e laboratoriais, foi identificada maior frequência de diabetes mellitus tipo II ($p=0.01$), maiores níveis séricos de aspartato aminotransferase, gamaglutamiltranspeptidase, fosfatase alcalina, bilirrubina total, alfa-fetoproteína ($p<0.0001$) e plaquetopenia ($p<0.0001$) nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C com fibrose leve e/ou avançada (tabela 1).

Níveis séricos do TNF- α

Os pacientes com CHC-HCV apresentaram níveis séricos do TNF- α em maior concentração quando comparados aos pacientes com hepatite C com fibrose leve ($p<0.0001$) e grave ($p<0.004$) (figura 1).

Com relação à atividade inflamatória observaram-se maiores níveis séricos do TNF- α nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C com atividade inflamatória leve ($p=0.0004$) e com os indivíduos com atividade inflamatória grave ($p<0.001$) (figura 2).

Polimorfismo de um único nucleotídeo no promotor do gene do TNF- α

A distribuição das frequências genotípicas encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos analisados. As frequências do alelo -308 G ($p=0.007$) e do genótipo GG do SNP TNF- α -308 (G/A) ($p=0.014$) foram significativamente maiores nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C que apresentavam fibrose leve (tabela 2).

Da mesma forma, as frequências do alelo -308 G ($p=0.011$) e do genótipo GG ($p=0.005$) do SNP TNF- α -308 (G/A) foram significativamente maiores nos pacientes com CHC-HCV quando comparados aos pacientes com hepatite C e atividade inflamatória leve (tabela 2).

Análise multivariada dos fatores de risco associados à fibrose hepática

A presença de *diabetes mellitus* tipo II ($p=0,049$), maior idade média ($p<0.0001$) e níveis séricos elevados do TNF- α ($p=0,003$) foram fatores de risco

independentes para o CHC-HCV quando comparados pacientes com hepatite C e fibrose leve (tabela 3).

Com relação aos pacientes com hepatite C e fibrose grave, o sexo masculino ($p=0,001$) e níveis séricos elevados do TNF- α ($p=0,002$) foram fatores de risco independentes para o CHC-HCV (tabela 3).

Análise multivariada dos fatores de risco associados à atividade inflamatória

A presença do genótipo GG do SNP TNF- α -308 (G/A) foi fator de risco independente na atividade inflamatória grave dos pacientes com hepatite C quando comparados àqueles com a atividade leve ($p=0,034$) (tabela 4).

A trombocitopenia foi fator de proteção para a atividade inflamatória grave ($p=0,013$) e para o CHC-HCV ($p<0,0001$). Os níveis séricos elevados de AFP ($p=0,046$) e FA ($p=0,010$) foram fator de risco independente para o CHC-HCV em pacientes com hepatite C e atividade inflamatória leve (tabela 4).

Discussão

A pesquisa demonstrou nos pacientes com CHC-HCV associação do polimorfismo do TNF308.1(GG) com grau de fibrose e atividade inflamatória leve comparando com portadores do HCV. Além disso, constituiu fator de risco independente para pacientes com atividade inflamatória grave e fibrose grave. Estes achados apoiam a idéia que as variantes alélicas e genotípicas representam fatores genéticos importantes para a gravidade da infecção pelo HCV e a susceptibilidade ao desenvolvimento do CHC.

Os nosso resultado está de acordo com o relatado por Taalat et al (19). No entanto, outros estudos encontraram o polimorfismo do TNF-308.2 como sendo o mais frequente em pacientes com cirrose e CHC. Jeng et al (13) demonstraram que o polimorfismo do TNF-308 2 foi associado com a fibrose hepática mais grave e constituiu fator de risco independente para o CHC, embora o trabalho tenha sido realizado em Taiwan e com pacientes portadores do HCV e HVB.

Em relação ao desenvolvimento da cirrose nos pacientes com hepatite C, Yee et al. (20) demonstraram um risco de 5,1 vezes maior naqueles com o polimorfismo do TNF -308.A. Este polimorfismo também foi encontrado em pacientes portadores do CHC com HCV E HVB.

A identificação do polimorfismo do TNF-308.GG em nosso estudo poderia ser explicada em parte pelo aspectos étnicos, embora essa afirmação poderia ser confirmada em estudos posteriores com um maior número de pacientes e numa população de indivíduos saudáveis.

O dano hepatocelular provoca uma resposta inflamatória e ativação das células de Kuppfer e hepáticas estreladas, que amplificam o processo inflamatório e dentre os fatores envolvidos estão as citocinas antiinflamatórias e as pró-inflamatórias como o TNF- α (8)

O resultado de uma maior concentração dos níveis séricos do TNF- α nos pacientes de CHC-HCV comparados ao grupo de hepatite C com fibrose e atividade inflamatória leve e grave, foi também descrito por Taalat RM, 2010, que observaram uma gradual elevação dos níveis do TNF- α nos pacientes infectados com o HCV em diferentes estágios da doença e no CHC. Outras pesquisas relataram níveis elevados do TNF- α em pacientes com cirrose e hepatite crônica ou aguda e comparando com indivíduos saudáveis (21,22,23)

Assim, o aumento do risco de desenvolver o CHC está associado aos níveis elevados do TNF- α e poderia esta relacionado com a angiogênese no local da inflamação e a metástase (24)

Concluimos que o aumento dos níveis de TNF- α com a progressão gradual da fibrose até a cirrose, em pacientes com doenças hepáticas crônicas associadas ao HCV é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer.

Comunicado

Os autores que participaram deste estudo declaram que não têm nada a declarar sobre financiamento ou conflito de interesses com relação a este manuscrito.

Referências

1. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010; **14**(1): 1-21.
2. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update . *Hepatology* 2011; **53**: 1020-1022.
3. Ferenci P, Fried M, Labrecque D et al. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Clin Gastroenterol* 2010; **44**(4): 239-245.
4. Shiffman ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; **9**(11): S14-20.
5. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; **19**(1): 3-23.
6. Koziel, MJ. Cellular response against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2005; **41**(1): S25-31.
7. Pawlotski JM. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *J Viral Hepat* 1998; **5**(1): 3-8.
8. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; **37**(3): 493-503.
9. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; **12**(2): 96-102.
10. Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M et al. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; **36**(2): 144-150.

11. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; **134**(6): 1641-1654.
12. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; **8**(4): 445-454.
13. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY et al. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 2007; **9**(11): 987-992.
14. Hajeer AH and Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; **50**, 216 – 228.
15. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005; **42**(5): 1208-1236.
16. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; **24**(2): 289-293.
17. Bouzgarrou N, Hassen E, Gabbouj S et al. Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha -308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34**(4-5): 297-304.
18. Asselah T, Boyer N, Guimont M-C et al. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2009; **44**(6): 1638-1643.
19. Talaat RM, Esmail AA, Elwakil R, Gurgis AA, Nasr MI. Tumor necrosis factor-alpha – 308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients. *Chin J Cancer* 2012; **31**(1): 29-25.
20. Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, Van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000; **1**(6): 386-390.
21. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**(3): 458-463.
22. Sato T, Asanuma Y, Masaki Y et al. Changes in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 production following liver surgery on cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 1996; **43**(11): 1148-1153.

23. Talaat RM. Soluble angiogenesis factor in sera of Egyptian patients with hepatitis C virus infection: correlation with disease severity. *Viral Immunol*, 2010, **23**(2):151-157
24. Akkis H, Bayram S, Bekar A et al. G-308A TNF- α polymorphism is associated risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: Case-control study. *Cancer Epidemiology* 2009; **33**(3-4): 261-4.

Tabela 1. Distribuição dos pacientes com fibrose leve, grave e CHC segundo a faixa etária, sexo, fatores de risco para infecção, dosagens bioquímicas e moleculares.

	Fibrose Leve (n=54)	Fibrose Grave (n=65)	CHC-HCV (n=52)	p
Idade (anos)	53.5±11.0	59.7±10.1	61.6±8.8	0.0001
Gênero (M:F) (%)	31:23 (57:43)	24:41 (37:63)	34:18 (65:35)	0.005
Fontes de infecção				
Seringa de vidro	44 (81.4%)	48 (73.8%)	45 (86.5%)	0.22
Cirurgia	37 (68.5%)	41 (63.0%)	37 (71.1%)	0.63
Hemotransfusão	17 (31.4%)	34 (52.3%)	19 (36.5%)	0.05
UDI	9 (16.6%)	4 (6.1%)	4 (7.6%)	0.13
Tatuagem	3 (5.5%)	1 (1.5%)	0	0.14
Fatores de risco				
Consumo de álcool	8 (14.8%)	3 (4.4%)	7 (13.4%)	0.13
Tabagismo	4 (7.4%)	2 (2.9%)	4 (7.6%)	0.48
<i>Diabetes mellitus</i>	3 (5.5%)	11 (16.9%)	14 (26.9%)	0.01
tipo II				
IMC	26.9±6.4	26.4±4.6	26.0±3.9	0.69
Dosagens				
Bioquímicas				
AST (UI/mL)	50 (20-286)	76 (24-438)	94 (18-257)	<0.0001
ALT (UI/mL)	63 (12-271)	79 (25-458)	74 (22-307)	0.09
GGT (UI/mL)	67 (11-588)	106 (23-849)	179 (52-778)	<0.0001
FA (UI/mL)	69 (16-392)	92 (23-418)	144 (61-354)	<0.0001
BT (mg/dL)	0.69 (0.2-4.0)	0.96 (0.3-4.0)	1.40 (0.5-7.2)	<0.0001
AFP (ng/mL)	2.8 (0.5-45.1)	6.5 (0.8-112.0)	87.4 (1.9-100000)	<0.0001
Plaquetas	193500 (55000-391000)	140000 (10800-252000)	106000 (13000-314000)	<0.0001
Genótipos do HCV				
1	35 (64.8%)	49 (75.3%)	37 (71.1%)	0.44 ¹
2	1 (1.8%)	0	1 (1.9%)	
3	18 (33.4%)	16 (24.7%)	14 (27.0%)	

CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, UDI: usuário de droga injetável, IMC: índice de massa corporal; ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase, GGT: gamaglutamiltranspeptidase, FA: fosfatase alcalina, BT: bilirrubina total, AFP: alfa-fetoproteína.

¹Genótipo 1 vs. Não-1. Variáveis contínuas com distribuição normal estão representadas como média ± desvio padrão. As demais estão representadas como mediana (intervalo).

Tabela 2. Distribuição (painel A) e associação (painel B) das frequências alélicas e genotípicas do SNP TNF- α -308 (G/A) em pacientes com hepatite C e CHC-HCV.

PAINEL A	Fibrose leve (n=54)	Fibrose grave (n=65)	AI A1 (n=23)	AI A2/A3 (n=96)	CHC-HCV (n=52)
Alelos					
G	83 (76.8%)	119 (91.5%)	31 (67.3%)	171 (89.0%)	95 (91.3%)
A	25 (23.2%)	11 (8.5%)	15 (32.7%)	21 (11.0%)	9 (8.7%)
Genótipos					
GG	32 (59.2%)	55 (84.6%)	10 (43.4%)	77 (80.2%)	43 (82.6%)
GA	19 (35.1%)	9 (13.8%)	11 (47.8%)	17 (17.7%)	9 (17.4%)
AA	3 (5.7%)	1 (1.6%)	2 (8.8%)	2 (2.1%)	0
PAINEL B					
Análise estatística			OR	IC	p
Fibrose leve vs HCV-CHC	Alelo (G vs A)		3.18	1.34-8.16	0.007
	Genótipo (GG vs GA+AA)		3.28	1.34-8.16	0.014
Fibrose grave vs HCV-CHC	Alelo (G vs A)		0.97	0.38-2.45	0.95
	Genótipo (GG vs GA+AA)		0.86	0.32-2.32	0.80
A1 vs HCV-CHC	Alelo (G vs A)		3.75	1.26-11.17	0.011
	Genótipo (GG vs GA+AA)		5.26	1.49-18.58	0.005
A2/A3 vs HCV-CHC	Alelo (G vs A)		1.29	0.57-2.94	0.68
	Genótipo (GG vs GA+AA)		1.17	0.49-2.83	0.82

AI: Atividade inflamatória, A1: atividade inflamatória grau 1, A2: atividade inflamatória grau 2, A3: atividade inflamatória grau 3, CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, OR: Odds Ratio, 95% IC: intervalo de confiança de 95%.

Tabela 3. Análise multivariada dos fatores associados à progressão da fibrose em pacientes com hepatite C e CHC-HCV.

Variáveis	Fibrose leve vs. CHC-HCV		Fibrose grave vs. CHC-HCV	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	P
<i>Diabetes mellitus</i> tipo II	5.26 (1.01-33.3)	0.049	1.64 (0.59-4.54)	0.342
Idade	1.09 (1.05-1.16)	<0.0001	1.04 (1.00-1.09)	0.104
Gênero masculino	2.56 (0.96-7.14)	0.061	4.76 (1.96-11. 1)	0.001
Níveis séricos elevados de TNF- α	1.07 (1.03-1.12)	0.003	1.06 (1.03-1.01)	0.002

CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, OR: Odds Ratio, 95% IC: intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4. Análise multivariada dos fatores associados à progressão da atividade inflamatória em pacientes com hepatite C e CHC-HCV.

Variáveis	A1 vs. A2/A3		A1 vs. CHC-HCV	
	OR (95% IC)	p	OR (95% IC)	p
Genótipo GG do	4.11 (1.11-15.21)	0.034	2.43 (0.31-18.97)	0.397
TNF- α				
AFP (ng/mL)	1.16 (0.94-1.43)	0.160	1.24 (1.00-1.54)	0.046
BT (mg/dL)	1.08 (0.31-3.70)	0.902	2.46 (0.62-9.71)	0.198
AST (UI/mL)	1.00 (0.98-1.02)	0.809	0.99 (0.97-1.01)	0.390
Gênero masculino	0.49 (0.13-1.84)	0.291	3.62 (0.48-27.11)	0.211
FA (UI/mL)	1.00 (0.99-1.01)	0.291	1.01 (1.00-1.03)	0.010
Plaquetopenia	0.98 (0.97-0.99)	0.013	0.96 (0.94-0.98)	<0.0001

A1: atividade inflamatória grau 1, A2: atividade inflamatória grau 2, A3: atividade inflamatória grau 3, CHC-HCV: carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, AST: aspartato aminotransferase, FA: fosfatase alcalina, BT: bilirrubina total, AFP: alfa-fetoproteína, OR: Odds Ratio, 95% IC: intervalo de confiança de 95%.

Legenda das figuras

Figura 1. Associação dos níveis séricos do TNF- α entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com fibrose hepática leve e grave. Medianas: fibrose leve (11 pg/mL), fibrose grave (11 pg/mL) e HCC-HCV (20.4 pg/mL).

Figura 2. Associação dos níveis séricos do TNF- α entre pacientes com CHC-HCV e pacientes com HCV com atividade inflamatória leve e grave. Medianas: atividade inflamatória A1(9.01 pg/mL), A2 (11.4 pg/mL), A3 (15.8 pg/mL) e CHC-HCV (20.4 pg/mL).

Figura 1

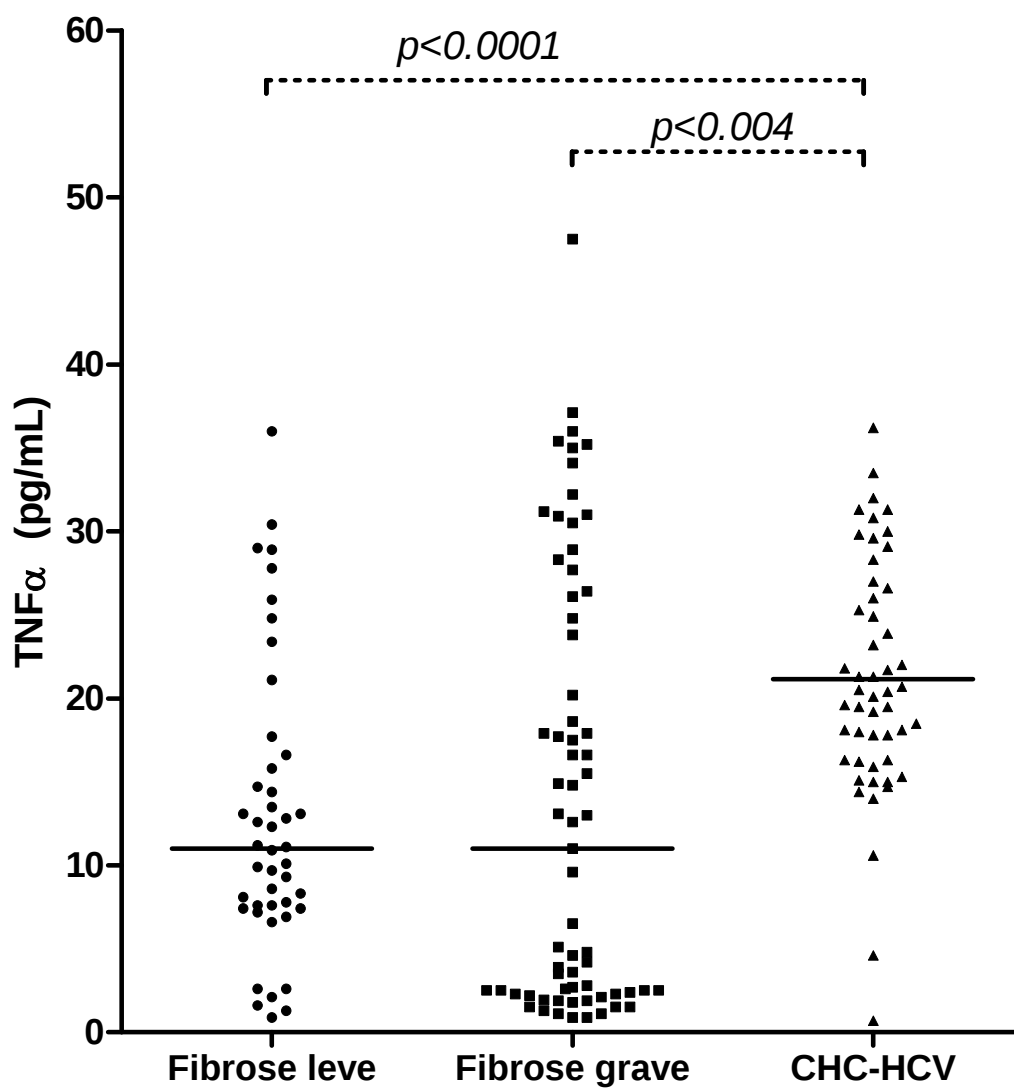
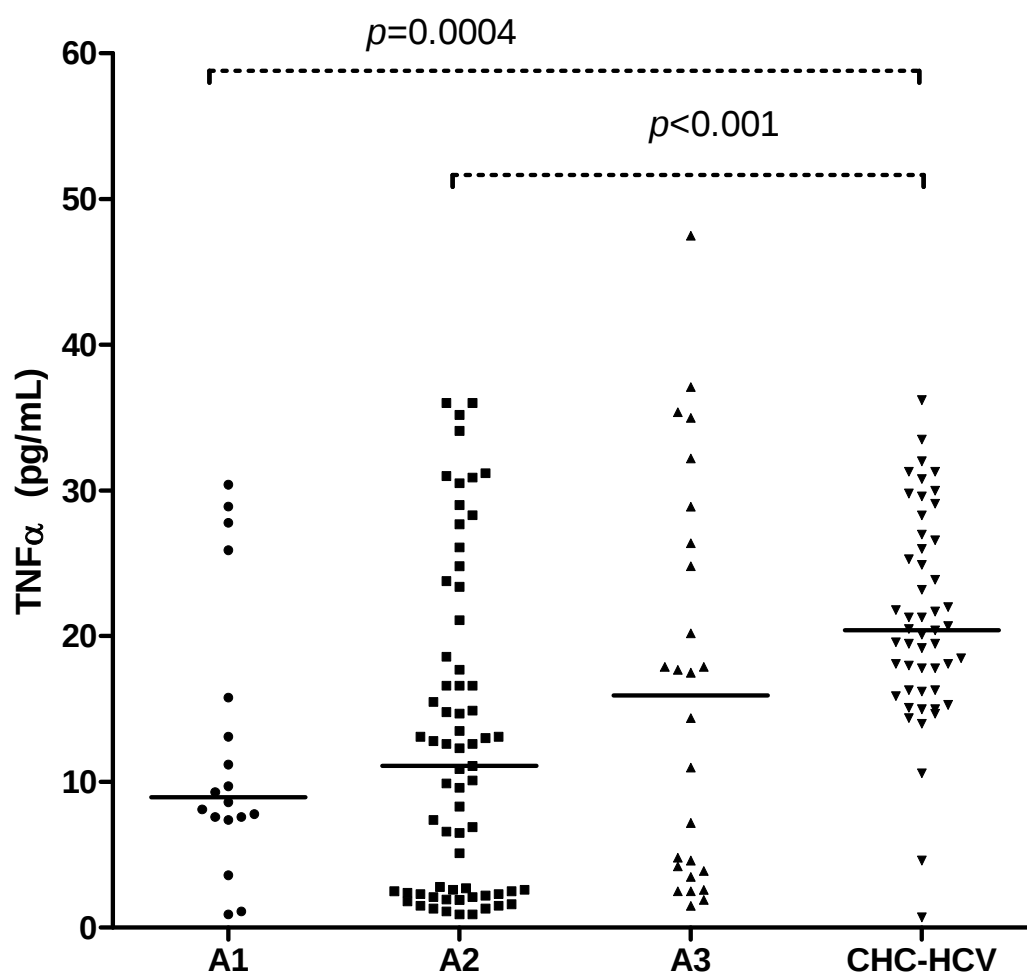


