



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

RITIANE SENA CAETANO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERLEUCINA 28B (IL-28B)
EM PACIENTES PORTADORES DO *VÍRUS DA HEPATITE C* (VHC)

BELÉM-PA

2017

RITIANE SENA CAETANO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERLEUCINA 28B (IL-28B)
EM PACIENTES PORTADORES DO *VÍRUS DA HEPATITE C* (VHC)

Trabalho de conclusão de curso apresentado à faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Vânia Nakauth Azevedo

Co-orientador (a): Msc. Keyla Santos Guedes de Sá

BELÉM – PA

2017

RITIANE SENA CAETANO

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA INTERLEUCINA 28B (IL-28B)
EM PACIENTES PORTADORES DO *VÍRUS DA HEPATITE C* (VHC)

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito para obtenção de grau de
Bacharel em Biomedicina.

Belém (PA), 17 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora:

Orientadora: _____
Prof^ª. Dr^ª. Vânia Nakauth Azevedo
Labvir/ICB/UFPA

Avaliador 1: _____
Dra. Rosimar Neris Martins Feitosa
Labvir/ICB/UFPA

Avaliador 2: _____
Dra. Ednelza da Silva Graça Amoras
Labvir/ICB/UFPA

Avaliador 3: _____
(suplente) Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto
Labvir/ICB/UFPA

*“A melhor maneira que o homem dispõe
para se aperfeiçoar é aproximar-se de
Deus.”*

(Pitágoras)

*Dedico esta monografia à minha família,
por serem a minha maior fonte de
motivação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pelo seu amor incondicional, e que sempre me deu forças, saúde e me guiou até aqui.

Agradeço aos meus pais pelo amor, dedicação, incentivo, educação e pelos valores e princípios ensinados.

Agradeço ao meu namorado Diego, que também é meu melhor amigo, pelo amor, carinho e compreensão.

Agradeço aos meus amigos pela amizade e companheirismo ao longo desses quatro anos da graduação.

Agradeço a todos os docentes que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Virologia, especialmente, ao Prof^o. Dr^o. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vânia Nakauth Azevedo e a Msc Keyla Santos Guedes de Sá, pela orientação e colaboração para a realização deste trabalho, e, pela oportunidade de ter feito parte desse grupo excelente de pesquisadores.

Agradeço a Universidade Federal do Pará, ao Instituto de Ciências Biológicas e a Faculdade de Biomedicina, no qual, tenho orgulho de ter pertencido.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste Trabalho de Conclusão de Curso.

RESUMO

Introdução: As hepatites virais representam um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo. Estima-se que a maioria dos pacientes com hepatite C aguda torna-se crônicos e podem evoluir para a fibrose e cirrose. A IL-28B é uma citocina também chamada de interferon $\lambda 3$ (IFN- $\lambda 3$). As citocinas IFN- λ são induzidas por infecções virais e desempenham capacidade antiviral para alguns vírus, como o *vírus da hepatite C* (VHC). **Objetivos:** Investigar a expressão gênica da IL-28B no tecido hepático de pacientes portadores crônicos da infecção pelo VHC, correlacionando com os aspectos clínicos e laboratoriais da infecção. O estudo foi do tipo transversal e analítico, realizado no ambulatório de doenças hepáticas do Hospital da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA). A população de estudo foi composta por 21 indivíduos, sendo por portadores de hepatite C crônica (n=13) e o grupo controle (n=8). Os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente e submetidos à investigação complementar constando de exames clínicos, laboratoriais, virológicos e histopatológicos. **Materiais e métodos:** A quantificação relativa do gene alvo e o cálculo do intervalo de confiança foram realizados utilizando o método CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$). **Resultados:** Houve menores níveis de expressão gênica no grupo com VHC quando comparados ao grupo controle, sendo estatisticamente significativo ($p=0,0109$). Os níveis de expressão gênica foram menores no grupo sem fibrose e no grupo com fibrose/cirrose do que no grupo controle, sendo estatisticamente significativo ($p=0,0378$). A expressão gênica foi menor no grupo com inflamação leve e no grupo com inflamação moderada do que no grupo controle, sendo estatisticamente significativo ($p<0.05$). Não houve diferenças estatísticas significativas entre a expressão gênica e o estadiamento da fibrose hepática e o grau de inflamação, e observou-se uma correlação positiva em ambos ($p=0,3804$ e $p=0,7476$). Não houve diferença estatística significativa entre a expressão gênica da e a enzima hepática ALT no grupo controle e nem grupo com VHC ($p=0,4976$ e $p=0,1517$), e observou-se uma correlação positiva em ambos os grupos. Não houve diferença estatística significativa entre a expressão gênica da e a enzima hepática AST no grupo controle e nem no grupo com VHC ($p=0,8397$ e $p=0,6335$), e observou-se uma correlação positiva no grupo com VHC e uma correlação negativa no grupo controle. Não houve diferença estatística significativa entre a expressão gênica e a enzima hepática GGT no grupo controle e nem no grupo com VHC ($p=0,3956$ e $p=0,6167$), e observou-se uma correlação negativa em ambos os grupos. **Conclusão:** A expressão gênica reduzida da IL-28B pode está associada com os aspectos clínicos da doença hepática na infecção crônica pelo VHC. O aumento progressivo da expressão gênica da IL-28B pode contribuir para a progressão da doença hepática na infecção pelo VHC. A quantificação da expressão gênica da IL-28B pode ser útil para monitorar a infecção crônica pelo VHC e colaborar no melhor entendimento do papel da IL-28B na defesa antiviral do hospedeiro.

Palavras-chave: *Vírus da hepatite C*; Pacientes portadores crônicos da infecção pelo VHC; Expressão gênica da IL-28B.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Representação esquemática da partícula do VHC	02
Figura 2: Representação esquemática do genoma do VHC	02
Figura 3: Representação esquemática da entrada na célula-alvo e replicação e replicação do VHC	05
Figura 4: Prevalência global da infecção pelo VHC	07
Figura 5: Prevalência global dos genótipos do VHC	07
Figura 6: Taxa de detecção de hepatite C por ano no BRASIL (2002–2015)	08
Figura 7: Representação gráfica da infecção crônica pelo VHC	10
Figura 8: Representação esquemática da história natural da doença hepática crônica	12
Figura 9: Representação esquemática da sinalização da IL-28B (IFN- λ 3)	15
Figura 10: Média dos níveis de RNAm da IL-28B no grupo de pacientes portadores do VHC vs grupo controle	22
Figura 11: Médias dos níveis de expressão gênica da IL-28B nos pacientes sem fibrose, com fibrose/cirrose e no grupo controle (A) e quanto à atividade inflamatória (B) nos pacientes sem inflamação, com inflamação leve, com inflamação moderada e no grupo controle	23
Figura 12: Correlação dos níveis de RNAm da IL-28B entre o estadiamento de fibrose (A) e o grau de atividade inflamatória (B) hepática dos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC	24
Figura 13: Correlação entre os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT (A e B), AST (C e D) e GGT (E e F) e os níveis de RNAm da IL-28B no grupo controle e nos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)</i>	1
1.1.1 Breve Histórico	1
1.1.2 Morfologia e o genoma do VHC	2
1.1.3 Ciclo de vida e replicação do VHC	4
1.1.4 Transmissão do VHC	6
1.1.5 Epidemiologia do VHC	6
1.1.6 Diagnóstico do VHC	9
1.1.7 História natural da hepatite C crônica	11
1.1.8 Patogênese da infecção pelo VHC	13
1.2 A INTERLEUCINA 28B (IL-28B) E A SUA FUNÇÃO NA INFECÇÃO PELO VHC	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	18
3.1.1 População de estudo	18
3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão	18
3.2 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS	19
3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	19
3.3.1 Exames bioquímicos e sorológicos	19
3.4 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	19
3.4.1 Extração de RNA	19

3.4.2 Transcrição Reversa (cDNA)	20
3.4.3 Quantificação da expressão gênica da IL-28B por PCR em Tempo Real (qPCR)	20
3.5 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS	20
3.6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	21
4 RESULTADOS	22
5 DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	29
7 REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

1.1.1 Breve Histórico

A descoberta do vírus da hepatite do tipo C foi primeiramente sugerida por Prince et al. (1974), que relataram casos de hepatite pós transfusional em pacientes submetidos à cirurgia cardiovascular. Nesses casos a sorologia se revelou negativa à exposição ao *vírus da hepatite B*, e os períodos de incubação e as características clínicas e epidemiológicas também não se enquadravam ao *vírus da hepatite A*. Assim, para o controle da hepatite pós transfusional seria indispensável à identificação da existência de um possível vírus da hepatite do tipo C.

Dienstag et al. (1977) utilizaram testes mais específicos para a detecção de anticorpos contra o antígeno da hepatite A, e concluíram que os casos relatados de hepatite pós transfusional não foram causados pelo *vírus da hepatite A*, sustentando assim, a evidência da existência de um possível vírus da hepatite que passou a ser denominado Não A e Não B (NANB).

Finalmente, Choo et al. (1989) por meio da técnica de clonagem de cDNA do plasma de chimpanzés infectados, utilizando bacteriófagos λ gt11, constataram que os clones obtidos derivavam de um genoma de um vírus de RNA de cadeia simples e positiva; tamanho inferior a 80 nm de diâmetro com no mínimo 10.000 nucleotídeos e de envelope lipídico comprovado pela sensibilidade a solventes orgânicos. Assim, sugeriram que o vírus NANB pertencia aos membros da família *Togaviridae* ou *Flaviviridae*, e passou a ser denominado vírus da hepatite C. Entretanto, somente em 1991, o genoma completo do *vírus da hepatite C* foi descrito, assim como, a sua organização e diversidade genética (CHOO et al., 1991).

1.1.2 Morfologia e o genoma do VHC

O vírus da hepatite C (VHC) pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus* (ICTV, 2015). A partícula viral completa mede cerca de 50 nm de diâmetro, sendo envelopado e de simetria icosaédrica, composto de RNA de fita simples de polaridade positiva (CHOO et al., 1989; GOMES e NIEL, 2013) (Figura 1).

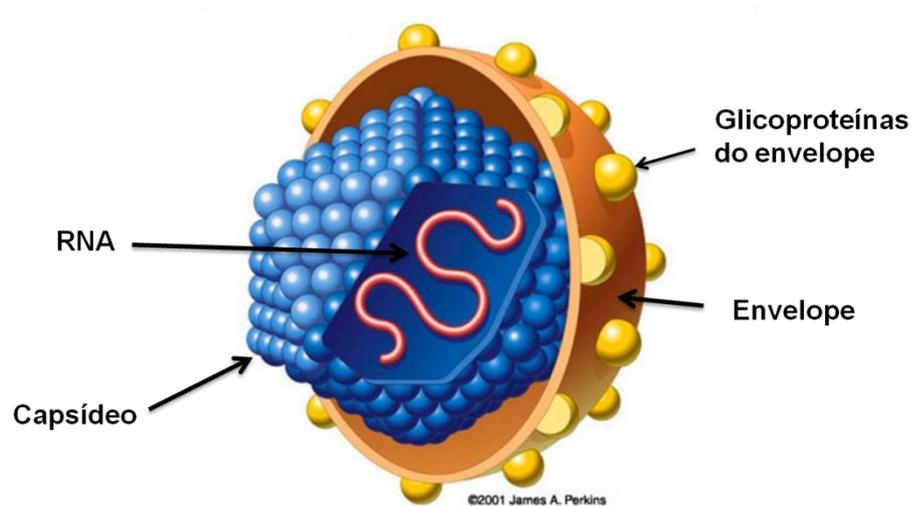


Figura 1: Representação esquemática da partícula do VHC (Adaptado de Perkins, 2001).