Figura 2



7. CONCLUSÕES DA TESE

- Não houve diferença significativa entre as frequências alélicas e genotípicas ou entre haplótipos e diplótipos dos polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) no promotor do gene da IL-10 nas posições -1082, -819 e -592 nos grupos avaliados;
- Não foi identificada associação dos SNPs investigados no promotor do gene da IL-10 com o grau de atividade inflamatória e fibrose hepática;
- A presença do genótipo GG do SNP TNF- α -308 (G/A) foi fator de risco independente para atividade inflamatória grave dos pacientes com hepatite C quando comparados àqueles com a atividade leve;
- Os níveis séricos elevados da IL-10 foram mais elevados nos pacientes com hepatite C e fibrose leve, atividade inflamatória A1 e A2 quando comparadas aos pacientes com CHC-HCV;
- Os níveis séricos do TNF- α apresentaram maior concentração nos pacientes com CHC-HCV quando comparadas aos pacientes com hepatite C com fibrose leve, fibrose grave, atividade inflamatória leve e atividade inflamatória grave.

8. RECOMENDAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudar as citocinas e seu papel na progressão e desenvolvimento do câncer é um desafio. Por isso, há a necessidade de prosseguirmos com investigações nessa área, uma vez que tais estudos podem auxiliar no tratamento futuro de pacientes com câncer.

Sugerimos prosseguir com a pesquisa incluindo um maior número de pacientes com CHC-HCV e investigando polimorfismos genéticos de outras citocinas, como a IL-1 β , IL-2, IL-6 e fator de crescimento transformante-beta (TGF- β), a fim de identificar pacientes com maior risco para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Assim, seria possível realizar um acompanhamento mais efetivo, reduzindo a mortalidade através do diagnóstico precoce do carcinoma hepatocelular.

Adicionalmente, é importante dar continuidade à investigação de polimorfismos genéticos destas citocinas em pacientes com hepatite C, haja vista que estes fatores poderiam aumentar a progressão da fibrose hepática para o carcinoma hepatocelular

9. REFERÊNCIAS♦

ADA. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes care*, United States, v. 34, suppl.1, S1-S61, 2011.

ALBERTI, A. et al. Natural history of initially mild chronic hepatitis C. *Digestive and Liver Disease*, Netherlands, v. 36, n. 10, p. 646-54, Oct. 2004.

ALEH. LATIN AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Diagnosis, management, and treatment of Hepatitis C. *Annals of Hepatology*, México, v. 9, suppl. 1, p. S8-S26, 2010.

ALJARIB, M. R.; FRANCESCA, L.; BURROUGHS, A. K. Surveillance and Diagnosis for Hepatocellular Carcinoma. *Liver Transplantation*, Mount Laurel, v. 13, n.11, p. S2-S11, Nov. 2007.

ALTER, M. J. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology*, United States, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S93-S98, Nov. 2002.

ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology*, China, v. 13, n.17, p. 2436-2441, May. 2007.

ARRESE, M.; RIQUELME, A.; SOZA, A. Insulin resistance, hepatic steatosis and hepatitis C: A complex relationship with relevant clinical implications. *Annals of Hepatology*, México, v. 9, suppl. 1, p. S8-S26. 2010.

ASCHA, M. S. et al. The incidence and Risk Factors of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*, United States, v. 51, n. 6, p.1972-8, Jun. 2010.

ASSADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H. D. Interleukin-10 therapy review of a new approach. *Pharmacological Reviews*, New York, v. 55, n.2, p.241-269, Jun. 2003.

ASSELAH, T. et al. Genetics, genomics and proteomics: Implications for the diagnosis and the treatment of chronic hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 27, n.1, P. 13-27, Feb. 2007.

♦Referências formatadas de acordo com as normas da ABNT (6023), segundo as instruções do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (ANEXO D).

BARONE, A. A. Hepatite por VHC - Aspectos Viroológicos e suas Implicações Práticas. *I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da hepatite C*. p. 20-23, 2008.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the Grading of Activity in Chronic Hepatitis C. *Hepatology*, United States, v.24, p. 289-293, 1996.

BEFELER, A.S.; DI BISCEGLIE, A. M. Hepatocellular Carcinoma: Diagnosis and Treatment. *Gastroenterology*, New York, v.122, n.6, p.1609-1619, May. 2002.

BIDWELL, J. et al. Cytokine gene polymorphisms in human disease. On-line databases supplement 1. *Genes and Immunity*, New York, v.2, n.2, p.61-70, April. 2001.

BILLERBERCK, E.; BOTTLER, T.; THIMME, R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, China, v.13, n.36, p.4858-4864, Sep. 2007.

BOCCATO, S. et al. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, Boston, v.13, n.5, p. 297-302, May. 2006.

BOUZGARROU, N. et al. Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, Paris, v. 34, n. 4-5, p. 297-304, Apr. 2010.

BRUIX, J.; SHERMAN, M. AASLD: Practice Guideline Committee, American Association for the Study of Liver Diseases. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, United States, v.42, n.5, p.1208-36, nov. 2005

BRUIX, J.; SHERMAN, M. Management of Hepatocellular Carcinoma: an Update AASLD. *Hepatology*, July 2010. Acesso em março 2011.
<http://www.aasld.org/practiceguidelines/Documents/Bookmarked%20practice%20Guideline/HCCUpdate2010.pdf>.

BRUIX, J.; SHERMAN, M. American Association for the Study of Liver Diseases Management of Hepatocellular Carcinoma an Update. *Hepatology*, United States, v. 53, n. 5, p.1020-2, Mar. 2011.

BURRA, P. Hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 29, n.1, p.53-65, Feb. 2009.

CACCIARELLI, T.V. et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pré and post treatment with interferon alfa. *Hepatology*, United States, v. 24, n.1, p.6-9, Jul. 1996.

CAMPIOTO, S. et al. Geographic distribution of Hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v.38, n.1, p. 41-49, Jan. 2005.

CARSWELL, E. et al. An Endotoxin-Induced Serum Factor that Causes Necrosis of Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, v. 72, n.9, p.3666-3670, Sep. 1975

CASTELO, G. et al. HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer. *Clinical Immunology*, United States, v.134, n.3, p. 237-250, Nov. 2010.

CHA, C.; DEMATTEO, R. P. Molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma development. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Netherlands, v.19, n.1, p. 25-37, Feb. 2005.

CHANG, K. M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clinics in Liver Disease*, United States, v.7, n.1, p. 89-105, Feb.2003.

CHEN, C. L. et al. Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic Hepatitis B/C Infection: A follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology*, New York, v.135, n.1, p. 111-121, Jul. 2008.

CHENG, A. L. et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*, England, v.10, n.1, p. 25-34, Jan 2009.

CHERUVU, S.; MARKS, K.; TALAL, A. H. Understanding the Pathogenesis and Management os Hepatitis B/HIV and Hepatitis B/ Hepatitis C Virus Coinfection. *Clinics Liver Disease*, United States, v.11, n.4, p. 917-943, Nov. 2007.

CHIA, C. S. et al. Expression of interleukin-18, interferon-gamma and interleukin-10 in hepatocellular carcinoma. *Immunology Letters*, Netherlands, v.84, n.3, p. 163-172, Dec. 2002.

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

CHU, C. J.; LEE, S. D. Hepatitis B virus/hepatitis C virus coinfection:epidemiology, clinical features, viral interactions and treatment. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Austrália, v. 23, n.4,p.512-20, Apr.2008.

CONSTANTITINI, P. K. et al. Interleukin-1, Interleukin-10 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphism in hepatitis C virus infection;an investigation of the relationships with spontaneous viral clearance and a Response to alpha-interferon therapy. *Liver*, Denmark, v.22, n.5, p.404-12, Oct. 2002

CONTE, V. P. Carcinoma hepatocelular. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v.37 n.1, p.1-16, Jan-Mar, 2000.

CRAXI, A. et al. EASL.Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. European Association for the Study of the Liver. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v.55. n.2, p.245-64, Aug. 2011.

CRISTINA, J. Genetic diversity evolution of hepatitis C vírus in the Latin America region. *Journal of Clinical Virology* , Amsterdam, v.34, suppl 2, p. S1-57, 2005.

D'AMICO, G. et al. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10:generation of functional decoys. *Nature Immunology*, New York, vol 1, n.5,p. 287-301, Nov. 2000.

DAVILA, J. A. et al. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut*, London, v. 54, n.4, p.533-39, apr. 2005.

DESMET, V. J. et al. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, United States, v.19, n. 6, p. 1513-20, Jun. 1994.

DI BISCEGLIE, A. M. Natural history of hepatitis C: its impacto on clinical management. *Hepatology*, United States, v.31, n.4, p.1014-1018, Apr. 2000.

EDWARDS-SMITH, C. J. et al.Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. *Hepatology*, United States, v.30, n.2, p.526-30, Aug. 1999.

EL-SERAG, H. B. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the United States. *Hepatology*, United States, v.36, n.5, Suppl1, p.S74-83, Nov. 2002.

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. Hepatocellular carcinoma epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, New York, v.132, n.7, p.2557-76, Jun. 2007.

EL-SERAG, H.B. et al. Diagnosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*, New York, v.134, n.6, p.1752-63, May. 2008.

EL-ZAYADI, A. R. Heavy smoking and liver. *World Journal of Gastroenterology*, China, v.12, n.38, p.6098-6101, Oct. 2006.

ESKDALE, J.; KUBE, D.; GALLAGHER, G. A. Second polymorphic dinucleotide repeat in the 5'flanking regions of the human IL-10 gene. *Immunogenetics*, New York, v.45, n.1, p. 82-3. 1996.

ESKDALE, J. et al. Mapping of the human IL-10 gene further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, New York, v.46, n.2, p.120-128.1997.

ESKDALE, J. et al. Interleukin-10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, United States, v. 95, p.9465-9470, Aug. 1998.

ESKDALE, J. et al. Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 locus. *Genes and Immunity*, England, v.1, n.2, p. 151-155, Nov.1999.

FERENCI, P. World Gastroenterology Organization Guidelines. Hepatocellular carcinoma (CHC): a global perspective. *Journal of Clinical Gastroenterology*, New York, v.44, n.4, p.239-45. Apr. 2010

FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell IV.Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, Israel, v.170, n.6, p.2081-95, Dec. 1989.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis-from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, Amsterdam, v.38, suppl.1, pS38-53, 2003.

FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*, New York, v.134, n.6, p.1655-1669, May. 2008.

FREEMAN, A. J. et al. Predicting progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v.10,n.4.p.285-93, Jul. 2003.

FUSEGAWA, H. et al. Platelet activation in patients with chronic hepatitis C. *The Tokai Journal Experimental and Clinical Medicine*, Israel, vol 27, n.4, p. 101-6, 2002.

GARCIA- TSAO, G.; LIM,J. K. Management and treatment of patients with cirrhosis and portal hypertension:recommendations from the Departament of Veterans Affairs Hepatitis C Resource Center Program and the National Hepatitis C Program. *American Journal of Gastroenterology*, New York, v.104, n.7, p. 1802-29, Jul. 2009.

GIGLIA, J. L. et al. SystemicTherapy for Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Control*, Bathesda, v.17, n.2, p. 120-9, April. 2010.

GITTO, S. Alcohol and viral hepatitis: A mini-review. *Digestive and Liver Disease*, Amsterdam, v.41 n.1, p.67-70, Jan.2009.

GHANY, M. G. et al. Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C:An Update. *Hepatology*, United States, v.49, n.4, p.1335-74, Apr. 2009.

HARRIS, D. R. et al. The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v.134, n.2, p120-4, Jan. 2001.

HARRISON, S. A. Correlation between insulin resistance and hepatitis C viral load. *Hepatology*, United States, v.43, n.5, p.1168-9, may.2006.

HAUKIM, N. et al. Cytokine genes polymorphisms in human disease:on line database, supplement 2. *Genes and Immunity*, England, v.3, n.6, p.313-330, sep. 2002.

HELMINEN, M.; LAHDENPOHJA, N.; HUME, M. Polymorphism of the interleukin-10 gene is associated with susceptibility to Epstein-Barr virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v.180 , n.2, p. 469-9, Aug.1999.

HÉZODE, C. et al. Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, United States, v.42, n.1, p.63-71, Jul. 2005.

HIRONO, I. et al. Molecular cloning, characterization and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v.165, n.8. p.4423-27, Oct. 2000.

HISSAR, S. S. et al. Natural history of hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C virus infection in India. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, Italy, v.24, n.4, p.581-7, April. 2009.

HO, S.Y. et al. Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the 308 tumor necrosis factor- α promoter gene. *Cancer Causes and Controls*, England, v.15, n.7, p.657-663, Sep. 2004.

HOWELL, W.M.; ZERILLIS, M.J.R. Cytokine Gene Polymorphism, Cancer Susceptibility and Prognosis. *The Journal of Nutrition*, Paris, v.137, n.1 suppl, p.1945-1949, Jan. 2007.

HUANG, Y. S. et al. Serum levels of cytokine in hepatitis C –related liver disease: a longitudinal study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, China, v.62, n. 6, p. 327-333, Jun.1999.

IMC. Disponível em: http://pt.wikipedia.org/wiki/Indice_de_massa_corporal
Acesso em 5/08/2010.

INCA. *Instituto Nacional do Câncer*. Estimativa da incidência de câncer para 2008 no Brasil e nas cinco regiões. Acesso em 10/11/2011 Disponível em: www.inca.gov.br/conteúdo_view.asp?id=1973.

ISHII, S.; KOZIEL, M.J. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C vírus. *Clinical Immunology*, Philadelphia, v.128, n.2, p. 133-147, Aug.2008.

JADON, A. N. et al. Seroprevalence of hepatitis C in type 2 diabetes: evidence for a positive association. *Virology Journal*, London, v.7, n.304, p. 1-6, Nov. 2010.

JOSHI, V.A.; KUCHERLAPATI, R. Genetics and Genomics in the practice of Medicine. *Gastroenterology*, New York, v.134, n.5, p.1284-1288, May. 2008

KAITO, M. et al. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectronmicroscopic study. *The Journal of General Virology*, London, v.75, n.7, p.1755-60, Jul. 1994.

KAKUMU, A. et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumor necrosis factor (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clinical and Experimental Immunology*, Israel, v.109, n.3, p.458-463, Sep. 1997.

KAWAGUCHI, T.; SATA, M. Importance of hepatitis C virus-associated insulin resistance:Therapeutic strategies for insulin sensitization. *World Journal of Gastroenterology*, London, v.16, n.16, p.1943-52, Apr. 2010

KATO, J. et al. Hepatitis vírus C NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *Journal of Medical Virology*, New York, v.66, n.2, p.187-189, Feb. 2002.

KENNY-WALSH, E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. *The New England Journal of Medicine*, New York, v.340, n.16, p. 1228-33, Apr. 1999.

KIM, J.M. et al. Structure of the mouse IL-10 cromossomal localization of the mouse and human genes.*Journal of Immunology*, Amsterdam, v.148, n.11, p.3618-23, Jun.1992.

KOBAYASHI,M. et al.The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 e 2 hepatitis C viruses. *Hepatology*, United States, v.23, n.4, p.695-9, apr.1996.

KUSUMOTO, K. et al. Interleukin-10 or tumor necrosis factor alfa polymorphism and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine*, New York, v.34, n.1-2, p. 24-31, Apr. 2006.

LAMPE, E. et al. Epidemic history of Hepatitis C virus in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution:Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, Amsterdam, v. 10, n.7, p. 886-95, Oct. 2010.

LEANDRO, G. et al. Relationship between steatosis inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis C:a meta-analysis of individual patient data. *Gastroenterology*, New York, v.130, n.6 p.1636-1642, May. 2006.

LEVITSKY, J.; MAILLIARD, M. E. Diagnosis and therapy of Alcohol liver disease. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 24, n. 3, p. 233-47, Aug. 2004.

LIN, L. et al. Viral interaction and clinical implications of coinfection of hepatitis C virus with other hepatitis viruses. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, London, v.18, n.12, p.1311-9, Dec.2006.

LLOVET, J.M.; BURROUGHS, A.; BRUIX, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, New York, v.362, n.9399, p.1907-1917, Dec.2003.

LLOVET, J.M.; BRUIX, J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *Journal of Hepatology*, New York, v. 48, suppl 1, p.S20-37, Fev. 2008.

MANNING, D.S.; AFDHAL, N.H. Diagnosis and Quantification of Fibrosis. *Gastroenterology*, New York, v. 134, n.6, p. 1670-81, May.2008.

MANGIA, A. et al. IL-10 haplotypes as possible predictors of spontaneous clearence of HCV infection. *Cytokine*, New York, v.25, n.3, p.103-109, feb.2004.

MARCELLIN, P. et al. Mortality related to chronic hepatitisB and chronic hepatitis C in France: Evidence for the role of HIV coinfection and alcohol consumption *Journal of Hepatology*, New York, v.48, n.2, p. 200-207, Feb. 2008.

MARCELLIN, P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver International*, New York, v.29, suppl. 1, p.1-8, Jan. 2009.

MASON, A.L. et al. Association of Diabetes Mellitus and Chronic Hepatitis virus infection. *Hepatology*, United States, v. 29, n.2, p.328-33, Feb.1999.

MASSARD, J. et al. Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, New York, v. 44, suppl 1, p. S19-S24, Nov. 2006.

MCGLYNN, K. A.; LONDON, W. T. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, Amsterdam, v. 19, n.1, p. 3-23, Feb. 2005.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n.863 de 4 de novembro de 2002. Brasil. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas :hepatite viral crônica C.(citado

em agosto de 2010). Disponível em: <http://saúde.ms.dov.br/externo/downloads/Portaria863HepatitisVirais.doc>.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. Brasília, p.1-102, jul. 2011.

MIRANDOLA, S. et al. Hepatic steatosis in hepatitis C is a storage disease due to HCV interaction with microsomal triglyceride transfer protein (MTP). *Nutrition & Metabolism*, Philadelphia, v.23, p. 7-13, Feb.2010.

MISSIHA, S.B.; OSTROWSKIM, M.; HEATHCOTE, E. J. Disease Progression in Chronic Hepatitis C: Modifiable and Nonmodifiable Factors. *Gastroenterology*, New York, v.134, n.6, p.1699-1714, May. 2008.

MIZUKOSHI, E.; REHERMANN, B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *Journal of Gastroenterology*, New York, v.36, n.12, p. 799-808, Dec. 2001.

MOORE, W. K. et al. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr Virus Gene. *Science*, New York, v.248, n.4960, p.1230-4, Jun. 1990.

MOORE, K.W. et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor. *Annual Review Immunology*, Philadelphia, v. 19, p.683-765, April. 2001.

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, New York, v.226, p.205-18, Dec. 2008.

MOSMANN, T.R. et al. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-15, IL-6 and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. *Journal of Immunology*, Amsterdam, v.145, n.9, p 2938-45, Nov. 1990.

NEDWIM, G. E. et al. Effect of Interleukin-2, interferon-gamma and mitogens on the production of tumour necrosis factor alpha and HCV. *Journal of Immunology*, Av. Amsterdam, 135, n. 4, p. 2492-5, Oct.1985.

NEGRO, F.; CLEMENT, S. Impact of Obesity, Steatosis and Insulin Resistance on progression and Response to Therapy of Hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, Oxford, v.16, n.10, p. 681-688, Oct. 2009.

NELSON, D.R. et al. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial in hepatitis of interferon nonresponders. *Gastroenterology*, New York, v. 118, n.4, p. 118-655, Apr. 2000.

NEUMAN, M. G. et al. Predictors of sustained response to alpha interferon therapy in chronic hepatitis C. *Clinical Biochemistry*, New York, v.32, n.7, p.537-545, Oct. 1999.

NEUMAN, M.G. et al. Cytokine –chemokine and apoptotic signatures in patients with hepatitis C. *Translational Research*, Philadelphia, v.149, n. 3, p.126-36, Mar. 2007

NIHA. National Institutes of Health Consensus development Conference Statement: Management of Hepatitis C 2002. Consensus Conference Statement, June 10-12, 2002. *Gastroenterology*, New York, v.123, n. 6, p. 2082-99, Dec, 2002.

NITA, M.E. et al., Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 44, n.1, p. 39-48, Jan-Feb. 2002.

NOUSBAUM, J.B.S.; POL, B.; NALPAS, P. Hepatitis C virus.type 1b (II) infection in france and Italy. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 122, n.3, p.161-8, Feb.1995.

OLIVEIRA-FILHO, A. B. et al. Prevalence and genotyping of hepatitis C virus in blood donors in the state of Pará, Northern Brazil. *Memórias do Instituto. Oswaldo Cruz*, São Paulo, v.105, n.1, p.103-106, Feb. 2010.

PALACIOS, R. et al. Impacto f highly active antiretroviral therapy on blood pressure in HIV-infected patients. A prospective study in a cohort of naive patients. *HIV Medicine*, New York, v.7, n.1, p.10-5, Jan. 2006.

PALADINO, N. et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *Journal of Virology*, Amsterdam, v. 80, n.18, p.9144-50, Sep.2006.

PATEL , J.H. et al. Hepatitis C and hepatic steatosis. *Quartely Journal of Medicine*, Philadelphia, v.103, n.5, p.293-303, May, 2010

PAWLOSTKY, J.M. Diagnostic tests for hepatitis C. *Journal of Hepatology*, v.31, New York, Suppl 1, p. 71-9, 1999.

PAWLOSTKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends in Microbiology*, Washington, v. 12, n.2, p. 96-102, Feb. 2004.

PAWLOSTKY, J. M. et al. HCV Research 20 years after discovery: A summary of the 16 th International Symposium of Hepatitis C virus and related Viruses. *Gastroenterology*, New York, v. 138, n. 1, p. 6-12 , Jan. 2010.

PENIN, F. et al. Structural Biology of Hepatitis C Virus. *Hepatology*, United States, v.39, n.1, p. 5-19, Jan. 2004.

PEREIRA, L. M. et al. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. *Journal of Medical Virology* , New York, 2002, v.67, n.1, p.27-32, May.2002.

PESSIONE, F. et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* , United States, v.34, n.1, p.121-5, jul.2001.

PETERS, M. G.; TERRAULT, N. A. Alcohol Use and Hepatitis C. *Hepatology* , United States, v. 36, n.5, Suppl 1, p. S220-5, Nov. 2002.

POLYAK, J.S. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. *Clinics in Liver Disease*, United States, v.7, n.1, p.67-88, Feb.2003.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR and DOSVIRC groups. *Lancet* , New York, v.349, n.9055, p.825-32, Mar.1997

POYNARD, T. et al. Rate and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, New York, v.34, n.5, p.730-9, May.2001.

REHERMANN, B. Immunology of Hepatitis C .Postgraduate course 2000.Update on Viral Hepatitis. AASLD, Dallas, Texas, 2000, p.119-126.

REHERMANN, B.; NASCIMBENI, M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nature Reviews Immunology*, London, v.5, n.3, p.215-29, Mar. 2005.

REUBEN, A. Alcohol and the liver. *Current Opinion in Gastroenterology*, Cambridge, v. 22, n.3, p. 263-271, May. 2006.

ROE, B.; HALL, W. W. Cellular and molecular interactions in coinfection with hepatitis C vírus and human immunodeficiency vírus. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Cambridge, v. 10, n. e30, p.1-19, Oct. 2008.

SANTAMARIA, L.G. et al. Genética y complicaciones de la cirrosis. *Gastroenterologia and Hepatologia*, São Paulo, v.33, n. 1, p.22-27, Fev. 2010.

SBD. *Sociedade Brasileira de Diabetes*. <http://www.diabetes.org.br/educação/docs/diretrizes.pdf>. Acesso em 23/10/2011, 8hs.

SCOGNAMIGLIO, P. A et al. Impact of hepatitis C virus infection on lifestyle. *World Journal of Gastroenterology*, China, v. 13, n.19, p.2722-2726, May. 2007

SEEF, L.B. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, United States, v. 36, n.5, Suppl 1, p. S35-S46, nov.2002.

SEEF, L. B. The history of the “natural history” of hepatitis C (1968-2009). *Liver International*, Oxford, v. 29, suppl 1, p. 89-99, Jan. 2009.

SERFATY, L.; CAPEAU, J. Hepatitis C, insulin resistance and diabetes; clinical and pathogenic data. *Liver International*, Oxford, v. 29, Suppl 2, p. 13-25, Mar. 2009.

SIMMONDS, P. et al. Consensus Proposal for a Unified System of Nomenclature of Hepatitis C Vírus Genotypes. *Hepatology*, United States, v.42, n. 4, p. 962-73, Oct. 2005.

SIMMONDS, P. et al. Classification of hepatitis C vírus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *The Journal of General Virology*, London, v.74, n. Pt11, p. 2391-2399, Nov. 1993.

SHARMA, S. D. Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *The Indian Journal of Medical Research*, Índia, v. 131, p. 17-34, Jan. 2010.

SHIFFMAN, M. L. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C vírus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transplantation*, New Jersey, v. 9, n.11, p. S14-20, Nov. 2003.

SHIMOIKE, T. et al. Interaction of hepatitis C virus protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *Journal of Virology*, v.73, n.12, p.9718-9725, Dec.1999.

SHIN, D.H. et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human Molecular Genetics*, Philadelphia, v.12, n.8, p.901-6, apr.2003.

SHIRAI, T. et al. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumours necrosis factor. *Nature*, Washington, v.313, n. 6005, p. 803-6, Feb. 1985.

SIU, L.; FOONT, J.; WANDS, J. R. Hepatitis C virus and Alcohol. *Seminars in Liver Disease*, New York, v. 29, n. 2, p.188-99, May. 2009.

SNP. SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS. SNP Fact Sheet. Department of Energy Genome Programs and provide the website. 2010. All other materials were provided by third parties and not created by the U.S. Department of Energy. Acesso em 10/11/2011. Disponível em: <http://genomics.energy.gov>.

STERLING, R.K.; STRAVI, T. Z.; STRAUSS, C. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v.34, n.1, p. 69-82, jan-fev.2001.

STRAUSS, E. Hepatite C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 34n.1, p. 69-82, Jan-Fev.2001.

STRAMARI, L. M.; KURTZ, M.; SILVA, L. C. C. Prevalência e fatores associados ao tabagismo em estudantes de medicina de uma universidade em Passo Fundo (RS). *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, São Paulo, v. 35, n.5, p. 442-448, May. 2009.

SULKOWSKI, MS. Viral Hepatitis and HIV coinfection. *Journal of Hepatology*, New York, v. 48, n. 2, p.353-67, Feb. 2008.

SZABO, G. et al. Alcohol and Hepatitis C Virus-Interactions in Immune Dysfunctions and Liver Damage. *Alcoholism Clinical Experimental Research*. New York, v. 34 n.10, p.1675-86, Oct. 2010.

TE, H.S.; JENSEN, D.M. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: Global overview. *Clinics in Liver Diseases*, United States, v. 14 , n. 1, p. 1-21, Feb. 2010.

THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBER, F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Research*, Washington, v. 69, n.3, p.129-141, Mar.2006.

THORGEIRSSON, S.S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, New York, v. 31, n.4, p. 339-346, Aug. 2002

TILG, H. The inflammatory response in liver injury. *Gastroenterologia and Hepatologia*, United States v.32, n.1, p.83-9, Fev. 2009.

TSAI, W.L.; CHUNG, R.T. Viral hepatocarcinogenesis. *Oncogene*, New York, v.29, n.16, p. 2309-24, Apr. 2010.

TURNER, D.M. et al. Na investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *European Journal of Immunogenetics*, Oxford, v. 24, n.1, p.1-8, Feb. 1997

VELDT, B.J. et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C , cirrhosis and diabetes. *Hepatology*, United States, v. 47, N.6,p.1856-62, jun. 2008.

VICARI, A.P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunological Reviews*, New York, v . 202, p.223-36, Dec. 2004

VITALE, R.F.; RIBEIRO, F.A.Q. O papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no processo de erosão ossea presente no colesteatoma adquirido na orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, São Paulo, v.73, n.1, p.123-7. 2007

VISO, A.T.R. Patogenia da Hepatite C-Consenso VHC 2008.I Consenso da Sociedade Brasileira de Infectologia para o Manuseio e Terapia da hepatite C. p. 24-29, 2008.

WANG, Y. et al. Interleukin-1beta gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis C vírus infection. *Hepatology*, United States, v.37, n.1, p.65-71, Jan. 2003.

WANG, Y.Y. et al. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. *Journal of the Chinese Medical Association*, Taiwan, v. 66, n.10, p. 593-598, Oct. 2003.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer 2010.<http://www.iarc.fr/>.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION . Global status report on alcohol. Geneva: WHO, 2004.

WILEY, T.E.; BROWN, J.; CHAN, J. Hepatitis C infection in African Americans: Its natural history and histological progression. *The American Journal of Gastroenterology*. New York, v. 97, n.3, p.700-706. Mar. 2002

YEE, L.J. et al. Tumour necrosis factor gene polymorphism in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes and Immunity*, Amsterdam, v.1, n.6, p. 386-90, Aug. 2000.

YUAN, J. M. et al. Synergism of alcohol, diabetes, and viral hepatitis on the risk of hepatocellular carcinoma in blacks and whites in the U.S. *Cancer*; New York, v. 101, n.5, p.1009-17, Sep.2004.

ZEIN, N. N. Clinical Significance of Hepatitis C Virus Genotypes. *Clinical Microbiology Reviews*, New York, v. 13 n.2., p.223-235, Apr.2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO - HOSPITAL OSWALDO CRUZ

Nome da pesquisa: Determinação do polimorfismo dos genes da Interleucina-10 e fator de necrose tumoral em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C

Pesquisador responsável: Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Eu, paciente abaixo assinado, portador do vírus da hepatite C, que realiza tratamento no ambulatório deste serviço concordo em participar voluntariamente desta pesquisa sobre a Determinação do polimorfismo dos genes da interleucina-10 e fator de necrose tumoral em pacientes portadores de carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C Sei que a razão deste estudo é saber se eu tenho uma alteração no meu sistema imunológico que poderia contribuir para o desenvolvimento do câncer de fígado.

Admito ter sido esclarecido sobre as perguntas feitas e do procedimento onde será retirada uma amostra de 10 ml de sangue de uma veia, por profissionais da unidade estudada., para fazer um estudo laboratorial (imunogenético).

Sei que essa pesquisa irá me ajudar, porque se for detectado a alteração genética, a orientação ambulatorial e conduta poderão ser modificadas, com isto ajudando o meu tratamento. Fui informado que, quando da apresentação dos resultados da pesquisa, não serão vinculados dados que possam me identificar como participante da mesma. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga qualquer prejuízo para mim.

Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento.

Recife, _____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente _____

Assinatura do Pesquisador _____

APÊNDICE B – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Nome: _____

Registro: _____

Data: ____ / ____ / ____

Idade: ____ Sexo: ____ Profissão: _____

Data nascimento: ____ / ____ / ____

Procedência: _____ Grau de instrução: _____

Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____

Antecedentes

A- Banhos de rio (localidade: _____): _____ sim
não

B- Passado de icterícia: _____ Sim, Não

C- Ingestão de álcool: _____

D- Hemotransfusão: _____ Sim, Não

E- Medicações injetáveis: _____ Sim, Não

F- Drogas(UDI) : _____ Sim, Não

G- Cirurgias: _____ Sim, Não

H- Tatuagens: _____ Sim, Não

I- Tabagismo: _____ Sim, Não
_____ fumantes (diário e ocasional) _____ ex-fumantes _____ nunca
fumou

L- Outras observações (ingestão de amendoim): _____ Sim, Não

Exame físico:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Normal _____ Sobrepeso _____ Obesidade grau _____

Icterícia: _____

Ascite: _____ Perímetro abdominal: _____

Ginecomastia: _____ Aranhas vasculares: _____

Eritema palmar: _____ Circulação colateral: _____

Fígado _____ cm abaixo do RCD _____ cm abaixo do AX

Baço _____ cm abaixo do RCE

ACV: _____ AR: _____

Outras observações:

APÊNDICE C - FICHA DE AVALIAÇÃO LABORATORIAL

Exames laboratoriais

Hemograma

Hb: _____ Ht: _____ Leucócitos: _____ Plaquetas: _____

Glicemia: _____ Alfa-fetoproteína: _____

ALT: _____ AST: _____ GGT: _____ FA: _____

AFP: _____ BT: _____ BI/BD: _____

HBsAg: _____ Anti-HBc total: _____ Anti-HBs: _____

Anti-HCV: _____ HCV-RNA: _____ Genótipo: _____

Anti-HIV: _____

Biópsia hepática:

EXAMES DE IMAGEM

ULTRASSONOGRRAFIA

Nódulo: _____ Tamanho: _____

TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA:

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

ARTERIOGRAFIA

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS
SUBMETIDO À REVISTA: *Journal of Gastroenterology and Hepatology*

Single nucleotide polymorphisms and serum levels of IL-10 in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma

Running title: Polymorphisms and serum levels of IL-10

Aroucha, D.C.B.L.^{1,5,7,8}; Carmo, R.F.⁶; Silva, J.L.A.^{1,2}; Vasconcelos, L.R.S.⁸; Moura, P.⁶; Cavalcanti, M.S.M.⁶; Muniz, M.T.C.⁶; Aroucha, M.L.⁴; Siqueira, E.R.F.^{7,8}; Cahú, G.G.O.M.²; Pereira, L.M.B.^{7,8}; Coêlho, M.R.C.D.^{1,2,3}

¹Graduate Program in Tropical Medicine, Health Science Center, UFPE, Recife, Brazil; ²Virology Division, Keizo Asami Laboratory of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil; ³Department of Physiology and Pharmacology, Center for Biological Sciences, UFPE, Recife, Brazil; ⁴Department of Maternal and Child Medicine, Health Sciences Center, UFPE, Recife, Brazil; ⁵Elderly Care Center, Health Science Center, UFPE, Recife, Brazil; ⁶Biological Sciences Institute, University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil; ⁷Department of Gastroenterology, School of Medical Sciences, University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil; ⁸Liver Institute of Pernambuco (IFPE), Recife, Brazil;

Corresponding author:

Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Rua Clóvis Beviláqua, 50 - Aptº 101

Madalena - 50710-330 - Recife, PE, Brazil.

E-mail: daysearoucha@yahoo.com.br

Phone/fax: + 55 81 3082-5111

Abstract

Background and Aims: Interleukin 10 (IL-10) is a cytokine with action in the host immune response to infection by the hepatitis C virus (HCV). We investigated the association of the serum IL-10 and polymorphisms (SNPs) in IL-10 gene promoter with liver histology in HCV infection and hepatocellular carcinoma (HCC) in patients in northeastern Brazil.

Methods: We evaluated 171 patients with HCV and 119 without cancer, with liver biopsy classified according to the METAVIR score and 52 patients with HCC, diagnosed according to criteria of BCLC. For the study of SNPs was using real time PCR and dosage serum IL-10 ELISA. The statistical analysis used both univariate and multivariate approaches.

Results: In patients with HCV-HCC showed a higher frequency of type II diabetes mellitus ($p < 0.01$), and elevated aspartate aminotransferase, gamma-glutamyl transpeptidase, alkaline phosphatase, alpha-fetoprotein and total bilirubin levels plus thrombocytopenia ($p < 0.0001$). Serum IL-10 levels were higher in patients with HCV, F1/F2 ($p < 0.0007$), A1 ($p < 0.0087$) and A2 ($p < 0.0079$) compared to patients with HCV-HCC. There was no significant difference between the allelic or genotypic frequencies or in haplotypes or diplotypes at positions -1082 (G/A), -819 (C/T) and -592 (C/A) in IL-10 gene promoter.