O genoma possui aproximadamente 9,6 Kb, composto por duas regiões não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3' e uma região de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORF) que codifica uma poliproteína de 3.011 aminoácidos (CHOO et al., 1991; GOMES e NIEL, 2013) (Figura 2).

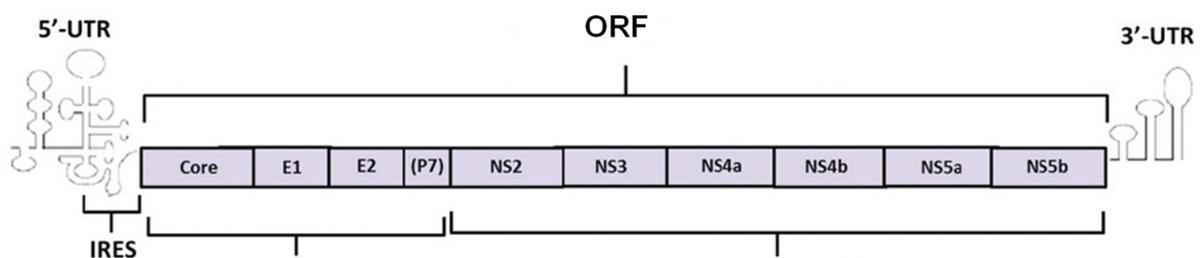


Figura 2: Representação esquemática do genoma do VHC (Adaptado de Du e Tang, 2016).

A poliproteína é clivada em 10 proteínas virais que são divididas entre proteínas estruturais (Core (C) e E1 e E2) e as proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (GOMES e NIEL, 2013; KHACHATOORIAN e FRENCH, 2016). A proteína do Core (C) é a proteína do nucleocapsídeo viral e as proteínas E1 e E2 são glicoproteínas do envelope viral que estão implicadas na adsorção do vírus (KHACHATOORIAN e FRENCH, 2016).

O gene que codifica a proteína p7 está localizado entre os genes que codificam a glicoproteína do envelope E2 e a proteína NS2. A proteína p7, também chamada de viporina, está localizada principalmente no retículo endoplasmático (ER), mas pode ser encontrada também na mitocôndria e na membrana plasmática. Essa proteína atua como um canal de cátions na membrana modulando a permeabilidade da mesma, facilitando assim, a entrada do vírus, a montagem ou a liberação. Entretanto, a sua função no ciclo de vida do vírus tem sido alvo de muita investigação (ATOOM; TAYLOR; RUSSELL, 2014; LEE et al., 2016).

Lee et al. (2016) demonstraram experimentalmente um importante papel da proteína p7 na fusão de membrana durante o envelopamento viral, independente do canal de íons. O estudo mostrou resultados relevantes que impulsionam o desenvolvimento futuro de novas drogas para o tratamento da infecção pelo VHC que possam bloquear a fusão de membrana induzida pela p7.

As regiões de NS2 e N-terminal de NS3 codificam uma proteinase autocatalítica metal-dependente que é responsável pela clivagem da Junção NS2-NS3. A proteína NS3 atua como uma enzima bifuncional, pois sua região codifica uma serino-proteinase que atua nas clivagens restantes e um domínio C-terminal de uma RNA helicase (GOMES e NIEL, 2013; KAZAKOV et al., 2015). Na extremidade C-terminal da proteína NS3 há também um domínio de uma NTPase (Nucleósido Trifosfato Hidrolase). Ambos os domínios estão envolvidos na replicação do vírus (KAZAKOV et al., 2015).

O gene NS4 codifica as proteínas NS4A e NS4B, estas são altamente imunogênicas e que poderiam ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas (KAZAKOV et al., 2015). A proteína NS4A é uma proteína de membrana que forma

um complexo com a proteína NS3, atuando como um co-fator da proteinase NS3 (GOMES e NIEL, 2013). Enquanto que a NS4B é uma proteína de membrana que atua como uma helicase (KHACHATOORIAN e FRENCH, 2016).

O gene NS5 codifica a fosfoproteína NS5A e é conhecida por conter um domínio chamado região de determinação sensível ao interferon (ISDR), implicando na resposta dos pacientes ao tratamento antiviral do interferon (GOMES e NIEL, 2013; DU e TANG, 2016). Entretanto, o seu papel exato na replicação do RNA do vírus ainda não foi bem elucidado. Mas sabe-se que a NS5A é um dos componentes do complexo de replicase do vírus, e está envolvida na regulação da replicação do genoma, no sítio de entrada do ribossomo interno (IRES) para a tradução de proteínas virais, e na montagem do vírion infeccioso (KHACHATOORIAN e FRENCH, 2016).

Outra proteína codificada pelo gene NS5 é a proteína NS5B que é uma RNA polimerase dependente de RNA, conhecida por ser um potencial alvo para antivirais específicos para o VHC (GOMES e NIEL, 2013; DU e TANG, 2016).

1.1.3 Ciclo de vida e replicação do VHC

A adsorção e a entrada do VHC na célula hospedeira ocorrem com a interação entre as glicoproteínas do envelope viral com receptores específicos presentes na superfície dos hepatócitos.

Inicialmente, são os receptores mucopolissacarídeos e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) da célula hospedeira que promovem uma ligação moderada do vírus (WUNSCHMANN et al., 2000; DU e TANG, 2016). Posteriormente, a glicoproteína viral E2 interage com os seguintes receptores: a molécula SRB1, a proteína de junção ocludina (OCLN) e a proteína de junção claudina (CLDN) que forma um complexo com a molécula CD81 que é o receptor definitivo que medeia à entrada dos vírus (CATANESE et al., 2007; HARRIS et al., 2008; MEULEMAN et al., 2008; PLOSS et al., 2009; DU e TANG, 2016).

Logo após a adsorção, a entrada do vírus ocorre por endocitose no qual o vírus é internalizado no citoplasma e forma o endossomo. Este sofre o processo de

acidificação, permitindo assim a fusão entre as glicoproteínas do envelope viral com a membrana do endossomo. Em seguida, ocorre o desnudamento e a liberação do RNA para o citoplasma. Após a liberação, o RNA é traduzido em uma poliproteína que é convertida em proteínas virais que serão responsáveis pela replicação do RNA e pela montagem de uma nova partícula viral (DU e TANG, 2016)

A replicação do RNA ocorre no retículo endoplasmático, neste é formado um complexo de replicação (CR) para a sintetização do RNA através da enzima RNA polimerase dependente de RNA. Esta enzima sintetiza uma fita complementar de polaridade negativa que servirá de molde para produção de novas fitas de RNA de polaridade positiva que irão compor a nova partícula viral. Por fim, as partículas virais formadas adquirem o envelope no retículo endoplasmático, são transportadas através do complexo de golgi e são liberadas da célula hospedeira por exocitose para dar início a um novo ciclo de vida (BARTENSCHLAGER e LOHMANN, 2000; EL-HAGE e LUO, 2003; DU e TANG, 2016) (Figura 3).

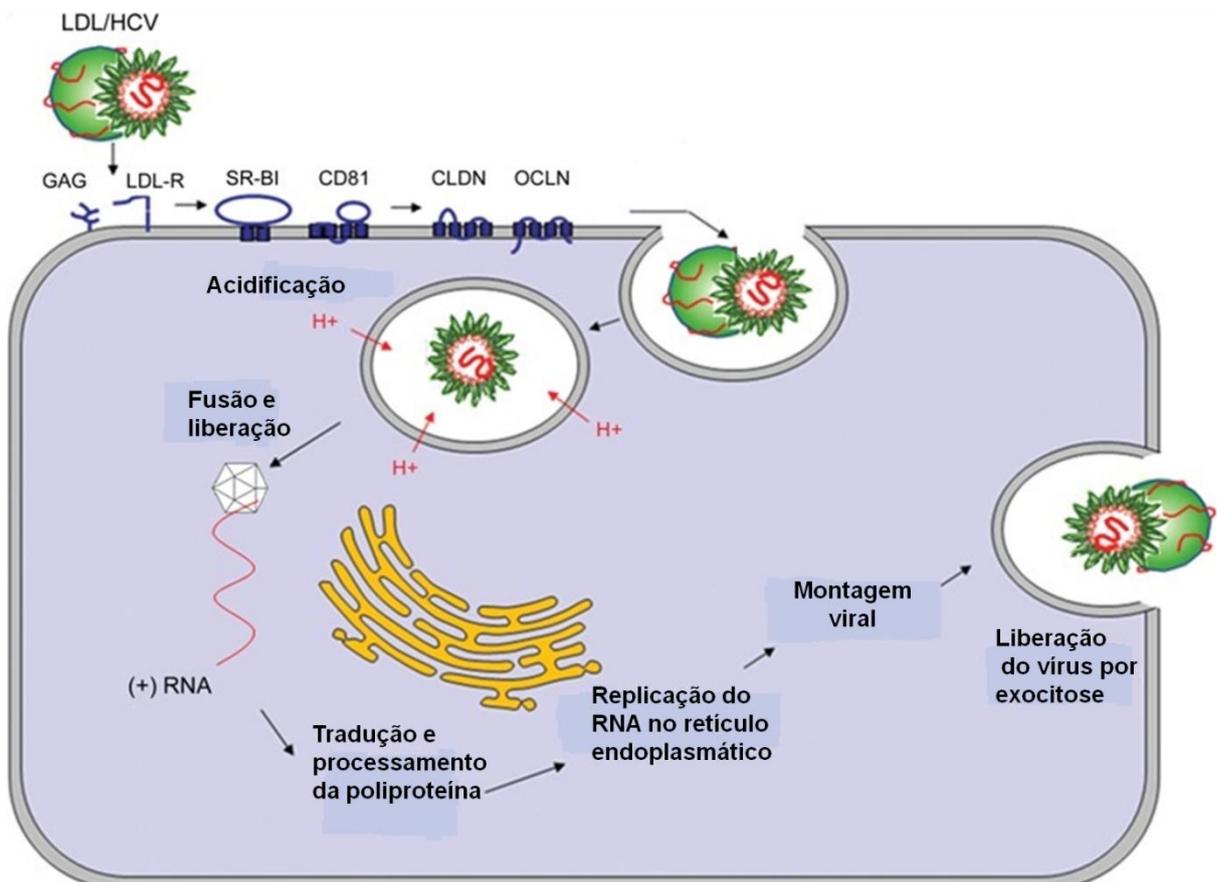


Figura 3: Representação esquemática da entrada do VHC na célula – alvo e replicação (Adaptado de Tang e Gris , 2009).

1.1.4 Transmissão do VHC

A principal via de transmissão do VHC é a parenteral. Os grupos de riscos de infecção pelo VHC através da via parenteral são os indivíduos que receberam transfusão sanguínea e/ou hemoderivados antes 1993, os usuários de drogas injetáveis, indivíduos que colocaram tatuagens ou piercings, ou indivíduos expostos a outras formas de exposição percutânea. A via de transmissão sexual é pouco frequente e a transmissão vertical é rara quando comparada com o VHB. No entanto, em um número de casos significativos não se consegue identificar a via de transmissão do VHC (BRASIL, 2008).

1.1.5 Epidemiologia do VHC

As hepatites virais representam um importante problema de saúde pública e são uma das principais causas de morte e incapacidade em todo o mundo, causando tantas mortes por ano assim como a AIDS, malária e tuberculose (STANAWAY et al., 2016). Stanaway et al. (2016) utilizaram dados obtidos do Carga Global de Doenças (GBD) para estimar a morbidade e mortalidade causadas por alguma hepatite viral, e, encontraram que o número de óbitos aumentou significativamente em 63% no período de 1990 a 2013. Em 1990, as mortes por hepatite viral aguda, cirrose e câncer de fígado representavam a 10ª principal causa de morte em todo o mundo, e em 2013 subiu para a 7ª principal causa.

O VHB e o VHC são responsáveis por mais de 90% das mortes e incapacidades relacionadas com a hepatite viral, e por isso, estão incluídos no Projeto de estratégia global do setor da saúde para hepatites virais 2016-2021 (STANAWAY et al., 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 150 milhões de pessoas estejam infectadas cronicamente pelo VHC, podendo desenvolver cirrose hepática ou câncer de fígado (WHO, 2016).

A epidemiologia global do VHC é heterogênea. Estudos sugerem que a infecção pelo VHC é prevalente em 3% da população mundial, mostrando uma elevada prevalência na África e Ásia, e menor prevalência nos países do norte e oeste da Europa, Austrália e América do Norte (SAEED et al., 2014) (Figura 4). Messina et al. (2015) estimaram que os genótipos 1 e 3 são os responsáveis pelo

maior número de casos de VHC no mundo, seguidos pelos genótipos 2, 4, 6 e 5. Os genótipos 1 e 3 correspondem por 83,4 milhões (46,2%) e 54,3 milhões (30,1%) respectivamente (Figura 5).

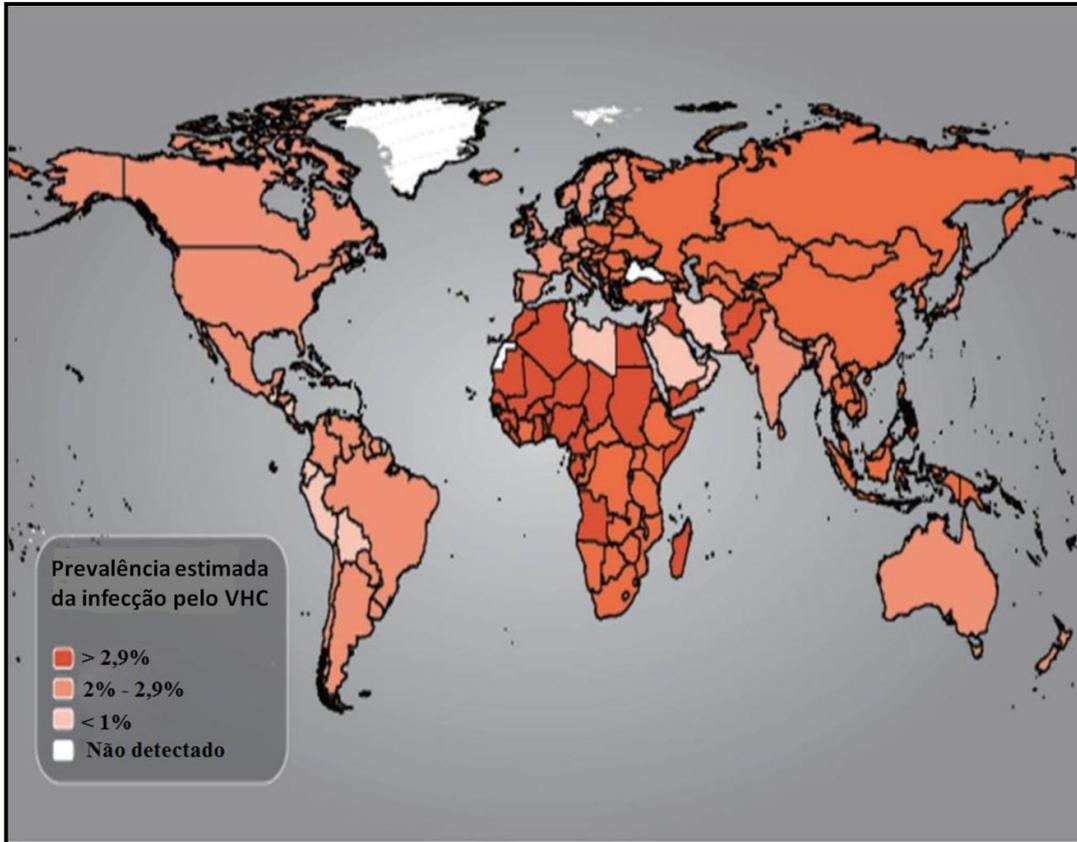


Figura 4: Prevalência global da infecção pelo VHC. (Adaptado de Saeed et al., 2014).

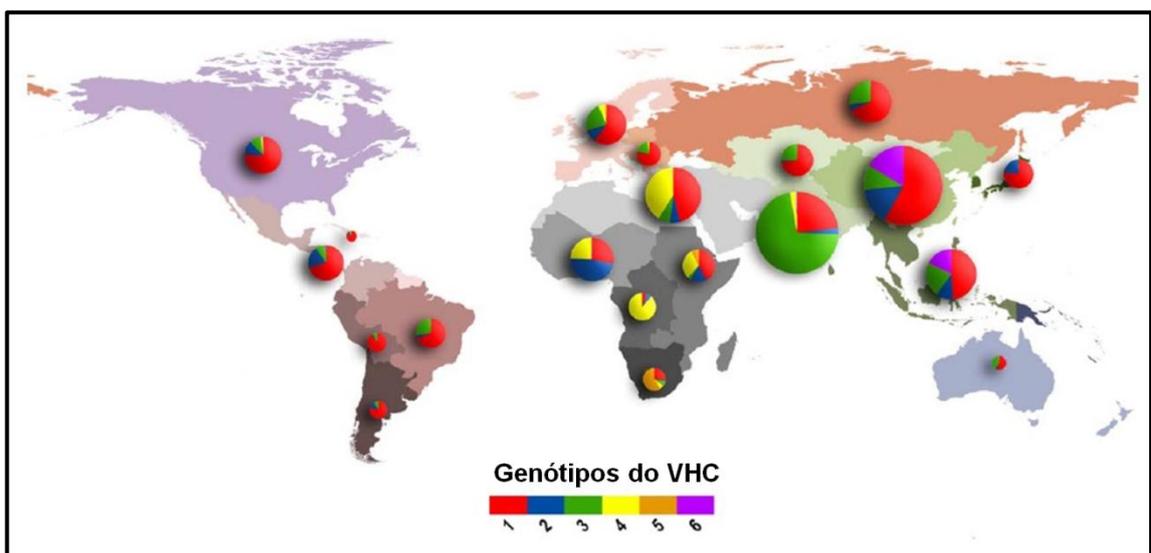


Figura 5: Prevalência global dos genótipos do VHC. (Adaptado de Messina et al., 2015).

No Brasil, no período de 1999 a 2015, foram confirmados 514.678 casos de hepatites virais. Destes, 152.712 (29,7%) são referentes aos casos de hepatite C. No período de 2000 a 2014, dos 56.335 óbitos associados às hepatites virais, a maioria (75,2%) foi associada à hepatite C (BRASIL, 2016).

A taxa de detecção de casos de hepatite C tem apresentado tendência de aumento no decorrer dos anos, assim como, nas regiões do país. Em 2015, a taxa de detecção da região Sul foi de 14,1 casos para cada 100 mil habitantes, seguida pelo Sudeste (8,1), Norte (3,5), Centro-Oeste (1,9) e Nordeste (1,2) (BRASIL, 2016) (Figura 6).

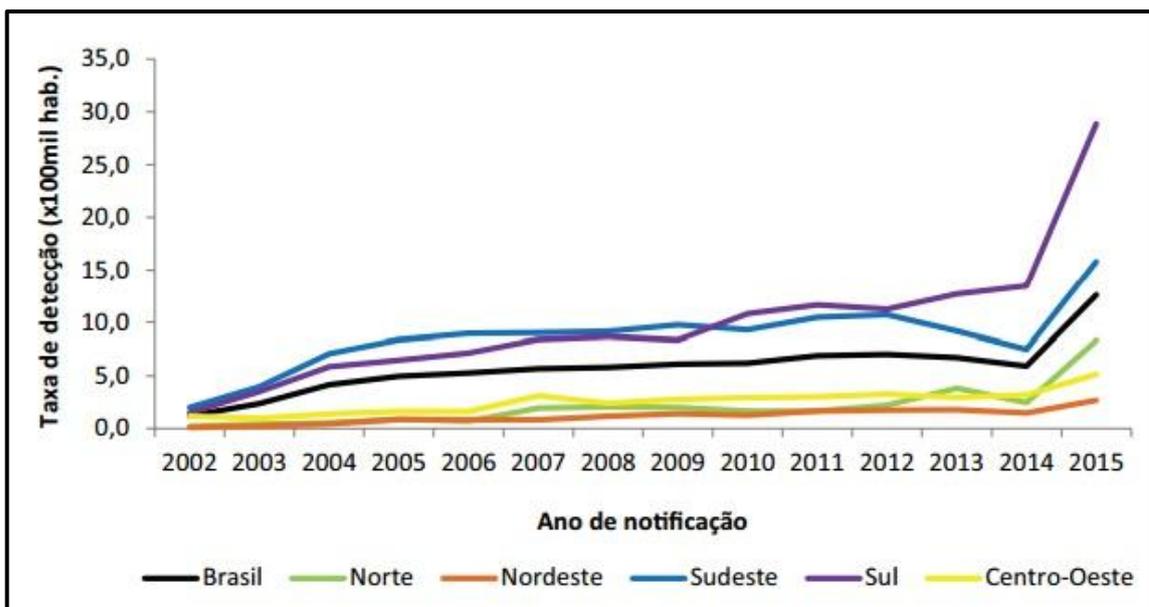


Figura 6: Taxa de detecção de hepatite C por ano no BRASIL de 2002 a 2015 (Adaptado de BRASIL, 2016).

A possível explicação para esse significativo aumento das taxas e do número de casos no período de 2014-2015, deve-se ao fato de que a partir do ano de 2015 houve uma alteração do critério de confirmação de caso de hepatite C, passando a considerar os casos que apresentaram pelo menos um dos seguintes marcadores sorológicos reagentes: anti-HCV ou VHC-RNA (BRASIL, 2016).