Conclusion: We conclude that SNPs in IL-10 gene promoter did not influence the progression of fibrosis and inflammatory activity in hepatitis C and HCV-HCC. However, the patients had serum IL-10 levels was smaller as the progression of inflammatory activity, fibrosis and HCC.

Keywords: Interleukin 10, Single nucleotide polymorphisms, Hepatitis C, Hepatocellular carcinoma, Liver fibrosis.

Introduction

Hepatitis C viral infection (HCV) is the most common cause of chronic liver disease worldwide.¹ Approximately 20% of chronically infected patients will progress to liver cirrhosis within 13 to 23 years, and 1 to 4% of these patients will develop hepatocellular carcinoma (HCC).^{2,3}

Hepatocarcinogenesis is a complex process involving genetic alterations, epigenetics, chromosomal rearrangements, oncogenes activation and/or inactivation of tumor suppressor genes and the deregulation of several signal transduction pathways.^{4,5,6}

The risk for the development of HCC increases with the severity of liver inflammation and fibrosis.⁷ The hepatic inflammation caused by HCV involves various mechanisms that include the regulatory immune response of the host, which is mediated by cytokines that play important roles against viral infections,⁷ and viral polypeptides, which interact with cells involved in innate and adaptive immunity.⁸

Patients with acute self-limited HCV infection display a predominant T-helper type 1 (Th1) response, whereas patients with chronic HCV infection display a T-helper type 2 (Th2) cytokine profile, in which the expression of interleukin 10 (IL-10) predominates, stimulating antibody formation and inhibiting the Th1 response.^{9,10} The Th1 response has been associated with viral clearance,¹¹ and the Th2 response promotes viral persistence.¹²

Thus, our aims of this study was to investigate the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions -1082 (G/A), -819 (C/T) and -592 (C/A) in IL-10 gene promoter, determine the serum levels of this cytokine and assess the associations between IL-10 SNPs and/or IL-10 levels and the degree of inflammatory activity and liver fibrosis in hepatitis C patients and patients with hepatocellular carcinoma caused by HCV (HCC-HCV).

Materials and Methods

Study population

This cross-sectional study with comparison groups evaluated 119 hepatitis C patients (54 with mild fibrosis and 65 with severe fibrosis) and 52 patients with hepatocellular carcinoma caused by HCV. All subjects who attended the

Gastrohepatological Center of the University of Pernambuco Oswaldo Cruz Hospital and at the Liver Institute of Pernambuco, both located in northeastern Brazil, between January 2009 and March 2011.

The patients were tested for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (BT), fasting glucose, alpha-fetoprotein (AFP), platelet count, HIV (anti-HIV), hepatitis B (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc), and hepatitis C (anti-HCV) serologies. In cases of reactive anti-HCV, HCV-RNA and viral genotyping tests were performed.

Hepatocellular carcinoma caused by HCV was diagnosed by ultrasound, computerized tomography, magnetic resonance imaging, arteriography and tumor biopsy according to the Barcelona criteria.¹³

Liver biopsy data from the hepatitis C patients were collected from medical records and classified according to the METAVIR score.¹⁴ It was considered mild fibrosis the gradation of F1 to F2 and severe fibrosis, the cases with gradation of F3 to F4.¹⁵ With regard to inflammatory activity, mild activity was defined like gradation equal to A1 and severe activity, the cases with gradation of A2 to A3.¹⁶

Patients that were seropositives for HBsAg and anti-HIV were excluded, as were those undergoing antiviral treatment for hepatitis C.

This study was approved by the research committee of the University of Pernambuco, protocol number 144/2008.

Data Collection

After signing a free and informed consent form, the data were collected through a questionnaire applied by a single researcher. The variables studied included age, gender, source of infection, alcohol consumption (men >40g/day; women >20g/day), smoking, *diabetes mellitus* type II status and body mass index.

Serum IL-10 levels

Five milliliters of peripheral blood was collected by venipuncture in a tube without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C until IL-10 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Quantikine® Human IL-10 Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's instructions.

Extraction of genomic DNA

Using the Wizard Genomic Blood DNA Isolation Kit (Promega, UK) according to the manufacturer's instructions, genomic DNA was extracted from a sample of 5.0 mL of peripheral blood collected by venipuncture in a tube with anticoagulant (EDTA) for each patient. The samples were stored at -80 ° C until real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed.

Single nucleotide polymorphisms in IL-10 gene promoter

Three substitutions at positions -1082 (G/A), -819 (C/T) and -592 (C/A) were investigated in IL-10 gene promoter by real-time PCR using *TaqMan®* SNP Genotyping Assays, with the IDs C__1747360_10, C__1747362_10 and C__1747363_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

When appropriate, either the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was used to compare the quantitative variables among hepatitis C patients and patients with HCC-HCV. The chi-squared (χ^2) test was used for categorical variables.

The GraphPad Prism (version 5.0, San Diego, USA) was used to perform the analysis and construct the figures. Multivariate analysis was performed using the backward stepwise method with the software SPSS v.17 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL). To verify the Hardy-Weinberg equilibrium and for the construction of haplotypes, the ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Switzerland) program was used. In all analyses, significance was assigned at $p < 0.05$.

Results

Clinical characteristics

A higher proportion of males ($p = 0.005$) and a higher average age ($p = 0.0001$) were present among the patients with HCC-HCV. Clinical features and biochemical parameters revealed an increased frequency of *diabetes mellitus* type II ($p = 0.01$), higher levels of AST, GGT, AP, BT, and AFP ($p < 0.0001$), and thrombocytopenia ($p < 0.0001$) in patients with HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild or severe fibrosis (Table 1).

Serum IL-10 levels

Higher serum IL-10 levels were detected in hepatitis C patients and mild fibrosis compared to patients with severe fibrosis ($p = 0.00176$) and patients with HCC-HCV ($p < 0.0007$) (figure 1).

In addition, higher serum IL-10 levels were observed in hepatitis C patients and either mild ($p = 0.0087$) or severe ($p < 0.0079$) inflammatory activity compared to patients with HCC-HCV (figure 2).

Single nucleotide polymorphisms in IL-10 gene promoter

The genotype frequencies were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. However, the groups evaluated showed no significant differences in allelic or genotypic frequencies (Table 2) or in haplotypes or diplotypes (Table 3) at positions -1082, -819, and -592 in IL-10 gene promoter.

Multivariate analysis of risk factors associated with liver fibrosis

Elevated levels of GGT, BT and AFP were all determined to be independent risk factors for HCC in hepatitis C patients with mild fibrosis (Table 4). Thrombocytopenia and elevated IL-10 serum levels were protective factors for HCC-HCV (Table 4).

Male gender, high BT and AFP levels, were determined to be independent risk factors for HCC in hepatitis C patients with severe fibrosis (Table 4). However, elevated IL-10 serum levels were protective factor for HCC-HCV (Table 4).

Multivariate analysis of risk factors associated with inflammatory activity

High levels of GGT, BT and AFP were determined to be independent risk factors for HCC in hepatitis C patients with mild inflammatory activity (Table 5). Thrombocytopenia and elevated IL-10 serum levels were protective factors for HCC-HCV (Table 4).

Male gender, high BT and AFP levels were determined to be independent risk factors for HCC in hepatitis C patients with severe inflammatory activity (Table 5). However, elevated IL-10 serum levels were protective factor for HCC-HCV (Table 5).

Discussion

The present study found no association between allelic variants, genotype and haplotype of IL-10 gene with the severity of inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C infection. Likewise, a meta-analysis of the polymorphism in the promoter of the gene IL-10 -592 (A / C) in patients with HCV infection showed no association regarding the A allele with infection susceptibility. However, when the meta-analysis was performed by ethnicity, only involving the Asian populations, the A allele was significantly associated¹⁷.

Another study also found no association between susceptibility to HCV infection with the polymorphisms of several cytokines (TNF-alpha, IL-10 -1082, -819, -592, IL-6 and IFN-γ) in both healthy and infected individuals¹⁸.

The association of the polymorphism of IL-10 at position -1082 (G / A) with necroinflammatory activity and -819 (C / T) with degree of hepatic fibrosis was demonstrated by Abbas et al. (2005) when they studied 40 patients with chronic hepatitis C genotype 3¹⁹.

The correlation of IL-10 polymorphism with HBV and HCV is important for its role in the progression of fibrosis and cirrhosis. It was shown that this gene polymorphism may affect the transcription, translation and secretion of IL-10 and interfere with the immune response against the virus¹⁷.

The divergence of our results with the literature can be explained by the sample size, once we divided our sample into two groups, mild fibrosis and severe fibrosis, the same was made regarding the degree of inflammatory activity (A1 vs. A2 + A3). Thus, the number of patients in each subgroup became too small which may have interfered with the confirmation of the association of IL-10 with lesions in chronic hepatitis C infection.

No association between HCC in hepatitis C and polymorphisms of the gene for IL-10 was found in our study, as well as a meta-analysis conducted by Yang et al. (2011)²⁰. In addition, also a meta-analysis by Wei et al. (2011) reported that the presence of IL-10 allele at position -592 (A / C) increased the risk for HCC in Asians, while IL-10 polymorphisms at positions -1082 (G / A) and -819 (T / C) were not related to HCC²¹. Thus, the results of the above studies are discordant, either by small sample size or unified by ethnicity.

In relation to serum levels of IL-10, our results demonstrated an interesting and significant association of this cytokine in chronic hepatitis C and HCC, which showed

reduced expression in severe fibrosis and inflammatory activity as to the HCC

Several studies provide evidence of anti-inflammatory and anti-fibrogenic role of IL-10. Louis et al. (1998)²² demonstrated that IL-10 deficiency potentiate the liver fibrogenesis inflammation or an increased effect on the regulation of the matrix, on the other hand Thompson et al. (1998) studied 22-deficient mice, which was demonstrated that mice with higher levels of TNF-alpha had more liver fibrosis²³. These researchers have demonstrated the importance of the role and complexity of IL-10 in chronic inflammation and fibrogenesis^{22,23}.

The inefficient eradication of HCV in chronic disease could be responsible for a continuous stimulation of the cellular immune response leading to liver damage and inflammation and consequently to an increase risk of HCC development. In fact, in chronic hepatitis C treatment with anti-inflammatory drugs showed a reduction of risk²⁴ of HCC and the treatment with recombinant IL-10 showed a reduction of the histological lesions²⁵,

It was detected that patients with HCC-HCV presented low serum levels of IL-10 than patients with HCV. Our results corroborate the results reported by Hassoba et al. who found undetectable levels of IL-10 in Egyptian patients with cirrhosis and HCC related to HCV²⁶. However, the findings are quite different from other studies, where the levels of cytokines were elevated in patients with resectable HCC and unresectable^{27, 28}, possibly due to a relative state of immunosuppression, such as an escape mechanism of tumor cell surveillance system host immune and potentiation of metastasis or disease progression^{27,28,29,30}.

In conclusion, the serum levels of IL-10 were higher in patients with hepatitis C and the SNPs in the gene promoter of the IL-10 did not influence the degree of inflammatory activity and hepatic fibrosis.

Communication

The authors of this study declare that they have nothing to say about funding or conflict of interest regarding this manuscript.

References

1. Paladino N, Fainboim H, Theiler G et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. *J. Virol.* 2006; **80**(18): 9144-50.
2. Shiffman ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transpl.* 2003; **9**(11): S14-20.
3. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; **5**(3): 215-29.
4. Thorgeirsson S, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 2002; **31**: 339-46.
5. Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2003; **362**(9399): 1907-17.
6. Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J. Hepatol.* 2008; **48**(1): S20-S37.
7. Wang YY, Lo GH, Lai KH, Cheng JS, Lin CK, Hsu PI. Increased serum concentrations of tumor necrosis factor-alpha are associated with disease progression and malnutrition in hepatocellular carcinoma. *J. Chin. Med. Assoc.* 2003; **66**(10): 593-98.
8. Mondelli MU, Barnaba V. Viral and host immune regulatory mechanisms in hepatitis C virus infection. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2006; **18**(4): 327-31.
9. Chang KM. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver. Dis.* 2003; **7**(1): 89-105.
10. Mizukoshi E, Rehermann B. Immune responses and immunity in hepatitis C virus infection. *J. Gastroenterol.* 2001; **36**(12): 799-808.
11. Cramp M, Carucci P, Rossol S et al. Hepatitis C virus (HCV) specific immune responses in anti-HCV positive patients without hepatitis C viraemia. *Gut.* 1999; **44**(3): 424-29.
12. Reiser M, Marousis CG, Nelson DR et al. Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* 1997; **26**(3): 471-78.
13. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2005; **42**(5): 1208-36.

14. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996; **24**(2): 289-93.
15. Bouzgarrou N, Hassen E, Gabbouj S *et al*. Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34**: 297–304.
16. Asselah T, Boyer N, Guimont M-C *et al*. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Scand. J. Gastroenterol*. 2009; **44**(6): 1638-43.
17. Lu YL, Wu X, Huang HL, Dai LC. Allele polymorphisms of interleukin-10 and hepatitis B, C virus infection. *Chin. Med. J. (Engl)*. 2010; **123**(10): 1338-44
18. Pereira FA, Pinheiro da Silva NN, Rodart JF *et al*. Association of TGF-beta1 codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2008; **80**(1):58-64).
19. Abbas Z, Moatter T, Hussainy A, Jafri W. Effect of cytokine gene polymorphism on histological activity index, viral load and response to treatment in patients with chronic hepatitis C genotype 3. *World J. Gastroenterol*. 2005; **11**(42): 6656-61.
20. Yang Y, Luo C, Feng R, Bi S. The TNF- α , IL-1B and IL-10 polymorphisms and risk for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2011; **137**(6): 947-52.
21. Wei YG, Liu F, Li B *et al*. Interleukin-10 gene polymorphisms and hepatocellular carcinoma susceptibility: A meta-analysis. *World J. Gastroenterol*. 2011; **17**(34): 3941–47.
22. Louis H, Van Laethem J-L, Quertinmont E *et al*. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; **28**(6):1607-1615.
23. Thompson K, Maltby J, Fallowfield J *et al*. Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis. *Hepatology*, 1998; **28**(6):1597-606
24. Ikeda K, Saitoh S, Arase Y *et al*. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. *Hepatology*, 1999; **29**(4):1124-30.

25. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JY, Davis GL. Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C : a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterology* 2000; **118**(4):655-60.
26. Hassoba H, Leheta O, Sayed A et al. IL-10 and IL-12p40 in Egyptian patients with HCV-related chronic liver disease. *Egypt J Immunol* 2003; **10** (1): 1-8.
27. Chau GY, Wu CW, Lui WY et al. Serum interleukin-10 but not interleukin-6 is related to clinical outcome in patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Ann. Surg.* 2000; **231**(4): 552-58.
28. Hattori E, Okumoto K, Adachi T. Possible contribution of circulating interleukin-10 (IL-10) to anti-tumor immunity and prognosis in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; **27**(4):309-314
29. Kitaoka S, Shiota G, Kawasaki H. Serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and soluble interleukin-2 receptor in chronic liver disease type C. *Hepatogastroenterology*. 2003; **50**(53): 1569-74.
30. Shin HD, Park BL, Kim LH et al. Interleukin 10 haplotype associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. *Human Mol Genet* 2003; **12** (8):901-6

Figure legends

Figure 1. Association of serum IL-10 levels among HCV patients with mild and severe liver fibrosis and patients with HCC-HCV. Average values are as follows: mild fibrosis (33.60 pg / mL), severe (25.10 pg / mL) and HCC-HCV (14.15 pg / mL).

Figure 2. Association of serum IL-10 levels among among HCV patients with mild and severe inflammatory activity and patients with HCC-HCV. Average values are as follows: A1 (34pg/mL), A2 (29.5pg/mL), A3 (25.1pg/mL) and HCC-HCV (14.1pg/mL).

Table 1. Distribution of hepatitis C patients with mild fibrosis, severe fibrosis, and HCC according to age, gender, risk factors for infection, biochemical parameters and HCV genotypes.

	Mild Fibrosis (n=54)	Severe Fibrosis (n=65)	HCC-HCV (n=52)	p
Age (years)	53.5±11.0	59.7±10.1	61.6±8.8	0.0001
Gender (M:F) (%)	31:23 (57:43)	24:41 (37:63)	34:18 (65:35)	0.005
Source of infection				
Glass syringe	44 (81.4%)	48 (73.8%)	45 (86.5%)	0.22
Surgery	37 (68.5%)	41 (63.0%)	37 (71.1%)	0.63
Blood transfusion	17 (31.4%)	34 (52.3%)	19 (36.5%)	0.05
UDI	9 (16.6%)	4 (6.1%)	4 (7.6%)	0.13
Tattoo	3 (5.5%)	1 (1.5%)	0	0.14
Risk factors				
Alcohol consumption	8 (14.8%)	3 (4.4%)	7 (13.4%)	0.13
Smoking	4 (7.4%)	2 (2.9%)	4 (7.6%)	0.48
<i>Diabetes mellitus</i> type II	3 (5.5%)	11 (16.9%)	14 (26.9%)	0.01
BMI	26.9±6.4	26.4±4.6	26.0±3.9	0.69
Biochemical parameters				
AST (IU/mL)	50 (20-286)	76 (24-438)	94 (18-257)	<0.0001
ALT (IU/mL)	63 (12-271)	79 (25-458)	74 (22-307)	0.09
GGT (IU/mL)	67 (11-588)	106 (23-849)	179 (52-778)	<0.0001
ALP (IU/mL)	69 (16-392)	92 (23-418)	144 (61-354)	<0.0001
BT (mg/dL)	0.69 (0.2-4.0)	0.96 (0.3-4.0)	1.40 (0.5-7.2)	<0.0001
AFP (ng/mL)	2.8 (0.5-45.1)	6.5 (0.8-112.0)	87.4 (1.9-100000)	<0.0001
Platelets count	193500 (55000-391000)	140000 (10800-252000)	106000 (13000-314000)	<0.0001
HCV genotypes				
1	35 (64.8%)	49 (75.3%)	37 (71.1%)	0.44*
2	1 (1.8%)	0	1 (1.9%)	
3	18 (33.4%)	16 (24.7%)	14 (27.0%)	

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by HCV, UDI: injecting drug user, BMI: body mass index; ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, ALP: alkaline phosphatase (ALP), BT: total bilirubin, AFP: alpha-fetoprotein.

*Genotype 1 vs. Non-1.

Continuous variables with normal distribution are presented as the means +/- standard deviations. All others are presented as medians (ranges).

Table 2. Allelic and genotypic distributions of the *IL-10* -1082, *IL-10* -819, *IL-10* -592 alleles according to serum IL-10 levels in hepatitis C patients with mild or severe fibrosis and patients with HCC-HCV.