O número de casos de hepatite C em relação ao sexo é maior entre homens do que nas mulheres, sendo 89.858 (58,8%) entre os homens e 62.796 (41,2%) entre as mulheres. Entretanto, essa proporção vem diminuindo ao longo dos anos (BRASIL, 2016).

Em relação à faixa etária, os casos confirmados de hepatite C em 2015 estão, em sua maioria, na faixa etária de 45 a 54 anos (29,6%). Entretanto, quando se separa por sexo, observa-se que os homens infectados são mais jovens que as mulheres. Entre os homens, a maioria dos casos está na faixa etária de 40 a 49 anos (32,3%), já entre as mulheres a maioria tem 60 anos ou mais (22,9%) (BRASIL, 2016).

Os portadores crônicos respondem pela principal forma clínica dos casos notificados de hepatite C, representando aproximadamente 97% dos indivíduos com 15 anos ou mais. Em relação à variável raça/cor, em 2015, consideraram-se brancos (61,2%), pardos (28,6%), pretos (9,0%), amarelos (0,8%) e indígenas (0,4%). Quanto à escolaridade, a maioria dos casos possui de 5ª à 8ª série incompleta para ambos os sexos (BRASIL, 2016).

Em relação à provável fonte ou mecanismo de infecção, a maioria dos casos é pelo uso de drogas injetáveis, seguidos por transfusão sanguínea e pela via sexual. Em 2015, a maioria dos casos continuou sendo em usuários de drogas injetáveis (26,7%), porém, o percentual dos indivíduos que se infectaram pela via sexual foi maior (25,0%) do que nos transfundidos (19,5%) (BRASIL, 2016).

1.1.6 Diagnóstico do VHC

Os métodos de diagnóstico das infecções virais geralmente incluem os testes indiretos, que detectam os anticorpos induzidos pela infecção viral, e testes diretos, que incluem o isolamento do vírus, detecção de antígenos virais e ácidos nucleicos virais (LI et al., 2015). Não existem manifestações clínicas ou padrões de evolução patognômicos para cada agente da hepatite viral. Assim, o diagnóstico das hepatites virais só é realizado através de exames sorológicos e de biologia molecular (BRASIL, 2008).

O diagnóstico e o monitoramento da infecção pelo VHC utilizados na prática clínica incluem os marcadores sorológicos (anticorpos anti-VHC total) e os marcadores moleculares (nível de antígeno do core, nível de carga viral e o genótipo do VHC). A presença de RNA do VHC na ausência de anticorpos anti-VHC é indicativo de hepatite C aguda. A hepatite C crônica é definida pela presença de anticorpos anti-VHC e persistência do RNA do VHC por mais de 6 meses (CHEVALIEZ, 2011) (Figura 7).

Os níveis séricos das transaminases (ALT/AST) e da gama-glutamilttransferase (GGT) são frequentemente utilizados como marcadores sensíveis de lesão do parênquima hepático, mas não são específicos para as hepatites virais. ALT é mais encontrada no fígado, enquanto que AST e GGT estão mais presentes em diversos tecidos, incluindo coração, músculo esquelético, rins e cérebro (KOEHLER et al., 2014). O nível sérico da ALT, na maioria das vezes, é maior que da AST. No entanto, os níveis elevados da ALT não estão associados diretamente com a gravidade da doença hepática (BRASIL, 2008).

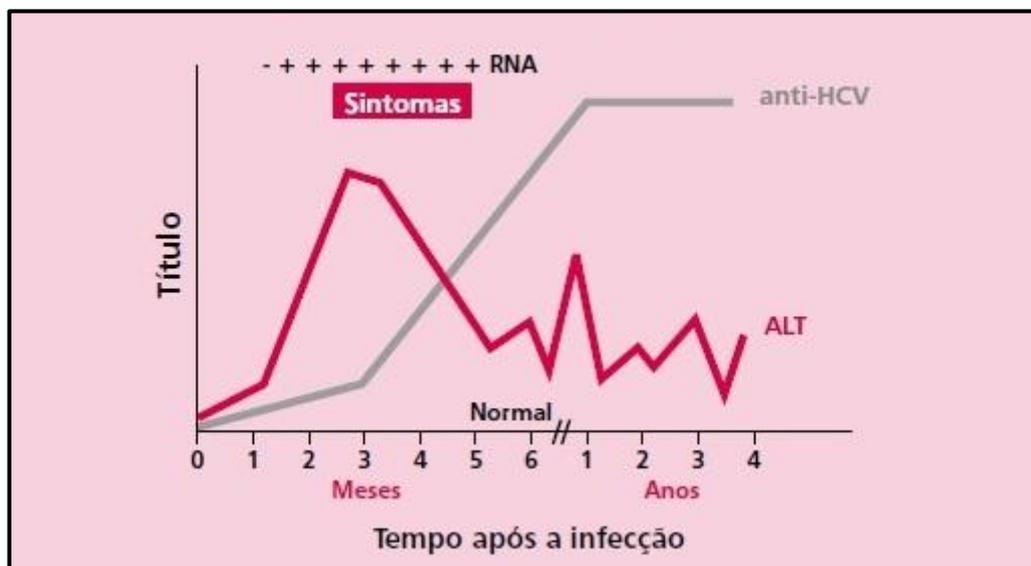


Figura 7: Representação gráfica da infecção crônica pelo VHC (Adaptado de BRASIL, 2008).

1.1.7 História natural da hepatite C crônica

Na infecção aguda pelo VHC, o RNA viral geralmente é detectado dentro de 2 semanas e os anticorpos anti-VHC dentro de 12 semanas. Os níveis de RNA viral no soro durante a fase aguda podem variar significativamente e tornarem-se negativos temporariamente. A resolução espontânea pode ocorrer em 15% a 25% dos indivíduos (LINGALA e GHANY, 2015).

A hepatite C evolui para a forma crônica quando o RNA do vírus persiste no sangue por mais de 6 meses após o início da infecção aguda. Estima-se que a maioria dos pacientes com hepatite C aguda torna-se crônicos e podem evoluir para a fibrose e cirrose (LINGALA e GHANY, 2015).

A evolução da lesão hepática causa dano inflamatório, deposição de matriz, morte de células do parênquima e angiogênese, evoluindo para a fibrose progressiva. Na hepatite C crônica a medida de tempo para evolução para a cirrose é de 5 a 30 anos. A resolução da fibrose hepática precoce pode acontecer, resultando na reversão completa para a arquitetura hepática normal. Na cirrose a resolução não é possível, entretanto, a regressão da fibrose causa o melhoramento dos resultados clínicos (PELLICORO et al., 2014) (Figura 8).

Quando a cirrose é instalada, os pacientes estão em risco de descompensação, e podem desenvolver outras infecções com risco maior de morte ou necessitar de um transplante hepático (LINGALA e GHANY, 2015). O transplante hepático é o único tratamento disponível para insuficiência hepática ou para hepatocarcinoma (PELLICORO et al., 2014).

A história natural da hepatite C crônica é intimamente influenciada por fatores do hospedeiro, como variabilidade genética dos genes envolvidos na resposta imune; fatores virais, como a carga viral e genótipo do VHC; fatores ambientais, como o consumo de álcool e o tabagismo prolongado que podem ser associados com uma lesão hepática mais grave em pacientes com hepatite C crônica. Por fim, também há outros fatores do hospedeiro, virais e ambientais relacionados à cronificação, assim como, a etnia, obesidade, esteatose hepática, diabetes, coinfeções, cafeína, entre outros (LINGALA e GHANY, 2015).

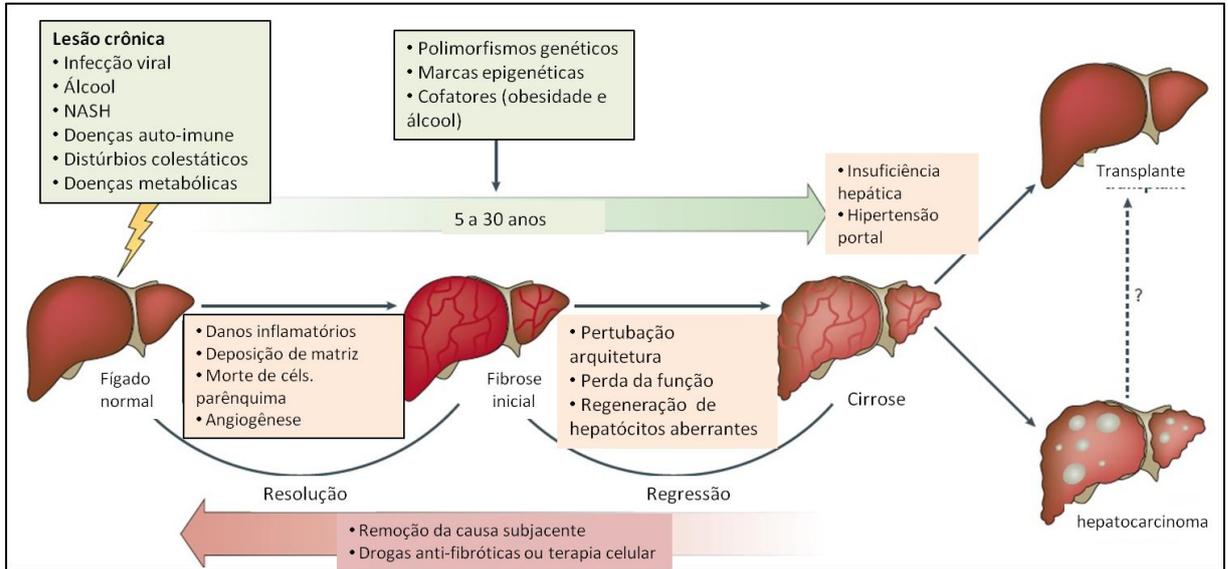


Figura 8: Representação esquemática da história natural da doença hepática crônica (Adaptado de Pellicoro et al., 2014).

1.1.8 Patogênese da infecção pelo VHC

O VHC chega ao fígado através da circulação sanguínea e se replica nos hepatócitos (IRSHAD, M.; MANKOTIA; IRSHAD, K., 2013).

A resposta imune inata e adaptativa aos vírus tem como função bloquear a infecção e eliminar as células infectadas (ABBAS e LICHTMAN, 2011). Dessa forma, após o VHC entrar na célula, as moléculas virais (PAMPs) são reconhecidas pelos receptores Toll-Like (TLRs) e pelo gene indutível por ácido retinóico I (RIG-I) que é um sensor citosólico. O RIG-I se liga ao RNA viral e interage com o estimulador do promotor de IFN- β tipo 1 (IPS-1) ativando vários fatores de transcrição, tais como, o fator regulador 3 de interferon (IRF3) e o fator nuclear kappa B (NF-kB). Esses fatores expressam interferon do tipo I (IFN- α / β) e outras citocinas que vão ativar células natural killer (NK), células dendríticas (DC) e células de Kupffer, desencadeando assim, a resposta imune inata (IRSHAD, M.; MANKOTIA; IRSHAD, K., 2013; SPENGLER et al., 2013).

As células NK são numerosas no fígado e são essenciais na resposta imune inata contra a infecção na fase precoce pelo VHC. Os hepatócitos infectados pelo vírus são eliminados pelas células NK por mecanismos citolíticos e por citocinas que secretam IFN- γ e TNF- α . As células NK ativadas recrutam células T específicas para o VHC, induzindo um estado antiviral no fígado (IRSHAD, M.; MANKOTIA; IRSHAD, K., 2013).

A imunidade adaptativa contra a infecção pelo VHC é realizada por Linfócitos T citotóxicos (CTL), principalmente os linfócitos T CD8⁺, que reconhecem peptídeos virais específicos para o seu receptor TCR (T Cell Receptor), apresentados por células infectadas via MHC de classe I (MHC-I) na superfície celular. Os linfócitos T CD8⁺ liberam seus grânulos citotóxicos para destruir os hepatócitos infectados ou expressam o ligante de Fas (FasL) pelos CTL promovendo a morte direta dos hepatócitos infectados por apoptose. As células T CD4⁺ efectoras (Th1) secretam IFN- γ para ativar os fagócitos a matar os vírus que foram ingeridos e estimulam os linfócitos B a secretar anticorpos (IRSHAD, M.; MANKOTIA; IRSHAD, K., 2013).

Entretanto, a persistência viral da infecção pelo VHC pode estar associada com falhas da resposta imune contra o vírus e também por mecanismos de evasão viral. O VHC não é citopático e a lesão tecidual na hepatite C crônica é ocasionada por diversos mecanismos mediados pela resposta imune e por outros fatores. As proteínas virais codificadas por diferentes regiões do genoma viral e suas *quasispecies* contribuem para esses mecanismos e têm um papel importante na patogênese do VHC (IRSHAD, M.; MANKOTIA; IRSHAD, K., 2013; SPENGLER et al., 2013).

1.2 A INTERLEUCINA 28B (IL-28B) E A SUA FUNÇÃO NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C (VHC)

A IL-28B é uma citocina também chamada de interferon λ 3 (IFN- λ 3), codificada pelo gene *IL-28B* que está localizado no cromossomo 19 na região 19q13.13. A IL-28B pertence à família do IFN- λ , da classe II das citocinas, que é composta por quatro membros denominados de IFN- λ 1 (IL-29), IFN- λ 2 (IL-28A), IFN- λ 3 (IL-28B) (KOTENKO et al., 2003; SHEPPARD et al., 2003) e pelo IFN- λ 4 descrito recentemente (PROKUNINA-OLSSON et al., 2013). O IFN- λ possui uma semelhança funcional ao IFN-I e estrutural à família das citocinas IL-10 (GAD et al., 2009; HAYES et al., 2012).

As citocinas IFN- λ são induzidas por infecções virais e desempenham capacidade antiviral para alguns vírus (SHEPPARD et al., 2003). Robek; Boyd; Chisari et al. (2005) demonstraram que IFN- λ apresenta uma atividade antiviral *in vitro* contra infecções pelo VHB e VHC. Shindo et al. (2013) demonstraram também a capacidade antiviral dos IFN- λ contra a replicação do VHC *in vitro*, e quando usaram IFN- λ 3 e IFN- α de forma sinérgica houve aumento da atividade antiviral em comparação ao uso das citocinas separadamente.

A sinalização aos IFN ocorre através das vias de transdução de sinais que compreendem as tirosina cinases não receptoras ou cinases de Janus (JAK e TYK) e fatores de transcrição, chamados transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT). Os receptores envolvidos são constituídos de uma cadeia polipeptídica de acoplamento aos ligantes e uma cadeia de transdução de sinais

(ABBAS e LICHTMAN, 2011). Os receptores de IFN- λ 3 (IL-28B) compreendem o receptor de cadeia α de interleucina-28 (IL-28 α R) e o receptor de cadeia β de interleucina-10 (IL-10 β R) (KOTENKO et al., 2003; BALAGOPAL et al., 2010).

A sinalização ao IFN- λ 3 (IL-28B) é semelhante, em parte, à do IFN do tipo I e ocorre através das tirosina cinases Tyk2 e Jak1. A molécula de IFN- λ 3 ao se ligar aos receptores (IL-28 α R e IL-10 β R), promove a fosforilação de Tyk2 e Jak1 que também fosforilam as proteínas STAT1 e STAT2, resultando na formação do fator regulador de IFN-3 (IRF3) e do fator regulador de IFN-9 (IRF9). Estes fatores conduzem a transcrição de ISGs e promovem a indução do estado antiviral através da expressão de PKR, ISG56, OAS e citocinas pró-inflamatórias (KOTENKO et al., 2003; ANK et al., 2006; BALAGOPAL et al., 2010).

O VHC ao entrar na célula é reconhecido por receptores, tais como o RIG-I e TLR3, estes ativam o fator regulador 3 de IFN (IRF3), o fator regulador 7 de IFN (IRF7) e o fator de transcrição nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) que induzem a expressão de IFN- λ , IFN- α e IFN- β pelas células dendríticas plasmocitóides e hepatócitos (BALAGOPAL et al., 2010) (Figura 9).

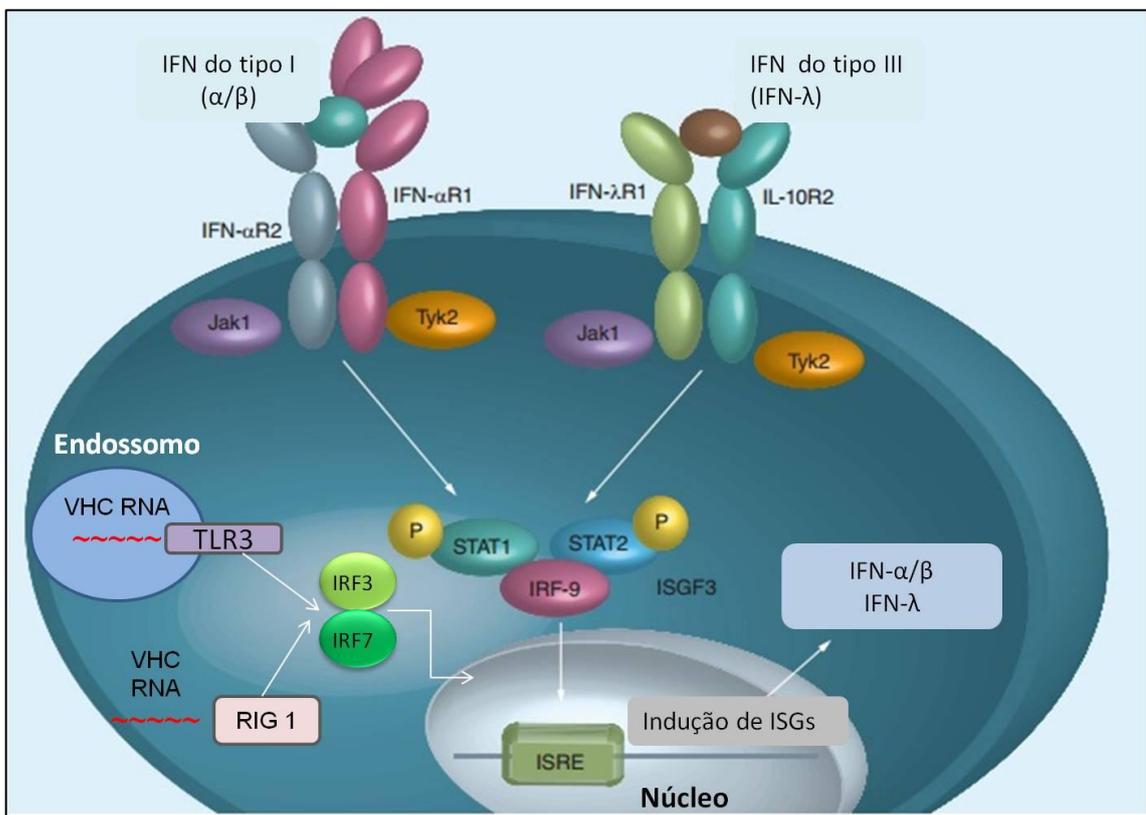


Figura 9: Representação esquemática da sinalização da IL-28B (IFN- λ 3) (Adaptado de Rembeck e Lagging, 2015).

Estudos recentes demonstraram que polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP) no gene que codifica a IL-28B estão associados com a resolução espontânea na infecção aguda pelo VHC, a resposta virológica sustentada ou a não resposta ao tratamento com interferon peguilado e ribavirina, em pacientes portadores de infecção crônica pelo VHC (GE et al., 2009; SUPPIAH, et al., 2009; TANAKA et al., 2009; THIO et al., 2010; THOMAS et al., 2009; BALAGOPAL et al., 2010). Entretanto, os mecanismos exatos que explicam a associação entre os diferentes polimorfismos e o controle da infecção do VHC não são claros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a expressão gênica da IL-28B no tecido hepático de pacientes portadores crônicos da infecção pelo VHC, correlacionando com os aspectos clínicos e laboratoriais da infecção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Correlacionar os níveis de expressão gênica da IL-28B no tecido hepático de pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, com os graus de fibrose hepática e com a atividade inflamatória, segundo a classificação da Sociedade Brasileira de Hepatologia (Gayotto, 2000) e a francesa de METAVIR (Bedossa & Poynard, 1996).

- Correlacionar os níveis hepáticos de expressão gênica da IL-28B com os níveis séricos das transaminases (ALT/AST) e da gama glutamiltransferase (GGT).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 População de estudo

Este estudo foi do tipo transversal e analítico, realizado no ambulatório de doenças hepáticas do Hospital da Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará (FSCMPA) selecionando-se casos consecutivos de pacientes portadores crônicos do VHC, caracterizados por alterações clínicas, testes hepáticos e VHC-RNA positivo.

A população de estudo foi composta por 21 indivíduos, sendo por portadores de hepatite C crônica (n=13), caracterizados por alterações clínicas e dos testes hepáticos e VHC-RNA positivo, e o grupo controle (n=8) composto por indivíduos submetidos à colecistectomia biliar convencional, sem alterações hepáticas necro-inflamatórias, que serviram como controles normais.

Os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente e submetidos à investigação complementar constando de exames clínicos, laboratoriais, virológicos, além da biópsia hepática, sendo estes dados transcritos dos prontuários para o protocolo de pesquisa específico.

3.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão adotados foram indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os gêneros, portadores de VHC-RNA positivo, persistência de alaninoaminotransferases elevadas ou não. Foram excluídos da pesquisa indivíduos que não preencheram os requisitos estipulados acima e aqueles pacientes portadores de HBsAg por mais de 6 meses, co-infectados pelo VHD e/ou HIV e pacientes que utilizaram ou estavam em uso de terapia antiviral específica contra o VHC.