	Mild (n=54)	Severe (n=65)	HCC-HCV (n=52)	<i>p</i>
<i>IL-10 -1082</i>				
<i>Alleles</i>				
A	71 (65.7%)	32 (63.0%)	67 (64.4%)	0.9
G	37 (34.3%)	48 (37.0%)	37 (35.6%)	
<i>Genotypes</i>				
AA	22 (40.7%)	25 (38.4%)	22 (42.3%)	0.9
GA	27 (50.0%)	32 (49.2%)	23 (44.2%)	
GG	5 (9.3%)	8 (12.4%)	7 (13.5%)	
<i>IL-10 -819</i>				
<i>Alleles</i>				
C	73 (67.5%)	30 (69.2%)	67 (64.4%)	0.7
T	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.5%)	
<i>Genotypes</i>				
CC	25 (46.2%)	31 (47.6%)	21 (40.3%)	0.7
CT	23 (42.5%)	28 (43.0%)	25 (48.0%)	
TT	6 (11.3%)	6 (9.4%)	6 (11.7%)	
<i>IL-10 -592</i>				
<i>Alleles</i>				
C	73 (67.5%)	30 (69.2%)	67 (64.4%)	0.7
A	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.6%)	
<i>Genotypes</i>				
CC	25 (46.2%)	31 (47.6%)	21 (40.3%)	0.7
CA	23 (42.5%)	28 (43.0%)	25 (48.0%)	
AA	6 (11.3%)	6 (9.4%)	6 (11.7%)	

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by HCV, IL-10: interleukin 10

Table 3. Distribution of IL-10 gene haplotypes and diplotypes of polymorphism polymorphisms in IL-10 gene promoter according to the severity of fibrosis in hepatitis C patients with mild or severe fibrosis and patients with HCC-HCV.

	Mild (n=54)	Severe (n=65)	HCV-HCC (n=52)	Mild vs. HCC <i>p</i>	Severe vs. HCV-HCC <i>p</i>
Haplotype					
GCC	37 (34.2%)	48 (36.9%)	37 (35.5%)	0.8	0.8
ACC	36 (33.3%)	42 (32.3%)	30 (28.8%)	0.4	0.5
ATA	35 (32.5%)	40 (30.8%)	37 (35.7%)	0.6	0.4
Diplotype					
GCC/GCC	5 (9.2%)	8 (12.3%)	7 (13.4%)	0.5	0.9
GCC/ACC	15 (27.7%)	16 (24.6%)	7 (13.4%)	0.09	0.1
GCC/ATA	12 (22.2%)	16 (24.6%)	16 (30.7%)	0.3	0.5
ACC/ACC	5 (9.2%)	7 (10.7%)	7 (13.4%)	0.5	0.7
ACC/ATA	11 (20.3%)	12 (18.4%)	9 (17.3%)	0.8	0.9
ATA/ATA	6 (11.4%)	6 (9.4%)	6 (11.8%)	0.9	0.7

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by HCV,

Table 4. Multivariate analysis of risk factors associated with the severity of liver fibrosis in hepatitis C patients with mild or severe fibrosis and patients with HCC-HCV.

	Mild vs. HCC-HCV		Severe vs. HCC-HCV	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Male gender	2.27 (0.39-14.3)	0.363	8.33 (1.75-50.0)	0.008
Thrombocytopenia	0.98 (0.96-0.99)	0.002	0.99 (0.99-1.01)	0.219
GGT (IU/mL)	1.01 (1.02-1.01)	0.035	1.01 (1.00-1.01)	0.239
BT (mg/dL)	5.26 (1.64-20.0)	0.006	2.77 (1.09-7.14)	0.034
AFP (ng/mL)	1.10 (1.04-1.16)	0.002	1.07 (1.04-1.11)	<0.0001
High IL-10 serum levels	0.87 (0.79-0.94)	0.001	0.88 (0.82-0.96)	0.002

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by HCV, OR: Odds ratio. 95% CI: 95% interval confidence, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, BT: total bilirubin, AFP: alpha-fetoprotein, IL-10: interleukin 10.

Table 5. Multivariate analysis of risk factors associated with inflammatory activity in hepatitis C patients with mild or severe fibrosis and patients with HCC-HCV.

	IA A1 vs. HCC		IA A2/A3 vs. HCC	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Male gender	2.22 (0.06-3.09)	0.420	7.14 (1.51-33.3)	0.013
GGT (IU/mL)	1.02 (0.97-0.99)	0.024	1.01 (1.00-1.01)	0.193
BT (mg/dL)	4.54 (0.05-0.89)	0.034	2.94 (1.15-7.69)	0.026
AFP (ng/mL)	1.17 (0.73-0.99)	0.049	1.07 (1.04-1.11)	<0.0001
Thrombocytopenia	0.98 (1.00-1.04)	0.008	0.99 (0.98-1.01)	0.097
High IL-10 serum levels	0.88 (1.04-1.25)	0.003	0.88 (0.82-0.96)	0.002

IA: inflammatory activity, A1: IA grade 1, A2: IA grade 2, A3: IA grade 3, HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by HCV, OR: Odds ratio. 95% CI: 95% interval confidence, GGT: gamma-glutamyl transpeptidase, BT: total bilirubin, AFP: alpha-fetoprotein, IL-10: interleukin 10.

Figure 1

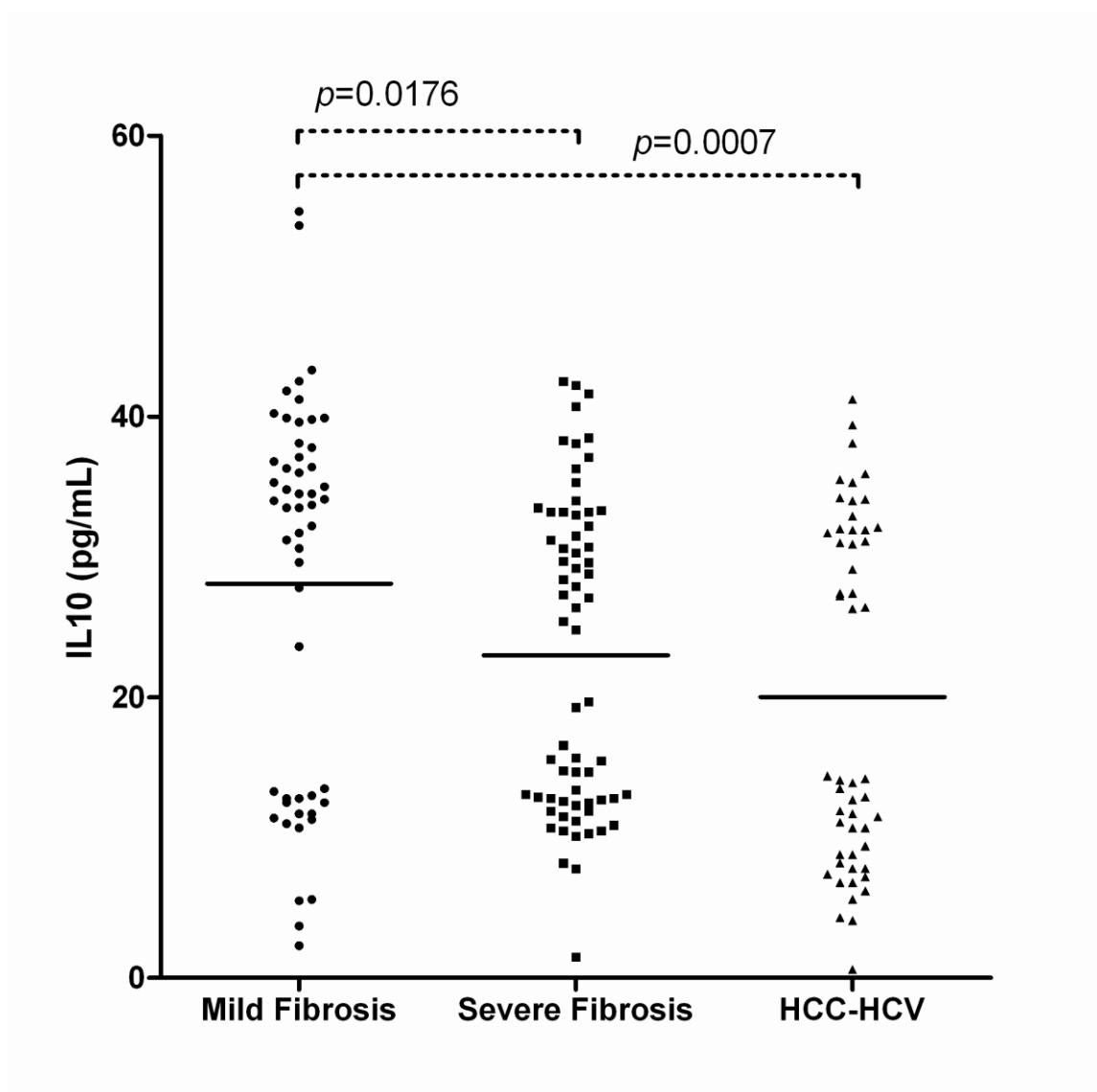
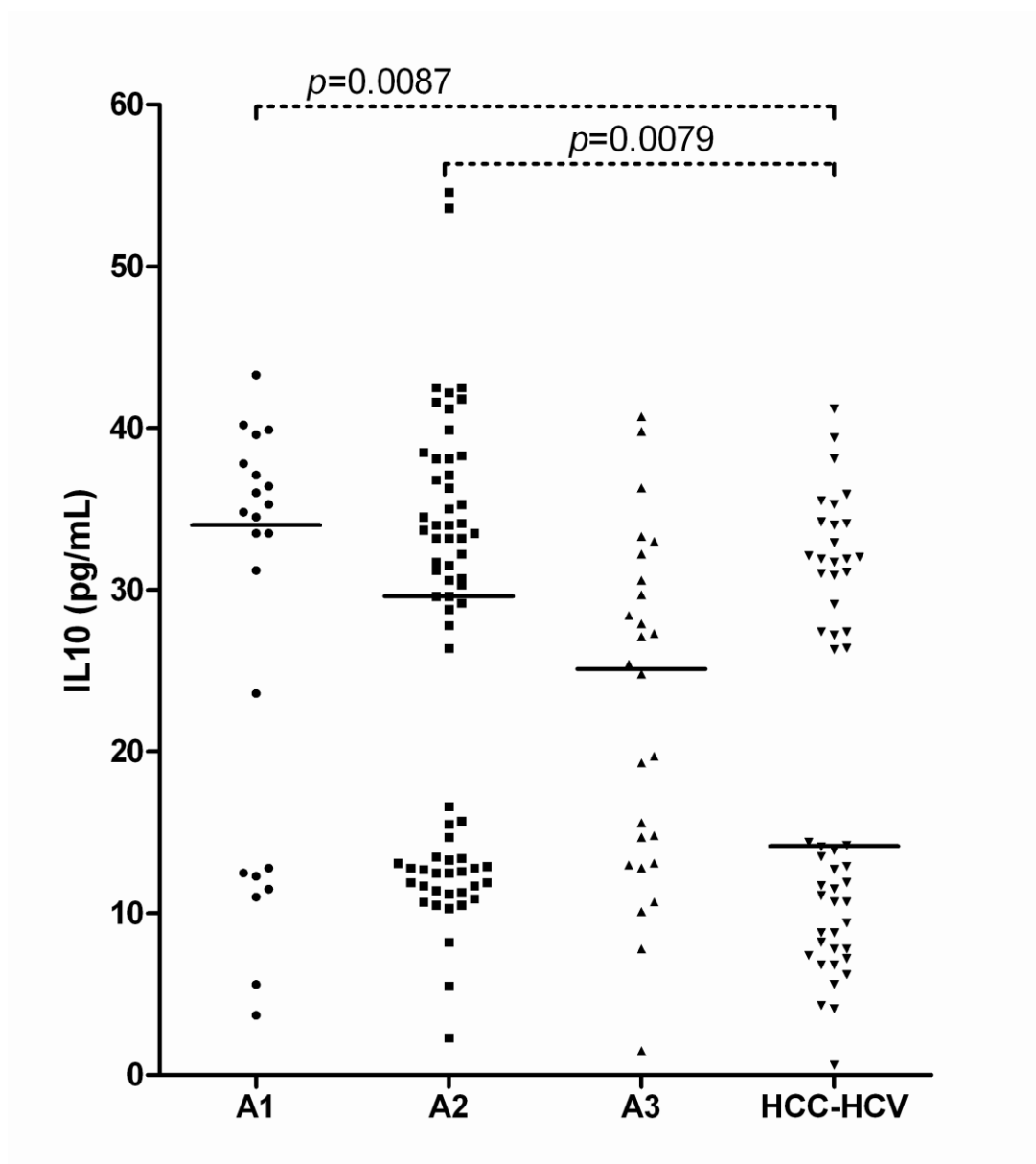


Figure 2



APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS
SUBMETIDO À REVISTA: *Journal of Viral Hepatitis*

Relation between single nucleotide polymorphism of TNF- α -308 (G/A) and liver histology in patients with hepatitis C and hepatocellular carcinoma

Running title: TNF- α -308 (G/A) SNP and liver histology

Aroucha, D.C.B.L.^{1,5,7,8}, Silva, J.L.A.^{1,2}, Carmo, R.F.⁶, Vasconcelos, L.R.S.^{6,8} Moura, P.⁶, Cavalcanti, M.S.M.⁶, Muniz, M.T.C⁶; Aroucha, M.L.⁴ Siqueira, E.R.F.^{7,8}, Cahú, G.G.O.M.², Pereira, L.M.B.^{7,8}, and Coêlho, M.R.C.D.^{1,2,3}

¹Graduate Program in Tropical Medicine, Center of Health Sciences, UFPE, Recife, Brazil; ² Virology Department, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil; ³ Physiology and Pharmacology Department, Center of Biological Sciences, UFPE, Recife, Brazil; ⁴Department of Maternal and Child Health Medicine, Center of Health Sciences, UFPE, Recife, Brazil; ⁵ Center for Elderly Care, Center of Health Sciences, UFPE, Recife, Brazil; ⁶Institute of Biological Sciences of the University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil; ⁷Department of Gastroenterology, School of Medical Sciences, University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil; ⁸Liver Institute of Pernambuco (IFP), Recife, Brazil.

Corresponding author:

Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Rua Clóvis Beviláqua, 50 - Aptº 101

Madalena - 50710-330 - Recife, PE, Brazil.

Phone/fax: +55 81 3082-5111

E-mail: daysearoucha@yahoo.com.br

Abstract

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine that may affect the development and progression of liver fibrosis, viral persistence and therapeutic response in hepatitis C. The TNF- α -308 (G/A) single nucleotide polymorphism (SNP) of the TNF- α gene promoter may influence TNF- α serum levels and play a role in the pathogenesis of liver fibrosis caused by hepatitis C virus (HCV). The aim of the present study was to analyze serum TNF- α levels and the TNF- α -308 (G/A) SNP and assess their associations with liver histology in 119 hepatitis C patients (54 had mild fibrosis and 65 had severe fibrosis) and 52 patients had hepatocellular carcinoma caused by HCV (HCC-HCV). Real-time PCR was used to investigate the TNF- α -308 (G/A) SNP and an enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine serum TNF- α levels. Serum TNF- α levels were higher in patients with HCC-HCV than in hepatitis C patients with mild fibrosis ($p<0.0001$), severe fibrosis ($p=0.004$), mild inflammatory activity ($p=0.0004$) and severe inflammatory activity ($p<0.001$). The frequencies of the TNF- α -308 G allele and the GG genotype of TNF- α -308 (G/A) SNP were significantly higher in patients with HCC-HCV than in hepatitis C patients who presented mild fibrosis and mild inflammatory activity. In conclusion, patients with HCC-HCV had elevated serum TNF- α levels and a higher frequency of allele TNF- α -308 G and genotype GG of TNF- α -308 (G/A) SNP.

Keywords: Inflammatory activity, hepatitis C, hepatocellular carcinoma, liver fibrosis, single nucleotide polymorphism, Tumor necrosis factor alpha.

Introduction

One hundred and seventy million people worldwide are chronically infected with hepatitis C virus (HCV) [1]. Approximately 60-80% of chronic hepatitis C patients may progress to cirrhosis and 20% of these cases may evolve to hepatocellular carcinoma (HCC), which the worldwide incidence is 2% to 8% per year [2-4]. HCC is the fifth most common type of tumor in the world and, when caused by HCV, constitutes the most common indication for liver transplantation [2,5].

Cytokines are among the host's defense mechanisms against the actions of HCV and may induce an inflammatory response with liver damage [6] due to the immune responses or the cytopathic effects of the virus. Cytotoxic T cells and cytokines may be responsible for most of the liver damage in patients infected by HCV [7].

Liver damage in chronic hepatitis is characterized by portal lymphocytic infiltration, focal bridging necrosis and lobular degenerative lesions, likely due to local immune responses [8,9]. These types of damage may be influenced by the local expression of cytokines of the T-helper type 1 profile (Th1), such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α), which interfere with the development and progression of liver fibrosis, viral persistence and therapeutic response [10,11].

TNF- α is a pro-inflammatory cytokine primarily produced by activated macrophages and, in smaller quantities, by other types of cells [12]. Several genetic polymorphisms of TNF- α have been described. The TNF- α -308 (G/A) single nucleotide polymorphism (SNP) of TNF- α gene promoter has two allelic forms. The presence of guanine (G) defines the most common form, the TNF1 allele, and the presence of adenine (A) defines the less common variant, the TNF2 allele [13]. The TNF- α -308 (G/A) SNP has been associated with severe inflammation and autoimmune, infectious and malignant diseases [14].

Given the role of TNF- α as a tumor promoter, the aim of the present study was to determine TNF- α serum levels and assess the genic and genotypic frequencies of the TNF- α -308 (G/A) SNP in hepatitis C patients and patients with hepatocellular carcinoma caused by HCV (HCC-HCV).

Materials and methods

Patient selection

This cross-sectional study with comparison groups evaluated 119 hepatitis C patients (54 with mild fibrosis and 65 with severe fibrosis) and 52 patients with hepatocellular carcinoma caused by HCV. All subjects who attended the Gastrohepatological Center of the University of Pernambuco Oswaldo Cruz Hospital and at the Liver Institute of Pernambuco, both located in northeastern Brazil, between January 2009 and March 2011.

The patients were tested for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (BT), fasting glucose, alpha-fetoprotein (AFP), platelet count, HIV (anti-HIV), hepatitis B (HBsAg, anti-HBs, anti-HBc), and hepatitis C (anti-HCV) serologies. In cases of reactive anti-HCV, HCV-RNA and viral genotyping tests were performed.

Hepatocellular carcinoma caused by HCV was diagnosed by ultrasound, computerized tomography, magnetic resonance imaging, arteriography and tumor biopsy according to the Barcelona criteria [15].

Liver biopsy data from the hepatitis C patients were collected from medical records and classified according to the METAVIR score [16]. It was considered mild fibrosis the gradation of F1 to F2 and severe fibrosis, the cases with gradation of F3 to F4 [17].). With regard to inflammatory activity, mild activity was defined like gradation equal to A1 and severe activity, the cases with gradation of A2 to A3 [18].

Patients that were seropositives for HBsAg and anti-HIV were excluded, as were those undergoing antiviral treatment for hepatitis C.

This study was approved by the research committee of the University of Pernambuco (protocol number 144/2008), and was performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Data Collection

After signing a free and informed consent form, the data were collected through a questionnaire applied by a single researcher. The variables studied included age, gender, source of infection, alcohol consumption (men >40g/day; women >20g/day), smoking, *diabetes mellitus* type II status and body mass index.

Serum TNF- α levels

Five milliliters of peripheral blood was collected by venipuncture in a tube without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C until IL-10 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Quantikine Human TNF- α (R&D System, Minneapolis, MN, USA) performed according to the manufacturer's instructions.

Extraction of genomic DNA

Using the Wizard Genomic Blood DNA Isolation Kit (Promega, UK) according to the manufacturer's instructions, genomic DNA was extracted from a sample of 5.0 mL of peripheral blood collected by venipuncture in a tube with anticoagulant (EDTA) for each patient. The samples were stored at -80 ° C until real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed.

Single nucleotide polymorphisms in TNF- α gene promoter

Real-time PCR *TaqMan*® SNP Genotyping Assays with ID: C___7514879_10 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used to analyze the TNF- α -308 (G/A) SNP, according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

When appropriate, either the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test was used to compare the quantitative variables among hepatitis C patients and patients with HCC-HCV. The chi-squared (χ^2) test was used to compare categorical variables.

The software GraphPad Prism (version 5.0, San Diego, CA, USA) was used to perform the analysis and construct the figures. Multivariate analysis was performed using the backward stepwise method with the software SPSS v.17 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL). To verify the Hardy-Weinberg equilibrium and for the construction of haplotypes, the ARLEQUIN (version 3.11, Bern, Switzerland) program was used. In all analyses, significance was assigned at $p < 0.05$.

Results

Clinical characteristics

A higher proportion of males ($p = 0.005$) and a higher average age ($p = 0.0001$) were present among the patients with HCC-HCV. Clinical features and biochemical parameters revealed an increased frequency of *diabetes mellitus* type II ($p = 0.01$), higher levels of AST, GGT, AP, BT, and AFP ($p < 0.0001$), and thrombocytopenia ($p < 0.0001$) in patients with HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild or severe fibrosis (Table 1).

TNF- α serum levels

Patients with HCC-HCV had higher serum TNF- α levels than hepatitis C patients with mild ($p < 0.001$) and severe ($p < 0.004$) fibrosis (Figure 1).

Regarding inflammatory activity, higher serum TNF- α levels were detected in patients with HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild ($p = 0.0004$) and severe ($p < 0.001$) inflammatory activity (Figure 2).

Single nucleotide polymorphisms in TNF- α gene promoter

The genotype frequencies were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium. The frequencies of the TNF- α -308 G allele ($p = 0.007$) and the TNF- α GG genotype ($p = 0.014$) of TNF- α -308 (G/A) SNP were significantly higher in patients with HCC-HCV than in hepatitis C patients with mild fibrosis (Table 2).

Similarly, the frequencies of the TNF- α -308 G allele ($p = 0.011$) and the TNF- α GG genotype ($p = 0.005$) of TNF- α -308 (G/A) SNP were significantly higher in patients with HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild inflammatory activity (Table 2).

Multivariate analysis of risk factors associated with liver fibrosis

The presence of *diabetes mellitus* type II ($p = 0.049$), higher mean age ($p < 0.0001$) and elevated serum TNF- α levels ($p = 0.003$) were independent risk factors for HCC-HCV compared to hepatitis C patients with mild fibrosis (Table 3).

Regarding patients hepatitis C with severe fibrosis, male gender ($p = 0.001$) and elevated serum TNF- α levels ($p = 0.002$) were independent risk factors for HCC-HCV (Table 3).

Multivariate analysis of risk factors associated with inflammatory activity

The presence of the GG genotype of the TNF- α -308 (G/A) SNP was an independent risk factor for severe inflammatory activity in hepatitis C patients compared to those with mild activity ($p=0.034$) (Table 4).

A thrombocytopenia was a protective factor for severe inflammatory activity ($p=0.013$) and HCC-HCV ($p<0.0001$). High AFP ($p=0.046$) and ALP ($p=0.010$) serum levels were independent risk factors for HCC-HCV in hepatitis C patients with mild inflammatory activity (Table 4).

Discussion

Our results showed that patients with HCV-HCC presented a higher frequency of the TNF308.1 polymorphism (GG) than those with mild fibrosis and inflammatory activity. Also, it was an independent risk factor for patients with severe inflammatory activity and severe fibrosis. These findings support the idea that the genotypic and allelic variants represent important genetic factors for the severity of HCV infection and susceptibility to the development of HCC.

Our results are consistent with the findings reported by Taalat et al (19). However, other studies found the polymorphism of TNF-308.2 as the most frequent in patients with cirrhosis and HCC. Jeng et al (13) demonstrated that the polymorphism of the TNF-2 308 was associated with more severe liver fibrosis and was an independent risk factor for HCC, although the work has been carried out in Taiwan and in patients with HCV and HBV.

Regarding the development of cirrhosis in patients with hepatitis C, Yee et al. (20) showed a 5.1-fold greater risk of those with the polymorphism of TNF -308.A. This polymorphism was also found in HCC patients with HCV and HBV.

The identification of the polymorphism of TNF-308.GG in our study could be partly explained by ethnic aspects, although this statement could be confirmed in further studies with larger numbers of patients and a population of healthy individuals.

Hepatocellular damage causes an inflammatory response and activation of Kupffer cells and hepatic stellate, which amplify the inflammatory process and among the factors involved are the anti-inflammatory cytokines and proinflammatory such as TNF- α (8)

The result of a higher concentration of serum TNF- α in HCV-HCC patients compared to the group of hepatitis C with fibrosis and mild and severe inflammatory activity, was also described by Taalat RM, 2010, who observed a gradual increase in the levels TNF- α in patients infected with HCV at different stages of the disease and HCC. Other studies have reported elevated levels of TNF- α in patients with cirrhosis and acute or chronic hepatitis when compared to healthy subjects (21,22,23)

Thus, the increase risk of HCC development is associated with elevated levels of TNF- α and could be related to the angiogenesis process and metastasis in the site of inflammation (24)

We conclude that increased levels of TNF- α with the gradual progression of fibrosis to cirrhosis in patients with chronic liver disease associated with HCV is a risk factor for cancer development.

Statement of Interests

The authors who participated in this study claim that there is nothing to declare with regards to funding, nor are there any conflicts of interest in relation to this manuscript.

References

1. Te HS, Jensen DM. Epidemiology of hepatitis B and C viruses: a global overview. *Clin Liver Dis* 2010; **14**: 1–21.
2. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 2011; **53**: 1020–1022.
3. Ferenci P, Fried M, Labrecque D *et al.* Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Clin Gastroenterol* 2010; **44**: 239–245.
4. Shiffman ML. Natural history and risk factors for progression of hepatitis C virus disease and development of hepatocellular cancer before liver transplantation. *Liver Transpl* 2003; **9**: S14–20.
5. McGlynn KA, London WT. Epidemiology and natural history of hepatocellular carcinoma. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; **19**: 3–23.
6. Koziel, MJ. Cellular response against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: S25–31.

7. Pawlotski JM. Hepatitis C virus infection: virus/host interactions. *J Viral Hepat* 1998; **5**: 3–8.
8. Bataller R, North KE, Brenner DA. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* 2003; **37**: 493–503.
9. Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 2004; **12**: 96–102.
10. Falasca K, Ucciferri C, Dalessandro M *et al*. Cytokine patterns correlate with liver damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Ann Clin Lab Sci* 2006; **36**: 144–150.
11. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; **134**: 1641–1654.
12. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *J Cell Mol Med* 2004; **8**: 445–454.
13. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY *et al*. Tumor necrosis factor-alpha 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia* 2007; **9**: 987–992.
14. Hajeer AH and Hutchinson IV. TNF-alpha gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc Res Tech* 2000; **50**, 216 – 228.
15. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2005; **42**: 1208–1236.
16. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; **24**: 289–293.
17. Bouzgarrou N, Hassen E, Gabbouj S *et al*. Lack of effect of tumor necrosis factor-alpha-308 G/A polymorphism on severity of liver fibrosis in Tunisian hepatitis C virus (HCV)-infected patients. *Gastroenterol Clin Biol* 2010; **34**: 297–304.
18. Asselah T, Boyer N, Guimont M-C *et al*. Liver fibrosis is not associated with steatosis but with necroinflammation in French patients with chronic hepatitis C. *Scand J Gastroenterol* 2009; **44**: 1638–1643.
19. Talaat RM, Esmail AA, Elwakil R, Gurgis AA, Nasr MI. Tumor necrosis factor-alpha – 308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients. *Chin J Cancer* 2012; **31**(1):29-25.

20. Yee LJ, Tang J, Herrera J, Kaslow RA, Van Leeuwen DJ. Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun* 2000; **1**(6): 386-390.
21. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T et al. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol* 1997; **109**(3): 458-463.
22. Sato T, Asanuma Y, Masaki Y et al. Changes in tumor necrosis factor-a and interleukin-1 production following liver surgery on cirrhotic patients. *Hepatogastroenterology* 1996; **43**(11):1148-1153.
23. Talaat RM. Soluble angiogenesis factor in sera of Egyptian patients with hepatitis C virus infection: correlation with disease severity. *Viral Immunol*, 2010, **23**(2):151-157
24. Akkis H, Bayram S, Bekar A et al. G-308A TNF-a polymorphism is associated risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: Case-control study. *Cancer Epidemiology* 2009; **33**(3-4): 261-4.

Table 1. Distribution of patients with mild and severe fibrosis and HCC according to age, gender, risk factors for infection and biochemical and molecular testing.

	Mild Fibrosis (n=54)	Severe Fibrosis (n=65)	HCC-HCV (n=52)	p
Age (years)	53.5±11.0	59.7±10.1	61.6±8.8	0.0001
Gender (M:F) (%)	31:23 (57:43)	24:41 (37:63)	34:18 (65:35)	0.005
Source of infection				
Glass syringe	44 (81.4%)	48 (73.8%)	45 (86.5%)	0.22
Surgery	37 (68.5%)	41 (63.0%)	37 (71.1%)	0.63
Blood transfusion	17 (31.4%)	34 (52.3%)	19 (36.5%)	0.05
UDI	9 (16.6%)	4 (6.1%)	4 (7.6%)	0.13
Tattoo	3 (5.5%)	1 (1.5%)	0	0.14
Risk factors				
Alcohol consumption	8 (14.8%)	3 (4.4%)	7 (13.4%)	0.13
Smoking	4 (7.4%)	2 (2.9%)	4 (7.6%)	0.48
<i>Diabetes mellitus</i> type II	3 (5.5%)	11 (16.9%)	14 (26.9%)	0.01
BMI	26.9±6.4	26.4±4.6	26.0±3.9	0.69
Biochemical parameters				
AST (IU/mL)	50 (20-286)	76 (24-438)	94 (18-257)	<0.0001
ALT (IU/mL)	63 (12-271)	79 (25-458)	74 (22-307)	0.09
GGT (IU/mL)	67 (11-588)	106 (23-849)	179 (52-778)	<0.0001
ALP (IU/mL)	69 (16-392)	92 (23-418)	144 (61-354)	<0.0001
BT (mg/dL)	0.69 (0.2-4.0)	0.96 (0.3-4.0)	1.40 (0.5-7.2)	<0.0001
AFP (ng/mL)	2.8 (0.5-45.1)	6.5 (0.8-112.0)	87.4 (1.9-100000)	<0.0001
Platelets count	193500 (55000-391000)	140000 (10800-252000)	106000 (13000-314000)	<0.0001
HCV genotypes				
1	35 (64.8%)	49 (75.3%)	37 (71.1%)	0.44 [*]
2	1 (1.8%)	0	1 (1.9%)	
3	18 (33.4%)	16 (24.7%)	14 (27.0%)	

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by the hepatitis C virus, IDU: injecting drug user, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, GGT: gama-glutamyl transpeptidase, ALP: alkaline phosphatase, BT: total bilirubin, AFP: alpha-fetoprotein.

¹Genotype 1 vs. Non-1.

Continuous variables with normal distribution are represented by the mean ± standard deviation. The remaining variables are represented as the median (range).

Table 2. Distribution (panel A) and association (panel B) of the allelic and genotypic frequencies of TNF- α -308 (G/A) SNP in patients with hepatitis C and HCC-HCV.

Panel A		Mild fibrosis (n=54)	Severe fibrosis (n=65)	IA A1 (n=23)	IA A2/A3 (n=96)	HCC-HCV (n=52)
Alleles						
G		83 (76.8%)	119 (91.5%)	31 (67.3%)	171 (89.0%)	95 (91.3%)
A		25 (23.2%)	11 (8.5%)	15 (32.7%)	21 (11.0%)	9 (8.7%)
Genotypes						
GG		32 (59.2%)	55 (84.6%)	10 (43.4%)	77 (80.2%)	43 (82.6%)
GA		19 (35.1%)	9 (13.8%)	11 (47.8%)	17 (17.7%)	9 (17.4%)
AA		3 (5.7%)	1 (1.6%)	2 (8.8%)	2 (2.1%)	0
Panel B						
Statistical analysis			OR	CI	p	
Mild fibrosis vs. HCC-HCV	Allele (G vs. A)		3.18	1.34-8.16	0.007	
	Genotype (GG vs. GA+AA)		3.28	1.34-8.16	0.014	
Severe fibrosis vs. HCC-HCV	Allele (G vs. A)		0.97	0.38-2.45	0.95	
	Genotype (GG vs. GA+AA)		0.86	0.32-2.32	0.80	
A1 vs. HCC-HCV	Allele (G vs. A)		3.75	1.26-11.17	0.011	
	Genotype (GG vs. GA+AA)		5.26	1.49-18.58	0.005	
A2/A3 vs. HCC-HCV	Allele (G vs. A)		1.29	0.57-2.94	0.68	
	Genotype (GG vs. GA+AA)		1.17	0.49-2.83	0.82	

IA: inflammatory activity, A1: inflammatory activity grade 1, A2: inflammatory activity grade 2, A3: inflammatory activity grade 3, HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by the hepatitis C virus, OR: Odds Ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Table 3. Multivariate analysis of factors associated with the progression of fibrosis in patients with hepatitis C.

Variables	Mild fibrosis vs. HCC-HCV		Severe fibrosis vs. HCC-HCV	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
Type II <i>Diabetes mellitus</i>	5.26 (1.01-33.3)	0.049	1.64 (0.59-4.54)	0.342
Age	1.09 (1.05-1.16)	<0.0001	1.04 (1.00-1.09)	0.104
Male	2.56 (0.96-7.14)	0.061	4.76 (1.96-11. 1)	0.001
TNF- α serum levels	1.07 (1.03-1.12)	0.003	1.06 (1.03-1.01)	0.002

HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by the hepatitis C virus, OR: Odds Ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Table 4. Multivariate analysis of the factors associated with the progression of inflammatory activity in patients with hepatitis C.

Variables	A1 vs. A2/A3		A1 vs. HCC-HCV	
	OR (95% CI)	<i>p</i>	OR (95% CI)	<i>p</i>
TNF- α GG genotype	4.11 (1.11-15.21)	0.034	2.43 (0.31-18.97)	0.397
Alpha-fetoprotein	1.16 (0.94-1.43)	0.160	1.24 (1.00-1.54)	0.046
Total bilirubin	1.08 (0.31-3.70)	0.902	2.46 (0.62-9.71)	0.198
AST	1.00 (0.98-1.02)	0.809	0.99 (0.97-1.01)	0.390
Male	0.49 (0.13-1.84)	0.291	3.62 (0.48-27.11)	0.211
Alkaline phosphatase	1.00 (0.99-1.01)	0.291	1.01 (1.00-1.03)	0.010
Platelets	0.98 (0.97-0.99)	0.013	0.96 (0.94-0.98)	<0.0001

A1: inflammatory activity grade 1, A2: inflammatory activity grade 2, A3: inflammatory activity grade 3, HCC-HCV: hepatocellular carcinoma caused by the hepatitis C virus, OR: Odds Ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Figure legends

Figure 1. Association of TNF- α serum levels among patients with HCC-HCV and patients with HCV with mild and severe liver fibrosis. Medians: mild fibrosis (11 pg/mL), severe fibrosis (11 pg/mL) and cancer (20.4 pg/mL).

Figure 2. Association of TNF- α serum levels among patients with HCC-HCV and patients with HCV with mild and severe inflammatory activity. Medians: inflammatory activity A1 (9.01 pg/mL), A2 (11.4 pg/mL), A3 (15.8 pg/mL) and cancer (20.4 pg/mL).