3.2 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Espécimes de biópsia hepática foram obtidos de pacientes com indicação médica para investigação de alterações de parênquima hepático, dentro do protocolo de atendimento clínico. As biópsias hepáticas foram realizadas por profissional médico do referido hospital, com agulha de Trucut e dirigidas pela ultrasonografia. Cada amostra de biópsia hepática foi separada em duas partes, uma delas foi enviada para estudo genético no Laboratório de Virologia/ICB/UFPA e a outra parte foi examinada no Departamento de Anatomia Patológica da UFPA, obedecendo às rotinas do serviço, submetida às colorações de hematoxilina-eosina (HE), cromotrope azul de anilina (CAB), reticulina de Gomori e orceína de Shikata.

O diagnóstico histopatológico obedeceu a classificação da Sociedade Brasileira de Hepatologia (Gayotto, 2000) e a francesa de METAVIR (Bedossa & Poynard, 1996), pontuando a atividade do infiltrado inflamatório portal e peri-portal de 0 a 3 e as alterações estruturais de 0 a 4.

3.3 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.3.1 Exames bioquímicos e sorológicos

Os exames bioquímicos foram realizados no laboratório de análises clínicas da FSCMPA, constituídos de testes hepáticos (transaminases ALT/AST e glutamiltransferase-GGT). Todas as amostras de soro foram examinadas para a presença do anti-VHC e RNA-VHC.

3.4 PROCEDIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

3.4.1 Extração de RNA

Para a conservação do RNA, foram acrescentados 300 µL de PBMC das amostras e ao fragmento de tecido hepático, 1200 µL *RNAlater® Tissue Collection*, de acordo com protocolo do fabricante (Applied Biosystems, USA). A extração de

RNA foi realizada usando-se o *kit Norgen Biotek Corporation* de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

3.4.2 Transcrição Reversa (cDNA)

Após a extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro Qubit® 2.0 Fluorometer, utilizando-se o Qubit™ RNA Assay Kits de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada amostra foi feito o ajuste da concentração (30 ng) e mantido a -80°C até o momento da transcrição. As amostras de RNA foram transcritas em DNA complementar, utilizando-se o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kits* (sem inibidor), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante (Applied Biosystems, USA).

3.4.3 Quantificação da expressão gênica da IL28-B por PCR em Tempo Real (qPCR)

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em placas de 96 poços, utilizando os reagentes TaqMan™ (AppliedBiosystems, USA), o equipamento StepOne Plus (AppliedBiosystems, USA) e a sonda Hs04193049_gH referente ao gene *IL-28B*.

A quantificação relativa do gene alvo e o cálculo do intervalo de confiança foram realizados utilizando o método CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$), método utilizado para quantificação relativa da comparação do limiar da fase exponencial (*threshold*), sem recurso a curvas padrão.

3.5 PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS

Na análise estatística foram utilizados os programas EPIINFO 6.04 b e Biostat 5.0 (AYRES et al., 2008). Os níveis de expressão dos genes foram comparados, em relação às variáveis utilizadas no estudo, através do Teste t de Student e teste de Kruskal-wallis. Foi utilizada Análise de Regressão Linear, através da correlação de Pearson, a fim de avaliar as associações independentes entre graus de fibrose hepática, graus de inflamação e expressões gênicas. Para todas as

análises foi verificada a normalidade das amostras pelo teste d'agostino & Pearson Estabeleceu-se em 5% o nível de significância (valor de $p < 0,05$).

3.6 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa via Plataforma Brasil, conforme prevê a resolução nº 196/96 do CNS/MS, que trata de pesquisa em seres humanos. Os pacientes selecionados para a pesquisa foram informados sobre os objetivos da pesquisa e deram seu consentimento através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4 RESULTADOS

QUANTIFICAÇÃO DO RNAm DA IL-28B NOS PACIENTES PORTADORES DO VHC E NO GRUPO CONTROLE

Inicialmente, os níveis de RNAm da IL-28B foram comparados entre o grupo com VHC e o grupo controle. Observaram-se menores níveis de expressão gênica nos pacientes portadores crônicos da infecção pelo VHC quando comparados ao grupo controle, mostrando diferença estatística significativa ($p=0,0109$) (Figura 10).

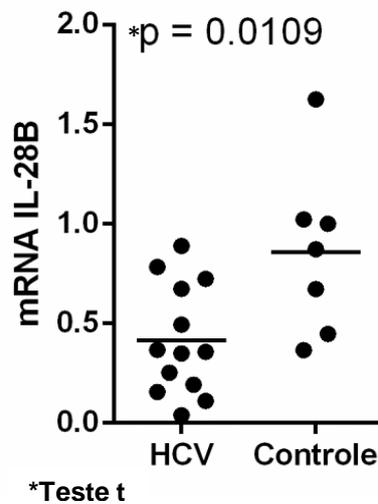


Figura 10: Média dos níveis de RNAm da IL-28B no grupo de pacientes portadores crônicos da infecção pelo VHC vs o grupo controle.

Posteriormente, os níveis de expressão gênica da IL-28B foram comparados aos aspectos clínicos da doença hepática.

Observou-se que os níveis de expressão gênica foram menores no grupo sem fibrose e no grupo com fibrose/cirrose do que no grupo controle, sendo observada diferença estatística significativa ($p=0,0378$) (Fig. 11A).

Quanto à inflamação, a expressão gênica foi menor no grupo com inflamação leve e no grupo com inflamação moderada do que no grupo controle, sendo também observada diferença estatística significativa ($p < 0.05$) (Figura 11B).

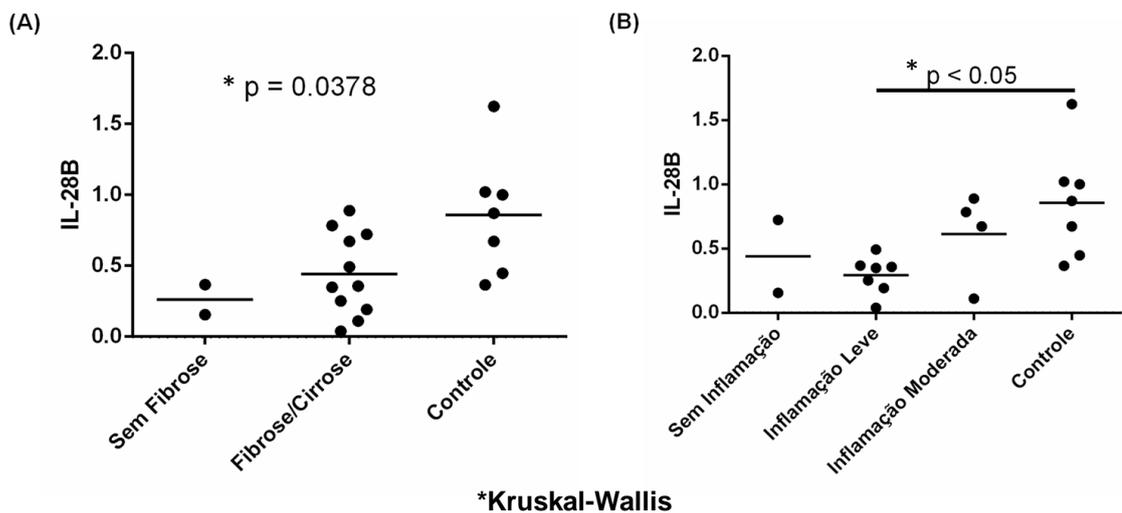


Figura 11: Médias dos níveis de expressão gênica da IL-28B nos pacientes sem fibrose, com fibrose/cirrose e no grupo controle (A) e quanto à atividade inflamatória (B) nos pacientes sem inflamação, com inflamação leve, com inflamação moderada e no grupo controle (Classificação de METAVIR).

Os níveis de expressão gênica da IL-28B foram correlacionados quanto ao estadiamento da fibrose hepática e o grau de inflamação no grupo de pacientes com VHC. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas. Entretanto, foi observada uma correlação positiva em ambas as correlações ($p=0,3804$ e $p=0,7476$) (Figura. 12A e 12B).

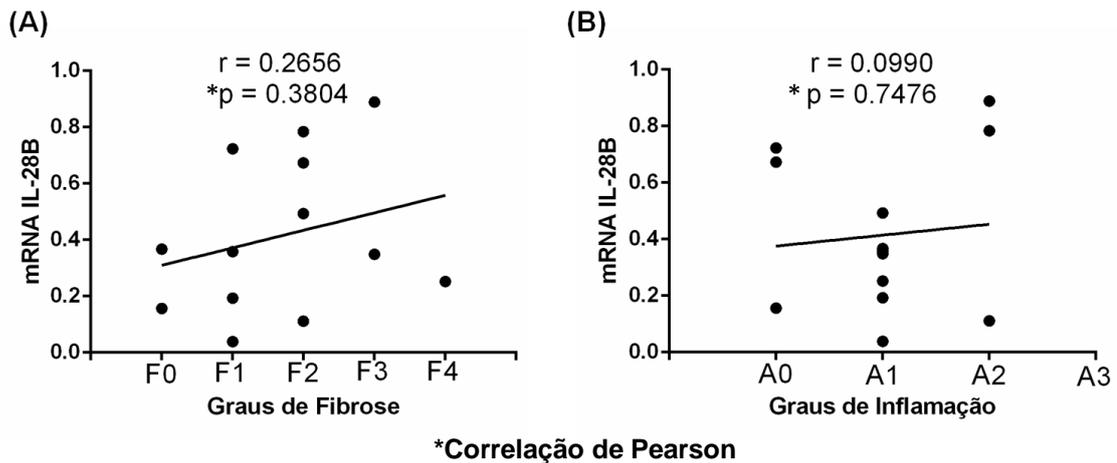
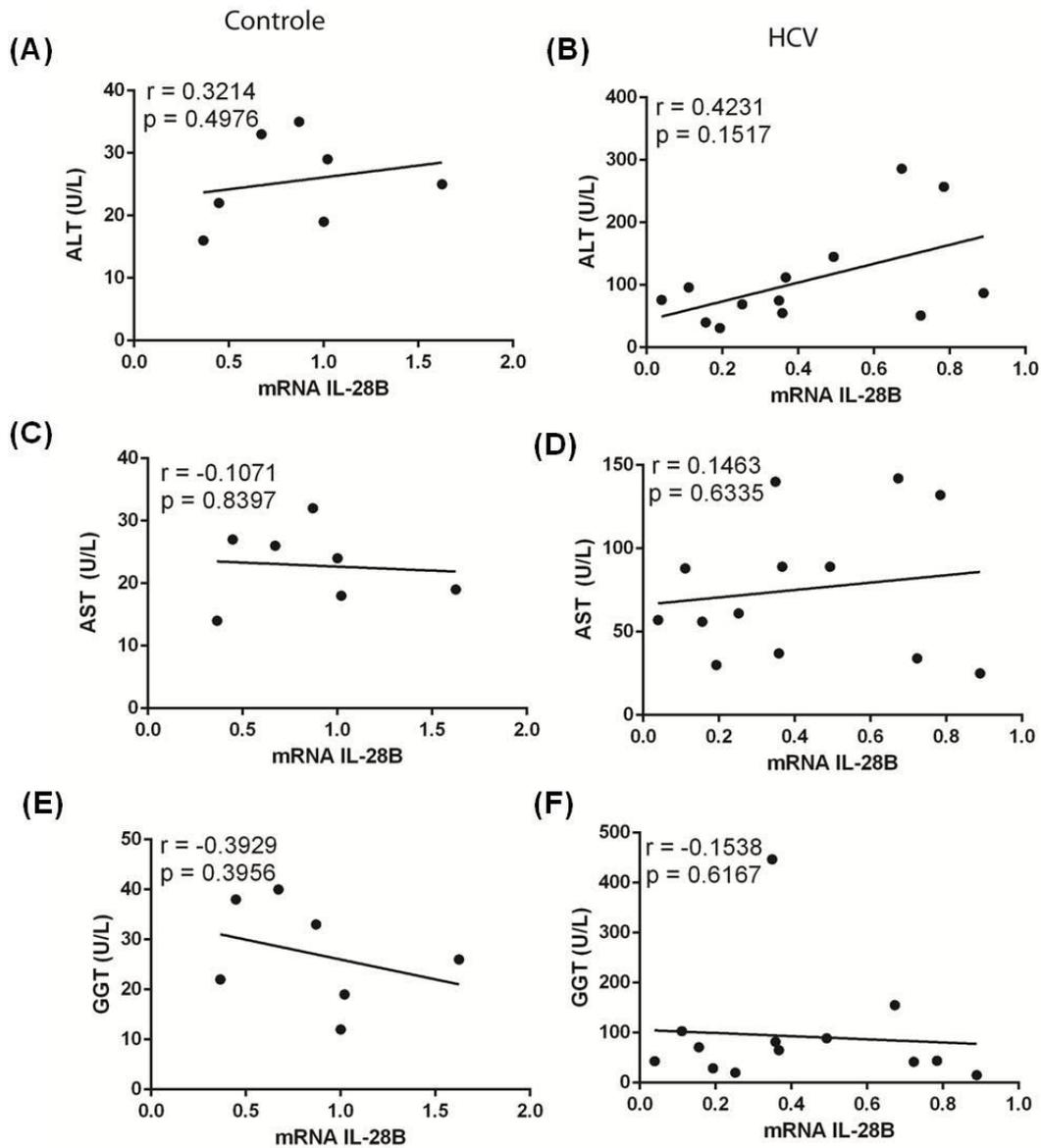