Figure 1

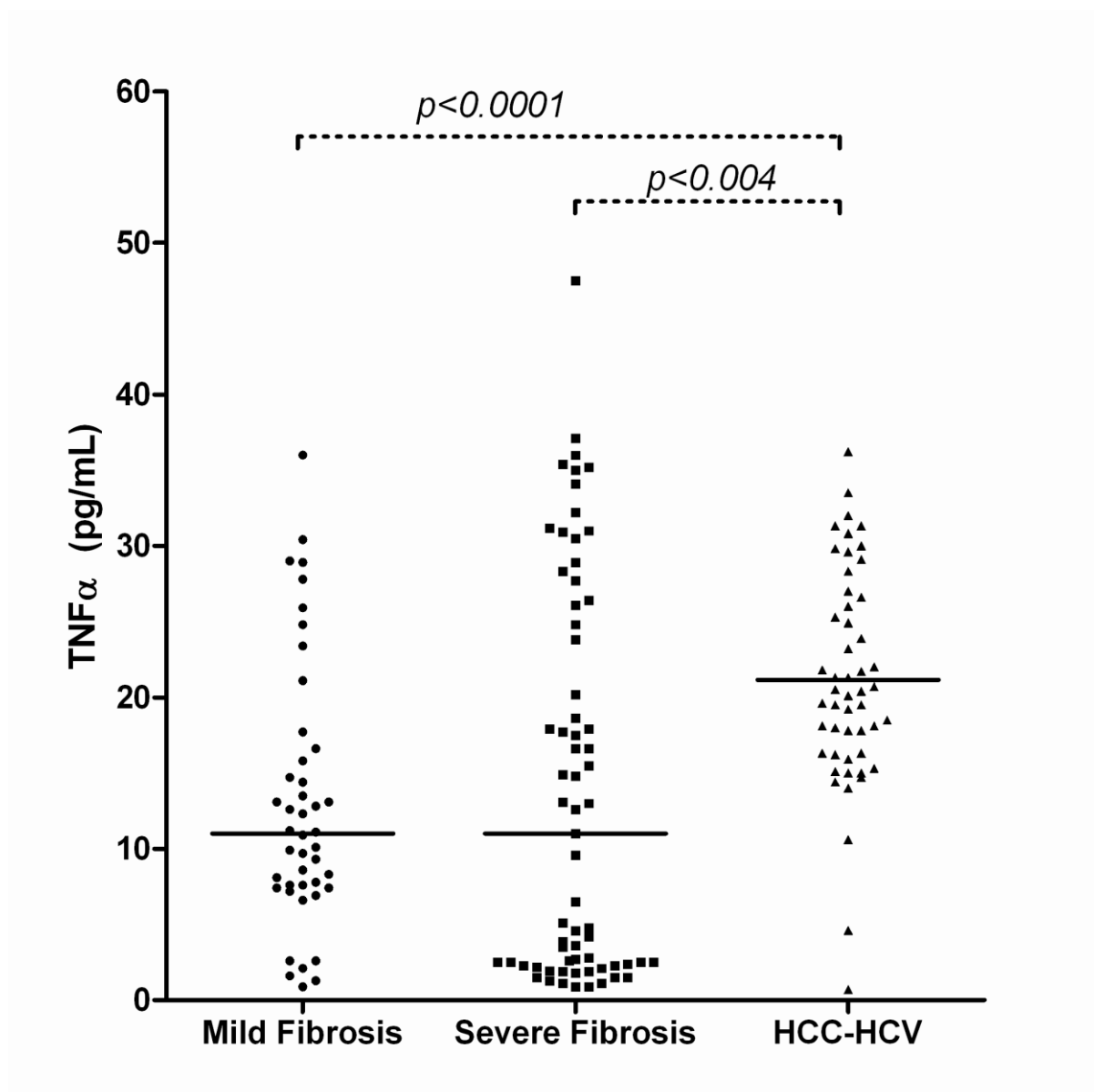
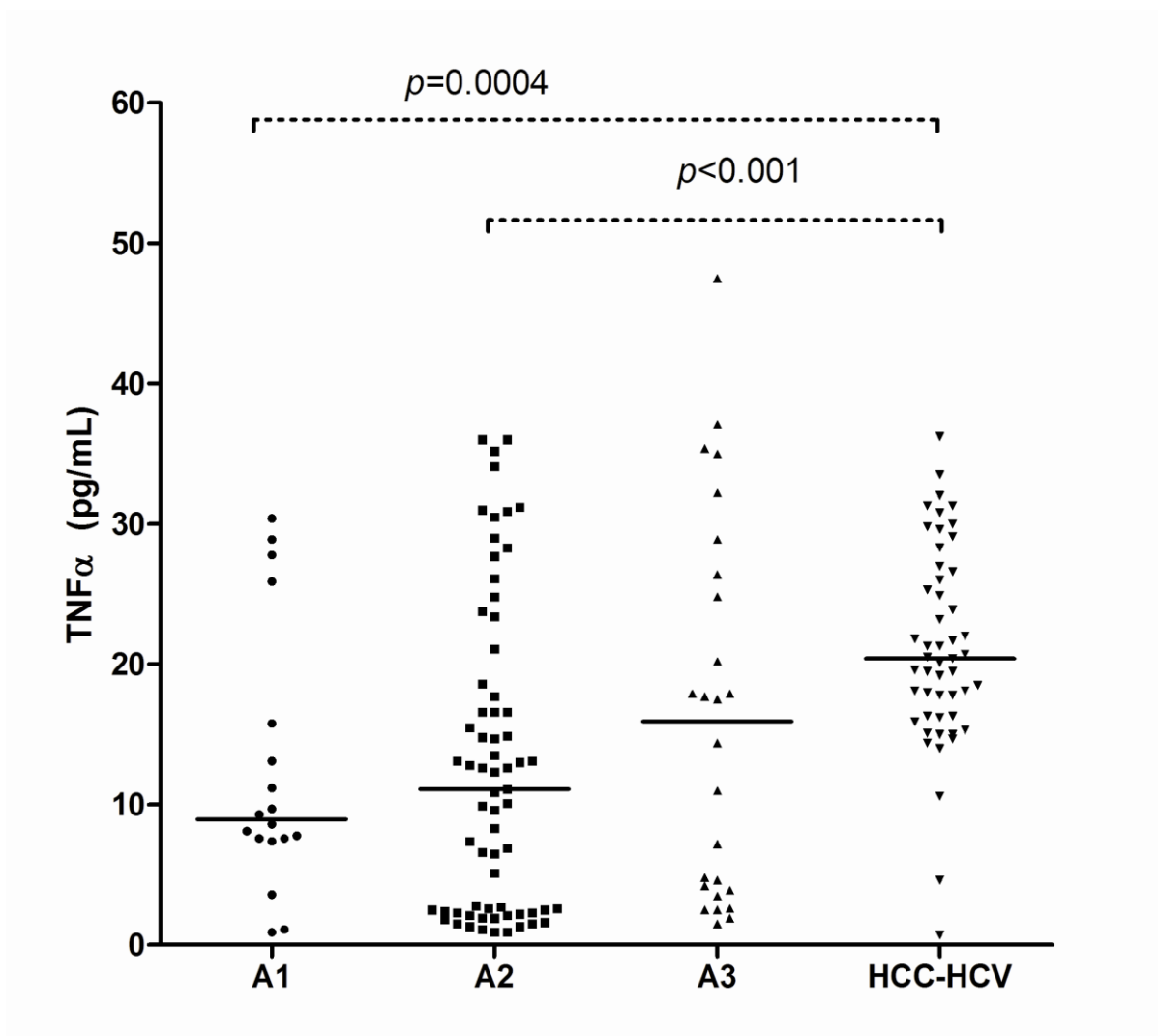


Figure 2



ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS EM SERES HUMANOS (HUOC/UPE)



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Pavilhão Ovídio Montenegro – 1º andar

Rua Arnóbio Marques, 310 – Santo Amaro – 50100-130 – Recife-PE.

Fone: (81) 2101.1530 – Fone/Fax: (81) 2101.1536

E-mail: cephuoc@yahoo.com.br

Reunião: 29/04/2008

Projeto CEP/HUOC: 144/2008

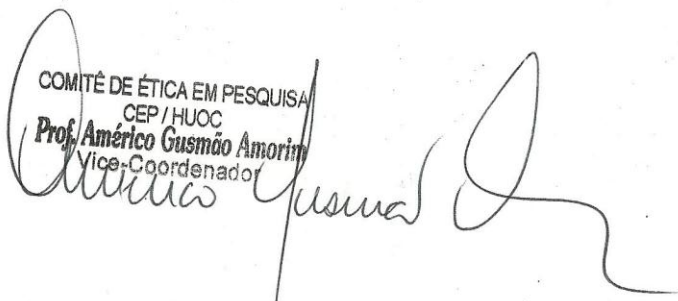
Projeto: *Determinação do polimorfismo dos genes da Interleucina 10 e fator de neurose tumoral em pacientes portadores do carcinoma hepatocelular causado pelo vírus da hepatite C.*

Pesquisador Principal: Dayse Célia Barbosa Lins Aroucha

Resultado:

- Projeto de pesquisa – APROVADO.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CEP/HUOC
Prof. Américo Gusmão Amorim
Vice-Coordenador



ANEXO B – Author Guidelines – Journal of Gastroenterology and Hepatology



Edited by: Geoff Farrell - **Print ISSN:** 0815-9319

Online ISSN: 1440-1746

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2010: Gastroenterology & Hepatology: 33 / 71 **Impact Factor:** 2.41

Author Guidelines

Manuscripts should be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jgh>

AIMS AND SCOPE

The Journal of Gastroenterology and Hepatology (JGH) is the official journal of the Asia Pacific Association for Gastroenterology. The Journal publishes peer-reviewed original papers, reviews, metaanalyses and systematic reviews, and editorials concerned with clinical practice and research in the fields of hepatology, gastroenterology and endoscopy. Papers cover the medical, surgical, radiological, pathological, biochemical, physiological, ethical and historical aspects of the subject areas. Clinical trials are afforded expedited publication if deemed suitable. JGH also deals with the basic sciences and experimental work, particularly that with a clear relevance to disease mechanisms and new therapies. Case reports and letters to the Editor will not be considered for publication.

EDITORIAL REVIEW AND ACCEPTANCE

The acceptance criteria for all papers and reviews are based on the quality and originality of the research and its clinical and scientific significance to our readership. All manuscripts are peer reviewed under the direction of an Editor. The Editor reserves the right to refuse any material for review that does not conform to the submission guidelines detailed throughout this document, including ethical issues, completion of an Exclusive License Form and stipulations as to length.

ONLINE GUIDELINES

The Journal of Gastroenterology and Hepatology is available online, along with journal particulars and these author guidelines at <http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/ISSN1440-1746>.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jgh>.

Authors need to supply an email address as all correspondence will be by email. For assistance please contact: JGH Editorial Office, Ms Shaneen Goodwin

Email: jgh.eo@wiley.com

Tel: 613 9274 3133; Fax: 613 9274 3390.

Submission is via a step-by-step process on the website, once an author has created an account, accessed their 'author dashboard' and clicked on 'click here to submit a new manuscript.'

SUBMISSION REQUIREMENTS

Cover Letter

All authors are required to submit a Cover Letter as part of the submission process on ScholarOne (at Step 5: Details & Comments). This should include a statement covering each of the following areas:

1. Confirmation that all authors have contributed to and agreed on the content of the manuscript, and the respective roles of each author.
2. Confirmation that the manuscript has not been published previously, in any language, in whole or in part, and is not currently under consideration elsewhere. (The Journal's position on possible dual publication in more than one language has been outlined in the following editorial: *Farrell GC. Déjà vu, mais pas en anglais! Precautionary notes on publishing the same article in two languages. J. Gastroenterol. Hepatol. 2007; 22: 1699-1700*).
3. A statement outlining how ethical clearance has been obtained for the research, particularly in relation to studies involving human subjects, and animal experimentation. The institutional ethics committees approving this research must comply with acceptable international standards (such as the Treaty of Helsinki) and this must be stated.
4. For research involving pharmacological agents, devices or medical technology, a clear Conflict of Interest statement in relation to any funding from or pecuniary interests in companies that could be perceived as a potential conflict of interest in the outcome of the research.
5. For clinical trials, that these have been registered in a publically accessible database (see more under 'ETHICAL CONSIDERATIONS (Further Information)' later in these guidelines).

If the above items are not included in the cover letter, manuscripts cannot be sent for review.

Please also note that the cover letter does not require a detailed or lengthy description of the content or structure of the manuscript itself.

Copyright Transfer Agreement (CTA)

This form must be completed at the time of submission. It should preferably be uploaded as a scanned electronic file with the file designation 'copyright form' when uploading manuscript files. In signing the form, it is assumed that authors have obtained permission to use any copyrighted or previously published material. All authors must read and agree to the conditions outlined in the form, and must sign the form or agree that the corresponding author can sign on their behalf. Articles cannot be published until a signed form has been received. Authors can download the form from <http://www.wiley.com/go/ctaaglobal>.

MANUSCRIPT CATEGORIES AND SPECIFICATIONS

All articles, with the exception of Editorials, must contain an abstract of no more than 250 words. Abstracts for original articles should be formatted into subheadings, as detailed below. Titles must not be longer than 120 characters (including spaces).

Editorials

These are invited by the Editor-in-Chief or their delegated editor, and should be a brief review of the subject concerned, with reference to and commentary about one or more articles published in the same issue of JGH. Editorials are generally 1200-1500 words, may contain one table or figure and cite up to 15 references, including the source article [this should be cited as J Gastroenterol Hepatol (year);(vol): [this issue].

Review Articles

JGH welcomes reviews of important topics across the scientific basis of gastroenterology and hepatology, and advances in clinical practice. Most published reviews are in response to editorial invitation, including thematically related "mini-series" of reviews. Authors considering submitting a review for JGH are advised to canvas their possible review with the Editor-in-Chief or a colleague editor; this avoids early rejection if the subject matter is not deemed a high priority for the Journal at the time of submission. Reviews are limited to 3500-5000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 75 references and 3-7 figures or tables.

Meta-Analyses or Systematic Reviews

JGH particularly welcomes submission of Meta-Analyses and Systematic Reviews, which underpin evidence-based medicine. From timeto- time, an honorarium for preparation of these articles may be made available by the JGH Foundation; for up-to-date information, check the JGH website [<http://www.blackwell-synergy.com/loi/jgh>] and recent advertisements in the Journal, or email the Editor-in-Chief. Guidelines for preparation of Meta-Analysis and Systematic Reviews are similar to other reviews, and articles are subject to the usual peer review process. Meta-Analyses and Systematic Reviews have a word limit of 3500-5000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 75 references and 3-7 figures or tables.

Original Articles (including clinical trials)

JGH welcomes original articles concerned with clinical practice and research in the fields of hepatology, gastroenterology and endoscopy. Papers can cover the medical, surgical, radiological, pathological, biochemical, physiological, ethical and/or historical aspects of the subject areas. Clinical trials are afforded expedited publication if deemed suitable. JGH also deals with the basic sciences and experimental work, particularly that with a clear relevance to disease mechanisms and new therapies. Original articles are limited to 3000 words, with an abstract of up to 250 words and up to 50 references and 3-7 figures and tables.

Education and Imaging

The Editors welcome contributions to the Education and Imaging section (Hepatobiliary and Pancreatic or Gastrointestinal). The purpose is to present imaging for the evaluation of unusual features of common conditions or diagnosis of unusual cases. Contributions will be reviewed by the Education and Imaging Coordinating Editors. The format of the Hepatobiliary and Pancreatic Images pages involves two parts, each of which will occupy up to one journal page. In part 1, a case will be described briefly, including a summary of the presentation, clinical features and key laboratory results. One to two key images will then be presented. It is helpful to the reader if the author responds to questions that follow from the images of the case, such as 'What is your diagnosis? What are the features indicated on the CT scan? What is the differential diagnosis?' Part 2 will briefly describe the imaging features, particularly those that lead to diagnosis or which are critical for management. Differential diagnosis should be mentioned. It will be useful to include either further images or pathological details that validate the imaging diagnosis. Occasionally, presentation of analogous cases or related images from a similar case might be appropriate. Please include between one and three references to definitive studies and appropriate reviews of the subject. The format of the Gastrointestinal Images page involves a brief background to and description of the disorder of interest together with two figures of high quality. Colored endoscopic photographs are encouraged. The submission may take the form of a case report or may illustrate particular features from more than one patient.

MANUSCRIPT PREPARATION

Manuscripts should follow the style of the Vancouver agreement detailed in the International Committee of Medical Journal Editors' revised 'Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication', as presented at <http://www.ICMJE.org/>.

The journal uses US spelling and authors should therefore follow the latest edition of the Merriam-Webster's Collegiate Dictionary. All measurements must be given in SI units as outlined in the latest edition of Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors (Royal Society of Medicine Press, London). Abbreviations should be used sparingly and only where they ease the reader's task by reducing repetition of long technical terms. Initially use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation. Upon its first use in the title, abstract and text, the common name of the species should be followed by the scientific name (genus, species and authority) in parentheses. However, for well-known species, the scientific name may be omitted from the article. If no common name exists in English, the scientific name should be used only. At the mention of a chemical substance, give the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names, rather than brand names.

Manuscripts should be presented in the following order:

- (i) title page,
- (ii) abstract and keywords,
- (iii) text,
- (iv) acknowledgments and potential conflicts of interest,
- (v) references,
- (vi) figure legends,
- (vii) tables (each table complete with title and footnotes) and
- (viii) figures.

Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

Title Page

The title page should contain:

- (i) the title of the paper;
- (ii) the full names of the authors; and
- (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with
- (iv) the full postal address and email address, plus facsimile and telephone number of the author to whom correspondence about the manuscript, proofs and requests for offprints should be sent.

The title should be short, informative and contain the major key words. Articles with a title longer than the 120 character limitation may not be sent out for review. A short running title (less than 40 characters, including spaces) should also be provided.

Abstract and keywords

Original articles must have a structured abstract that states in 250 words or less the purpose, basic procedures, main findings and principal conclusions of the study. Divide the abstract with the headings: *Background and Aim, Methods, Results, Conclusions*. The abstracts of reviews need not be structured. The abstract should not contain abbreviations or references. Three to five keywords should be supplied below the abstract and should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser - (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text

Authors should use subheadings to divide the sections of their manuscript: *Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments and References*.

Acknowledgments and potential conflicts of interest

The source of financial grants and other funding should be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. In the case of clinical trials or any article describing use of a commercial device, therapeutic substance or food must state whether there are any potential conflicts of interest for each of the authors: failure to make such a statement may jeopardise the article being sent out for peer-review. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not allowed.

References

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>. The Vancouver system of referencing should be used. In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited only in tables or figure legends, number them according to the first identification of the table or figure in the text. In the reference list, the references should be numbered and listed in order of appearance in the text. Cite the names of all authors when there are six or less; when seven or more list the first three followed by et al. Names of journals should be abbreviated in the style used in MEDLINE. Reference to unpublished data and personal communications should appear in the text only. References should be listed in the following form:

Journal article

1 Nishida T, Kobashi H, Fujioka SI et al. A prospective and comparative cohort study on efficacy and drug resistance during longterm lamivudine treatment for various stages of chronic hepatitis B and cirrhosis. J.

Gastroenterol. Hepatol. 2008; 23: 794-803

Book

2 Takada T. Medical Guideline of Acute Cholangitis and Cholecystitis. Tokyo: Igaku Tosho Shuppan Co; 2005. Chapter in a Book

3 Siewert JR. Introduction. In: Giuli R, Siewert JR, Couturier D, Scarpignato C, eds. OESO Barrett's Esophagus. 250 Questions. Paris: Hors Collection, 2003; 1-3.

Journal article in electronic format

4 Spycher C, Zimmerman A, Reichen J. The diagnostic value of liver biopsy. BMC Gastroenterol. 2001; 1: 12. Cited 22 Nov 2007. Available from URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-230X/1/12>.

Online article not yet published in an issue

5. An online article that has not yet been published in an issue (therefore has no volume, issue or page numbers) can be cited by its Digital Object Identifier (DOI). The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue.

Testro AG, Visvanathan K. Toll-like receptors and their role in gastrointestinal disease. J.Gastroenterol. Hepatol 2009 doi 10.1111/j.1440-1746.2009.05854.x

Tables

- Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text.
- Tables should be cited consecutively in the text and should be numbered using Arabic numerals.
- Each table should be presented on a separate page at the end of the main document file, with a comprehensive, but concise legend above the table.
- Tables should be double-spaced, and should not contain internal lines
- Do not use tabs or spaces to separate data points in tables. Each data point must be contained within a unique cell.
- Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses. All abbreviations should be defined in footnotes.
- For footnotes, use the following symbols, in sequence: †, ‡, §, ¶ (*, **, *** should be reserved for P-values).
- Identify statistical measures of variation, such as standard deviation and standard error of the mean.

Figures

- Illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures.
- Figures should be cited in consecutive order in the text using Arabic numerals.
- Insert easily seen arrows or letters to identify entities (they should be in bold and in colour).
- Photographs should be submitted as high resolution files (at least 300 d.p.i.)
- Photographic images should be provided as .tif or .jpeg files. Provide the figures in their original format where possible. Any accompanying text (figure legends etc.) should be included separately at the end of the main text file. Do not embed photographic images in Word or PowerPoint documents.
- Wherever possible, line figures (graphs and drawings) should be provided as .eps files. If this is not possible, figures should be supplied in their original format. For example, line figures designed in Excel or PowerPoint should be submitted as such, and not embedded in Word (.doc) files.
- Legends must be submitted for all figures, and should be included at the end of the manuscript text. They should be self-explanatory and incorporate definitions of symbols. Abbreviations and units of measurement should be explained so that the figure and its legend are understandable without reference to the text. Indicate the stains used in histopathology. Identify statistical measures of variation, such as standard deviation and standard error of the mean. (Further information about digital graphics standards can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>).

Reproduction of Tables and Figures

If tables or figures have been reproduced from another source, a letter from the copyright holder (usually the Publisher), stating authorization to reproduce the material, must be attached with the cover letter.

Color figures

Color photographs should be submitted as good quality, glossy color prints. A charge of US\$530 for the first three color figures and US\$265 for each extra color figure thereafter will be charged to the author.