Figura 12: Correlação dos níveis de RNAm da IL-28B entre o estadiamento de fibrose hepática F0: ausência de fibrose; F1: portal sem septos; F3: muitos septos sem cirrose; F4: cirrose (A) e o grau de atividade inflamatória hepática A0: ausente; A1: mínima; A2: moderada (B) nos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC (Classificação de METAVIR).

Quanto aos aspectos laboratoriais, a expressão gênica da IL-28B foi correlacionada com os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT nos pacientes portadores da infecção pelo VHC e no grupo controle. Na análise da expressão gênica com a enzima hepática ALT, não foi observada diferença estatística significativa no grupo controle e nem nos pacientes portadores do VHC ($p=0,4976$ e $p=0,1517$). No entanto, foi observada uma correlação positiva em ambos os grupos (Figura 13A e 13B).

A análise da expressão gênica da IL-28B correlacionada com a enzima hepática AST, também não foi observada diferença estatística significativa no grupo controle e nem nos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC ($p=0,8397$ e $p=0,6335$). No entanto, foi observada uma correlação positiva nos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC (Figura 13D) e uma correlação negativa no grupo controle (Figura 13C).

Já na análise da expressão gênica da IL-28B correlacionada com a enzima hepática GGT, também não foi observada diferença estatística significativa no grupo controle e nem nos pacientes portadores do VHC ($p=0,3956$ e $p=0,6167$). Ao contrário do que foi observado para AST, em GGT foi observada uma correlação negativa em ambos os grupos (Figura 13E e 13F).



*Correlação de Pearson

Figura 13: Correlação entre os níveis séricos das enzimas hepáticas ALT (A e B), AST (C e D) e GGT (E e F) e os níveis de RNAm da IL-28B no grupo controle e nos pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a expressão gênica da IL-28B foi significativamente menor nos pacientes portadores do VHC quando comparadas ao grupo controle.

Este resultado sugere que a infecção crônica pelo VHC está associada a uma expressão gênica reduzida da IL-28B. Shi et al. (2012) encontraram em seu estudo um resultado semelhante em pacientes chineses portadores da infecção crônica pelo VHC tratados com IFN/RBV. Observaram que os níveis de expressão gênica e proteína sérica da IL-28A/B no sangue periférico foram significativamente menores nos pacientes com infecção crônica pelo VHC quando comparados com o grupo com resolução espontânea e com o grupo controle. Portanto, sugeriram também que a infecção crônica pelo VHC está associada a uma expressão reduzida da IL-28B.

Por outro lado, Amanzada et al. (2015) não encontraram associação significativa da expressão gênica de IFNL3 hepática entre os pacientes com hepatite C crônica e o grupo controle. Acredita-se que isto se deve ao grupo controle escolhido, pois esses pacientes tinham níveis das transaminases séricas levemente elevadas. Enquanto que, no presente estudo, o grupo controle possuía níveis séricos das transaminases normais.

Interessantemente, Nouredin et al. (2015) encontraram que os níveis de expressão gênica de IFNL2/3 no tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica antes do tratamento foram significativamente menores nos pacientes respondedores quando comparados com os não respondedores ao tratamento. Sugeriram que é possível que a presença contínua no fígado de IFN do tipo III como uma resposta endógena à infecção pelo VHC predispõe o fígado a um estado refratário ao IFN, ou seja, quanto mais elevados forem os níveis endógenos de IFNL2/3, mais refratário ao IFN o fígado se comporta.

A associação entre a expressão gênica da IL-28B e os aspectos clínicos da doença hepática também foram observadas. Os níveis de expressão gênica foram significativamente menores nos grupos sem fibrose e com fibrose/cirrose quando comparado com o grupo controle, e, também menores nos grupos com inflamação leve e com inflamação moderada do que no grupo controle. Estes

resultados sugerem que os níveis reduzidos da expressão gênica da IL-28B estão associados à cronicidade da infecção pelo VHC.

Não houve associação da expressão gênica da IL-28B quando correlacionada ao estadiamento da fibrose e ao grau de inflamação nos pacientes portadores do VHC. No entanto, foi observada uma correlação positiva, sugerindo que o aumento progressivo da expressão gênica da IL-28B esteja contribuindo para a progressão da doença hepática na infecção pelo VHC. Provavelmente, isto é consequência de uma resposta imune inflamatória promovida pela IL-28B, cuja sinalização estimula genes a sintetizar citocinas antivirais.

Os níveis séricos das transaminases (ALT/AST) e da gama-glutamiltransferase (GGT) são frequentemente utilizados como marcadores de lesão hepática. No entanto, não são específicos para as infecções virais (KOEHLER et al., 2014).

Em relação à expressão gênica da IL-28B correlacionada com os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas ALT, AST e GGT, apesar de não ter sido observado diferença significativa entre o grupo de pacientes portadores do VHC vs. grupo controle, houve uma correlação positiva entre a expressão gênica e os níveis plasmáticos das enzimas ALT e AST em ambos os grupos. Isto sugere que o aumento progressivo da expressão gênica da IL-28B acompanhado do aumento dos níveis plasmáticos de ALT e AST não é exclusivo apenas da infecção crônica pelo VHC. Por outro lado, a enzima GGT apresentou uma correlação negativa, sugerindo que os níveis de expressão gênica da IL-28B não estão diretamente associados ao nível plasmático da enzima GGT.

Shi et al. (2012) encontraram uma associação significativa entre o aumento do nível sérico da IL-28B e os níveis elevados das enzimas hepáticas ALT e AST em pacientes com infecção crônica pelo VHC em comparação com aqueles que apresentaram níveis normais dessas enzimas. No entanto, a importância e a relação exata entre os níveis séricos e/ou expressão da IL-28B e as aminotransferases na infecção crônica pelo VHC permanece desconhecida.

Outros autores encontraram associação significativa entre a expressão gênica da IL-28B e a infecção crônica pelo *vírus da hepatite B* (VHB). Shi et al.

(2015) observaram que a expressão gênica da IL-28A/B e proteína sérica da IL-28B foram reduzidas nos pacientes com infecção crônica pelo VHB. Li et al. (2011) também encontraram níveis séricos da IL-28B significativamente menores em pacientes com infecção crônica pelo VHB quando comparados com indivíduos autolimitados para a infecção pelo VHB e com o grupo controle.

Diversos estudos investigaram o impacto de polimorfismos no gene da IL-28B e/ou genótipo do VHC relacionados à resposta à terapia antiviral, resolução espontânea, aspectos clínicos e laboratoriais da doença hepática na infecção crônica pelo VHC (AL-QAHTANI et al., 2015; ASAHINA et al., 2012; AZEVEDO, 2013; BALAGOPAL et al., 2010; CIESLA et al., 2012; D'AMBROSIO et al., 2014; GE et al., 2009; MAH et al., 2016; MANGIA et al., 2016; RAUCH et al., 2010; REMBECK et al., 2012; TANAKA et al., 2009; THIO et al., 2010; XIE et al., 2012). No entanto, poucos estudos avaliaram os níveis de expressão gênica da IL-28B no tecido hepático associado à hepatite C crônica (AMANZADA et al., 2015; NOUREDDIN et al., 2015; SHI et al., 2012).

O presente estudo avaliou os níveis de expressão gênica da IL-28B no tecido hepático, correlacionando não apenas com as enzimas hepáticas, mas também com os aspectos clínicos da doença hepática, estadiamento da fibrose e o grau de inflamação hepática em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC, que não fizeram e nem estavam fazendo terapia antiviral contra o VHC.

A quantificação da expressão gênica da IL-28B pode ser útil para monitorar a infecção crônica pelo VHC e pode auxiliar um melhor entendimento do papel da IL-28B na defesa antiviral natural do hospedeiro, e na compreensão dos mecanismos exatos que determinam a persistência viral na infecção crônica pelo VHC.

6 CONCLUSÃO

Com base nos achados, concluí-se que:

- A expressão gênica reduzida da IL-28B pode está associada com os aspectos clínicos da doença hepática na infecção crônica pelo VHC.
- O aumento progressivo da expressão gênica da IL-28B pode contribuir para a progressão da doença hepática na infecção pelo VHC.
- A quantificação da expressão gênica da IL-28B pode ser útil para monitorar a infecção crônica pelo VHC e colaborar no melhor entendimento do papel da IL-28B na defesa antiviral do hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, L. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7ª ed. Ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2011. 545p.
- AL-QAHTANI, A.; AL-ANAZI, M.; ABDO, A. A. et al. Correlation between genetic variations and serum level of interleukin 28B with virus genotypes and disease progression in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Immunology Research**, **2015** (2015): 1-10, 2015.
- AMANZADA, A.; REINHARDT, L.; FEY, D. et al. Hepatic interferon- λ 3 (IFNL3) gene expression reveals not to be attenuated in non-favorable IFNL3 rs4803217 or IFNL4 rs368234815 minor allele carriers in chronic hepatitis C. **PLoS one**, **10** (11): e0143783, 2015.
- ANK, N.; WEST, H.; BARTHOLDY, C. et al. Lambda Interferon (IFN- λ), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections *in vivo*. **Journal of Virology**, **80** (9): 4501-4509, 2006.
- ASAHINA, Y.; TSUCHIYA, K.; MURAOKA, M. et al. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. **Hepatology**, **55** (1): 20-29, 2012.
- ATOOM, A. M.; TAYLOR, N. G. A.; RUSSELL, R. S. The elusive function of the hepatitis C virus p7 protein. **Virology**, **462-463**: 377-387, 2014.
- AZEVEDO, R. G. **Expressão gênica da IL-28B em pacientes com hepatite C crônica pré-tratamento e na semana quatro**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 2013. 76p.
- BALAGOPAL, A.; THOMAS, D. L.; THIO, C. L.; *IL28B* and the Control of Hepatitis C Virus Infection. **Gastroenterology**, **139**: 1865-1876, 2010.
- BARTENSCHLAGER, R. e LOHMANN, V. Replication of hepatitis C vírus. **Journal of General Virology**, **81**: 1631-1648, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico - Hepatites Virais**. Brasília: Departamento de DST, AIDS e Hepatites virais, 72 p., 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Hepatites virais: O BRASIL está atento**, 3 ed. Brasília, 2008.

- CATANESE, M. T.; GRAZIANI, R.; HAHN, T. V. et al. High-avidity monoclonal antibodies against the human scavenger class B type I receptor Efficiently block hepatitis C virus infection in the presence of high-density lipoprotein. **Journal of Virology**, **81** (15): 8063–807, 2007.
- CHEVALIEZ, S. Virological tools to diagnose and monitor hepatitis C virus infection. **Clinical Microbiology and Infection**, **17** (10): 116-121, 2011.
- CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, **244**: 359-362, 1989.
- CHOO, Q. L.; RICHMAN, K. H.; HAN, J. H. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **88** (6): 2451-2455, 1991.
- CIEŚLA, A.; BOCIAGA-JASIK, M.; SOBCZYK-KRUPIARZ, I. et al. IL28B polymorphism as a predictor of antiviral response in Chronic hepatitis C. **World Journal Gastroenterology**, **18** (35): 4892-4897, 2012.
- D' AMBROSIO, R.; AGHEMO, A.; FRANCESCO, R. et al. The association of IL28B genotype with the histological features of chronic hepatitis C is HCV genotype dependent. **International Journal Molecular Sciences**, **15** (5): 7213-7224, 2014.
- DIENSTAG, J. L.; PURCELL, R. H.; ALTER, H. J. et al. Non-A, Non-B post-transfusion hepatitis. **Lancet**, **309** (8011): 560-562, 1977.
- DU, L. e TANG, H. An insight into the molecular characteristics of hepatitis C virus for clinicians. **Saudi Medical Journal**, **37** (5): 483-81, 2016.
- EL-HAGE, N. e LUO, G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. **Journal of General Virology**, **84**: 2761-2769, 2003.
- GAD, H. H.; DELLGREN, C.; HAMMING, O. J. et al. Interferon- λ is functionally an interferon but structurally related to the Interleukin-10 Family. **The Journal of Biological Chemistry**, **284** (31): 20869-20875, 2009.
- GE, D.; FELLAY, J.; THOMPSON, A. J. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, **461**: 399-401, 2009.
- GOMES, S. A. e NIEL, C. M. G. Vírus da Hepatite C (HCV). In: Santos, N. S. O.; Romanos, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2013. p. 350-355.

- HAYES, C. N.; IMAMURA, M.; AIKATA, H. et al. Genetics of *IL28B* and HCV-response to infection and treatment. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, **9** (7): 406-417, 2012.
- HARRIS, H. J.; FARQUHAR, M. J.; MEE, C. J. et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. **Journal of Virology**, **82** (10): 5007-5020, 2008.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus). Disponível em: <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acessado em: 04/01/2017.
- IRSHAD, M.; MANKOTIA, D. S.; IRSHAD, K. An insight into the diagnosis and pathogenesis of hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterol**, **19** (44): 7896-7909, 2013.
- KAZAKOV, T.; YANG, F.; RAMANATHAN, H. N. et al. Hepatitis C Virus RNA Replication Depends on Specific *Cis*- and *Trans*-Acting Activities of Viral Nonstructural Proteins. **PloS Pathogens**, **11** (4): e1004817, 2015.
- KHACHATOORIAN, R. e FRENCH, S. W. Chaperones in hepatitis C virus infection. **World Journal of Hepatology**, **8** (1): 9-35, 2016.
- KOEHLER, E. M.; SANNA, D.; HANSEN, B. E. et al. Serum liver enzymes are associated with all-cause mortality in an elderly population. **Liver International**, **34**: 296–304, 2014.
- KOTENKO, S. V.; GALLAGHER, G.; BAURIN, V. V. et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. **Nature Immunology**, **4** (1): 69-77, 2003.
- LEE, G. Y.; LEE, S.; LEE, H-R. et al. Hepatitis C virus p7 mediates membrane-to-membrane adhesion. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1861** (9): 1096–1101, 2016.
- LI, H. C. & LO, S. Y. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. **World Journal Hepatology**, **7** (10): 1377-1389, 2015.
- LI, W.; JIANG, Y.; JIN, Q. et al. Expression and gene polymorphisms of interleukin 28B and hepatitis B virus infection in a Chinese Han population. **Liver International**, **31**: 1118–1126, 2011.
- LINGALA, S. e GHANY, M. G. Natural history of hepatitis C. **Gastroenterology Clinics of North America**, **44** (4): 717-734, 2015.

- MAH, Y-H.; LIU, C-H.; CHEN, C-L. et al. Prevalence and clinical implications of IL28B genotypes in Taiwanese patients with chronic hepatitis C. **Journal of the Formosan Medical Association**, **115**: 953-960, 2016.
- MANGIA, A.; LEDINGHEN, V.; BAILLY, F. et al. *IL28B* genotype is associated with cirrhosis or transition to cirrhosis in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection: the international observational Gen-C study. **SpringerPlus**, **5** (1): 1990, 2016.
- MESSINA, J. P., HUMPHREYS, I., FLAXMAN, A., et al. Global Distribution and Prevalence of Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatology** **61** (1): 77-87, 2015.
- MEULEMAN, P.; HESSELGESSER, J.; PAULSON, M. et al. Anti-CD81 antibodies can prevent a hepatitis C virus infection *in vivo*. **Hepatology**, **48** (6): 1761-8, 2008.
- NOUREDDIN, M.; ROTMAN, Y.; ZHANG, F. et al. Hepatic expression levels of interferons and interferon stimulated genes in patients with chronic hepatitis C: A phenotype–genotype correlation study. **Genes and Immunity**, **16** (5): 321-9, 2015.
- PERKINS, J. A. Disponível em: <: <https://people.rit.edu/japfaa/infectious.html> >, 2001.
- PELLICORO, A.; RAMACHANDRAN, P.; IREDALE, J. P. et al. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. **Nature Reviews Immunology**, **14** (3): 181-194, 2014.
- PLOSS, A.; EVANS, M. J.; GAYSINSKAYA, V. A. et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. **Nature**, **457** (7231): 882–886, 2009.
- PRINCE, A. M.; BROTMAN, B.; GRADY, G. F. et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**, **304** (7875): 241-46, 1974.
- PROKUNINA-OLSSON, L.; MUCHMORE, B.; TANG, W. et al. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a novel interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. **Nature Genetics**, **45** (2): 164-71, 2013.

- RAUCH, A.; KUTALIK, Z.; DESCOMBES, P. et al. Genetic variation in *IL28B* is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study. **Gastroenterology**, **138**: 1338–1345, 2010.
- REMBECK, K.; ALSIO, A.; CHRISTENSEN, P. B. et al. Impact of IL28B-related single nucleotide polymorphisms on liver histopathology in chronic hepatitis C genotype 2 and 3. **PloS one**, **7** (1): e29370, 2012.
- REMBECK, K. e LAGGING, M. Impact of *IL28B*, *ITPA* and *PNPLA3* genetic variants on therapeutic outcome and progression of hepatitis C virus infection. **Pharmacogenomics**, **16** (10): 1179-88, 2015.
- ROBEK, M. D.; BOYD, B. S.; CHISARI, F. V. Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. **Journal of virology**, **79**: 3851-4, 2005.
- SAEED, U., WAHEED, Y., ASHRAF, M. Hepatitis B and hepatitis C viruses: a review of viral genomes, viral induced host immune responses, genotypic distributions and worldwide epidemiology. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease** **4** (2): 88-96, 2014.
- SHEPPARD, P.; KINDSVOGEL, W.; XU, W. et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. **Nature Immunology**, **4** (1): 63-8, 2003.
- SHI, X.; CHI, X.; PAN, Y. et al. IL28B is associated with outcomes of chronic HBV infection. **Yonsei Medical Journal**, **56** (3): 625-633, 2015.
- SHI, X.; PAN, Y.; WANG, M. et al. *IL28B* genetic variation is associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus, treatment response, serum IL-28B levels in chinese population. **PloS one**, **7** (5): e37054, 2012.
- SHINDO, H.; MAEKAWA, S.; KOMASE, K. et al. IL-28B (IFN- λ 3) and IFN- α synergistically inhibit HCV replication. **Journal of Viral Hepatitis**, **20** (4): 281-9, 2013.
- SPENGLER, U.; NISCHALKE, H. D.; NATTERMANN, J. et al. Between Scylla and Charybdis: The role of the human immune system in the pathogenesis of hepatitis C. **World Journal Gastroenterol**, **19** (44): 7852-7866, 2013.
- STANAWAY, J. D.; FLAXMAN, A. D.; NAGHAVI, M. et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, **388** (10049): 1081-1088, 2016.

- TANAKA, Y.; NISHIDA, N.; SUGIYAMA, M. et al. Genome-wide association of *IL28B* with response to pegylated interferon- α and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. **Nature Genetics**, **41** (10): 1105-1109, 2009.
- TANG, H. e GRISÉ, H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. **Clinical Science**, **117**: 49–65, 2009.
- THIO, C. L.; THOMAS, D. L. Interleukin-28B: a key piece of the hepatitis C virus recovery puzzle. **Gastroenterology**, **138** (4): 1240–1243, 2010.
- THOMAS, D. L.; THIO, C. L.; MARTIN, M. P. et al. Genetic variation in *IL28B* and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, **461** (7265): 798–801, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C. Fact sheet. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acessado em: 08/11/2016.
- WUNSCHMANN, S.; MEDH, J. D.; KLINZMANN, D. et al. Characterization of Hepatitis C Virus (HCV) and HCV E2 Interactions with CD81 and the Low-Density Lipoprotein Receptor. **Journal of Virology**, **74** (21): 10055-10062, 2000.
- XIE, J-Q.; GUO, X-Y.; ZHANG, X-H. et al. Relationship between the genetic variation in interleukin 28B and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. **Chinese Medical Journal**, **125** (13): 2334-2338, 2012.