Color on the Web Service

If you do not wish to pay for color production in print, your color figures can be reproduced in color online for free. This only applies to figures which are appropriate for reproduction in color online, but black and white in the printed journal. This is not possible for some figure types such as line figures where the figure would have to be altered for print publication (changing colours to grey shading) therefore making the print and online figures different.

ETHICAL CONSIDERATIONS (Further Information)

Authors must state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee (Human or Animal) of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the

provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Tokyo 2004), available at <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>. The Journal of Gastroenterology and Hepatology retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of either human or animal studies. All investigations on human subjects must include a statement that the subject gave informed consent, usually in writing. Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used).

Registration of Clinical Trials

We strongly recommend, as a condition of consideration for publication, registration in a public trials registry. Trials register at or before the onset of patient enrolment. This policy applies to any clinical trial starting enrolment after July 1, 2008. For trials that began enrolment before this date, we request registration by December 1, 2008, before considering the trial for publication. We define a clinical trial as any research project that prospectively assigns human subjects to intervention or comparison groups to study the cause-and-effect relationship between a medical intervention and a health outcome. Studies designed for other purposes, such as to study pharmacokinetics or major toxicity (e.g., phase 1 trials) are exempt. We do not advocate one particular registry, but registration with a registry that meets the following minimum criteria:

- (1) accessible to the public at no charge;
- (2) searchable by standard, electronic (Internet-based) methods;
- (3) open to all prospective registrants free of charge or at minimal cost;
- (4) validates registered information;
- (5) identifies trials with a unique number; and
- (6) includes information on the investigator(s), research question or hypothesis, methodology, intervention and comparisons, eligibility criteria, primary and secondary outcomes measured, date of registration, anticipated or actual start date, anticipated or actual date of last follow-up, target number of subjects, status (anticipated, ongoing or closed) and funding source(s).

Registries that currently meet these criteria include, but are not limited to:

- (1) the registry sponsored by the United States National Library of Medicine (www.clinicaltrials.gov);
- (2) the International Standard Randomized Controlled Trial Number Registry (<http://www.controlled-trials.com>);
- (3) the Australian Clinical Trials Registry (<http://www.actr.org.au>);
- (4) the Chinese Clinical Trials Register (<http://www.chictr.org>); and
- (5) the Clinical Trials Registry - India (<http://www.ctri.in>); (6) University hospital Medical Information Network (UMIN) (<http://www.umin.ac.jp/ctr/>).

Randomized Controlled Trials

Reporting of randomized controlled trials should follow the guidelines of The CONSORT Statement: <http://www.consort-statement.org>. Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to international standards for animal usage in research. These include but are not limited to the NHMRC of Australia, NIH and European Union.

ACCEPTED ARTICLES

Journal of Gastroenterology and Hepatology offers Accepted Articles for selected articles. Accepted Articles is a Wiley-Blackwell service whereby peer-reviewed accepted articles are published online prior to their ultimate inclusion in a print or online issue. Articles published within Accepted Articles have been fully refereed, but have not been through the copy-editing, typesetting and proof correction process.

ONLINE OPEN ARTICLES

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and copyright license form available from our website at: <https://wileyonlinelibrary.com/onlineopen>. (Please note this form is for use with OnlineOpen material **ONLY**). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

PROOFS

It is essential that corresponding authors supply an email address to which correspondence can be emailed while their article is in production. Notification of the URL from where to download a Portable Document Format (PDF) typeset page proof, associated forms and further instructions will be sent by email to the corresponding author. The purpose of the PDF proof is a final check of the layout, and of tables and figures. Alterations other than the essential correction of errors are unacceptable at PDF proof stage. The proof should be checked, and approval to publish the article should be emailed to the Publisher by the date indicated, otherwise, it may be signed off by the Editor or held over to the next issue.

ANEXO C – Author Guidelines – *Journal of Viral Hepatitis*

**Edited by:**

Editor-In-Chief: Howard Thomas US Editor: Nezam Afdhal European Editors: Graham Foster and Peter Karayiannis

Print ISSN: 1352-0504

Online ISSN: 1365-2893

Frequency: Monthly

Impact Factor: 3.502

Author Guidelines

PUBLICATION POLICY

Submission is considered on the condition that papers are previously unpublished, are not offered simultaneously elsewhere, that all authors (defined below) have read and approved the content, that authors have declared all competing interests and the work has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review. The editorial and peer review process is independent of the publisher. Whenever these are relevant to the content being considered or published, the editors and editorial board declare their interests and affiliations. To view a biography of the Editors and their disclosures, click on the Editor's name.

[Howard Thomas](#)

[Peter Karayiannis](#)

Licensing

Manuscripts will be considered for publication in the form of original articles, reviews, short rapid communications and letters. Letters to the Editor are possible and encouraged. Papers accepted must be licensed for publication in the *Journal of Viral Hepatitis* and a completed [Copyright Transfer Agreement](#) must accompany every accepted paper (see below). Authors will be required to transfer copyright in their paper to Wiley-Blackwell. Copyright transfer is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been transferred.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley InterScience, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>.

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Ethics

Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the World Medical Association Declaration of Helsinki <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm> and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. A completed [Col](#) form must accompany every accepted paper (see below).

Authorship

Authors must fulfil the following three criteria

- substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data
- drafting the paper or revising it critically
- approval of the submitted and final versions

Clinical trials

Clinical trials should be registered and publications must include the registration number and name of the trial register. If not available, please provide an explanation.

All articles are subject to review by experienced referees. The editors judge manuscripts suitable for publication. All decisions made by the editors are final.

Material accepted for publication is copy-edited and typeset. Proofs are then sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

SUBMISSION

Over the past few years, *The Journal of Viral Hepatitis* has become one of the leading journals in the field of virology and infectious disease. This is reflected by the steadily increasing number of high-quality manuscripts submitted to the Journal. With the exception of invited reviews, the Editors have decided to restrict the length of a manuscript to **4000 words**, **excluding** acknowledgements and disclosures, references, tables, figure and table legends and figures, and to limit the number of figures and tables to a maximum of **six** items in the print edition of the Journal (e.g. four figures and two tables) in normal circumstances, with any additional material published online as supplementary material. Manuscripts that do not meet these formal criteria will be returned for reformatting, which will delay submission. Exceptions to these guidelines may be made in certain circumstances, at the discretion of the Editors. If you require an exemption, please indicate this in your cover letter. The length of invited review articles remains at 5000 words and 50 references.

Article types

Reviews

The reviews are focused topical accounts that highlight new and/or controversial areas. The length of the review article is typically limited to 5000 words and 50 references. All reviews are subject to review by experienced referees. The Journal welcomes un-solicited reviews, but reserves the right to reject these without formal review.

Original articles

Original articles describe the results of basic or clinical studies, clinical trials or significant case reports.

Rapid communications

Manuscripts submitted for the "short communications" section should be no more than 1,500 words in total, include only one figure and a maximum of 8 references. They will be reviewed and accepted by the Editors on the basis of their outstanding scientific value and the presentation of novel insights into health or disease. "short communication" articles will be only accepted with minor changes. Publication will be in the next available issue with the aim to publish the manuscript about two months after submission. The Editors reserve the right to reject the manuscript without formal review. Rejection for inclusion in the "short communications" section does not disqualify for resubmission as an original article.

Letters to the Editors

Letters to the Editors offer opinions on papers published in *the Journal of Viral Hepatitis*. Text should not exceed 400 words, and include no more than 5 references. Letters commenting on papers are sent to the authors of those papers for a response. Letters are selected for their importance, relevance, and originality; not all letters submitted can be published.

Book reviews

The Journal of Viral Hepatitis **does not** publish Book Reviews.

Help for authors

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Digital artwork preparation

Guidance on the preparation and submission of figures, links to useful websites and access to both the Wiley-Blackwell house and journal-specific style guides can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp>

Acceptable file formats

Text: Manuscript should be submitted as one text file in either Word document (.doc), or RTF (.rtf). Do not submit your file as a PDF.

Tables: Should form an integral part of the text file. Tables submitted as photographs or graphics will be rejected and delay the submission process.

Figures: You are required to upload high resolution graphics files. Micrographs (tone) should be supplied as TIFF (.tif); labelled micrographs (combination) or charts/ graphs/ diagrams (line) can be supplied as a TIFF or EPS (.eps) format. Details of how to prepare figures can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> Figures for review must be uploaded separately and conform to the same standards as the Figures for

publication. They should not be embedded into the text of your initial submission.

Manuscripts

The Journal of Viral Hepatitis only accepts submission at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvh>. This enables rapid and effective peer review. Contributions will be acknowledged automatically by the editors and assigned a unique manuscript number that must be quoted on correspondence. Papers and reviews are refereed by experts in the field; the Editors reserve the right to reject an article without review.

Full upload instructions and support are available online from the submission site via the "Get help Now" button. Please submit your covering letter or comments to the editor as well as the names of potential referees when prompted online.

Revisions

The editors have designated three types of revision for manuscripts in the Journal:

Minor revisions: these in general require only changes to the manuscript or easily conducted experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form no later than four weeks of receipt of a revision letter from the Editor.

Major revisions: these require changes to the manuscript and significant additional experiments. Revised manuscripts must be submitted in their final form within three months of receipt of a revision letter from the editor.

Resubmission: these require extensive revision, with new experiments and major re-writing. Revised manuscripts must be submitted in their final form within four months of receipt of a revision letter from the Editor. In all cases, resubmissions after the allotted time will be considered as new submissions.

Presentation

Text

Manuscripts should be typed in a standard, easy to read font, either 11 or 12 point in size. Manuscripts should be double-spaced, with 2.5cm (1 inch) margins on all sides and run in one single column. Please ensure that you have turned "track changes off" and removed any reviewing notes from your manuscripts else these will be visible throughout the review process. Place the page number and first authors last name in the upper right-hand corner of each page.

Reviews should be divided onto the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations), (2) abstract and keywords, (3) body of the article, (4) acknowledgments and disclosures; (5) references, (6) tables, (7) figure legends, and (8) figures.

Original articles should be divided into the following sections and appear in the following order: (1) title page (with short running page heading, title, authors names and affiliations) (2) abstract and keywords, (3) Introduction, (4) materials and methods, (5) results, (6) discussion, (7) acknowledgements and disclosures, (8) references, (9) appendices, (10) supplementary material, (11) tables, (12) figure legends, and (13) figures.

Title Page

On the title page provide the complete title and a running title (not to exceed 45 characters and spaces). List each contributor's name and institutional affiliation. Provide the name, postal and e-mail address, fax and telephone number of the contributor responsible for the manuscript and proofs. This is the person to whom all correspondence and reprints will be sent. The corresponding author is responsible for keeping the Editorial office updated with any change in details until the paper is published.

Abstract and Key Words

The abstract must not exceed 250 words. It should summarize the aim of the study and describe the work undertaken, results and conclusions. In addition, you should list up to six key words in alphabetical order. For ideas on optimising your abstract, see [here](#).

Introduction

This section should not exceed more than 500 words and should not have a separate heading. The Introduction should briefly discuss the objectives of the study and provide the background information to explain why the study was undertaken, and what hypotheses were tested.

Materials and methods

Animal preparation and experimentation should cite the approving governing body. Equipment and apparatus should cite the make and model number and the company name and address (town, county, country) at first mention. Give all measurements in metric units and use negative indexing (mg mL⁻¹, not mg/mL). Use generic names of drugs. Symbols, units and abbreviations should be expressed as Système International (SI) units. In exceptional circumstances, others may be used, provided they are consistent. Apply to the editorial office for advice.

Results

Tables and text should not duplicate each other.

Discussion

This section should not exceed more than 1,500 words and should be concise. The Discussion should include a brief statement of the principal findings, a discussion of the validity of the observations, a discussion of the findings in light of other published work dealing with the same or closely related subjects, and a statement of the

possible significance of the work. Authors are encouraged to conclude with a brief paragraph that highlights the main findings of the study.

Acknowledgements and disclosures

It is the duty of authors to acknowledge funding sources, technical assistance, provision of materials or reagents and other matters that might pertain to the paper. Authors must acknowledge individuals who do not qualify as authors but who contributed to the research. If the work was sponsored by an organization or industry, it is essential this be declared and the authors need to indicate that they had complete access to the data that supports the publication. If the paper was written by a professional medical writer, this must be declared. Please read the following statements, adding those sections which are relevant at the end of your submitted manuscript under a heading 'Statement of Interests'.

1. Authors' declaration of personal interests:

(i) [Name of individual] has served as a speaker, a consultant and an advisory board member for [names of organizations], and has received research funding from [names of organization].

(ii) [Name of individual] is an employee of [name of organization].

(iii) [Name of individual] owns stocks and shares in [name of organization].

(iv) [Name of individual] owns patent [patent identification and brief description].

2. Declaration of funding interests:

(i) This study was funded [in part or in full] by [insert name of funding organization and provide funding identification numbers], grant number [insert grant or other identification number].

(ii) The [writing or preparation] of this paper was funded in part by [insert name of funding organization].

(iii) Initial data analyses were undertaken by [name of individuals if not listed as authors] who are employees of [name company] and received funding from [insert name of funding organization].

(iv) Writing support was provided by [insert name of individual(s)] of [name company] and funded by [insert name of funding organization]. Manuscript Style

References

The reference style is Vancouver (numbered). References must be numbered consecutively and cited in the text using arabic numerals within parentheses. The reference list should conform to the style used by the National Library of Medicine and Index Medicus. Work that has not been accepted for publication should not appear in the reference list. It may be cited in the text as unpublished data. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting.

EndNote reference styles can be searched for here:

<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here:

<http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Journals

List all authors when six or fewer; when seven or more, list only the first three and add *et al.* Journal titles should be cited in full: Caniano DA, Kanoti GA. Newborns with massive intestinal loss: difficult choices. *N Engl Med* 1988; **318**: 70-87.

Books and Monographs

Personal author

Bateson M, Bouchier I. *Clinical Investigation and Function*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1981.

Corporate author

The Geological Society. List of serial publications held in the library of the Geological Society, London. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1987.

Editor, Compiler, Chairman as author

Booth CC, Neal AB, eds. *Disorders of the Small Intestine*. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1985.

Chapter in book

Morson BC, Dawson IMP. Mechanical disorders In: Morson BC, Dawson IMP, eds. *Gastrointestinal Pathology*, 2nd edn. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd, 1979: 267-71.

Abbreviations

Include in the manuscript a list of new or special abbreviations along with the spelled out form or definition. For commonly accepted abbreviations, word usage, symbols, etc., authors are referred to the CBE Style Manual published by the American Institute of Biological Sciences or Units, Symbols and Abbreviations published by the Royal Society of Medicine.

Tables

Tables should be numbered consecutively within the text. Tables and text should not duplicate each other. If possible, hold tables to one standard manuscript page; if the table continues past one page, repeat all column headings and the stub (left-hand column). Explain all abbreviations in a footnote. Provide a number and title for each table. Regardless of authorship or publisher, permission must be received in writing for its use if a table has

been previously published. Include an acknowledgement of the original source in a footnote. Tables should not be submitted as photographs or graphics files.

Figures

Labelling should be in 8pt Helvetica or Arial. Figure sections should be designated with upper case letters. Magnification (scale) bars should be given on electron and light micrographs. Details of the magnification bar should be noted in the figure legends. Authors may be asked to contribute to printing costs if the space requested for illustrations is considered too large or if colour photographs are requested.

Figure and table legends

Cite all tables and figures in the text, numbering them sequentially as they are cited. Each figure must have a corresponding legend. The legend must be numbered with an arabic number that corresponds to the illustration as it appears in the text. Each should begin with a short title for the figure. Legends to tables (where necessary) and figures should contain sufficient information to be understood without reference to the text. Explain all symbols, arrows, numbers, or letters used in the figure and provide information on scale and/or magnification. For photomicrographs, include information on the method of staining or preparation.

Supplementary material

Quantitative or qualitative data too extensive for inclusion in the print edition of the Journal may be presented in the online edition, as supplementary material. It must be included as part of the original submission and will be reviewed as an integral part of the paper. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript, to appear after the references at the end of the paper, providing titles of figures, tables, etc. formatted as if the material was to appear in the print edition. We welcome audio and video material, if relevant to your paper. Full details on how to submit supplementary material, including videos, can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp>.

Word 2007

Please note that Word 2007 is not yet compatible with journal production systems. Unfortunately, the journal cannot accept Microsoft Word 2007 documents until such time as a stable production version is released. Please use Word's 'Save As' option therefore to save your document as an older (.doc) file type.

Supporting Documents

These forms must accompany your accepted manuscript and are a condition of publication. All forms are available to download from the *The Journal of Viral Hepatitis* submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jvh>. They can either be uploaded as supporting documents to your manuscript (preferred) or where this is not possible, faxed to the editorial office (Fax): +44 (0) 208 220 7791.

Copyright Transfer Agreement

Once a paper is accepted for publication, authors are required to sign an [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) granting the publisher exclusive publishing rights. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher unless a signed form has been received. (US Federal Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various media/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to [download](#) a copy of the form. Upon acceptance, please return your completed form via email or fax to:

Jothi Ponmudi
Production Editor
Journal Content Management
John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd
1 Fusionopolis Walk
#07-01 Solaris South Tower
Singapore 138628

Tel: +65 6643 8481
Fax: +65 6643 8599
Email: jponmudi@wiley.com

Conflict of Interest statement

The Journal insists on **full disclosure of competing financial and other interests** from all authors. **This is mandatory and a condition of publication.** A completed Col form must accompany every accepted paper.

Colour Work Agreement

It is Journal policy to charge authors for colour reproduction. If you wish your figures to be reproduced in colour, you must complete and return a [Colour Work Agreement form \(CWAf\)](#) before your paper can be published.

POST ACCEPTANCE

Article Tracking

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production

process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Proofs

Proofs will be available as a PDF to download from our e-proofing website. Full instructions will be sent via email notification when the proof is ready for collection. Adobe Acrobat Reader is required in order to read this file, which can be downloaded (free of charge) from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readmain.html>. In your absence, please arrange for a named colleague to correct on your behalf. Major alterations will be charged to the author and can delay publication.

Proofs must be returned by **fax or email** only to the [production editor](#) within three days of receipt of notification. We cannot accept proofs by post - and any late return of proofs will lead to delayed publication of your paper to avoid any delay in publication of an issue. **Authors will receive one set of proofs only.**

Offprints

A PDF is provided upon publication to the corresponding author. Paper offprints can be purchased prior to print publication from http://offprint.cospinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG.

Archiving Policy

Unless specifically requested at submission, the publisher will dispose of all material submitted 2 months post publication.

ANEXO D – NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com:

Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 14724 (dez. 2005), os princípios gerais para a elaboração de trabalhos acadêmicos. Constitui um estudo ao conteúdo da norma, apresentando por vezes o texto original.

A NBR 14724 contém disposições de outras normas de documentação que também devem ser seguidas ao se elaborar um trabalho acadêmico: ABNT. NBR 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

As bibliotecas da Universidade Federal de Pernambuco. Serviço de Biblioteca e Documentação disponibilizam para consulta as normas de documentação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e oferecem à comunidade acadêmica o serviço de orientação para normalização de trabalhos acadêmicos.