



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

NATÁLIA VIRGÍNIA FERREIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -2383 (C>T) (*rs3761549*)
NO GENE FOXP3 COM ASPECTOS DA HEPATITE C CRÔNICA**

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

Coorientador: Msc. Leonn Mendes Soares Pereira

BELÉM-PA

2017

NATÁLIA VIRGÍNIA FERREIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -2383 (C>T) (*rs3761549*)
NO GENE FOXP3 COM ASPECTOS DA HEPATITE C**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina, Faculdade de
Biomedicina, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará,
sob orientação da Prof.^a Dr.^a Vânia
Nakauth Azevedo.

BELÉM-PA

2017

NATÁLIA VIRGÍNIA FERREIRA DE SOUSA

**INVESTIGAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO -2383 (C>T) (*rs3761549*)
NO GENE FOXP3 COM ASPÉCTOS DA HEPATITE C CRÔNICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina, Faculdade de
Biomedicina, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará,
sob orientação da Prof.^a Dr.^a Vânia
Nakauth Azevedo.

Data: __/__/__

CONCEITO: _____

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Vânia Nakauth Azevedo - Orientadora

Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto

Prof.^a Dr.^a Rosimar Neris Martins Feitosa

DEDICATÓRIA

A Deus pela infinita bondade e misericórdia durante todos os momentos, e à família pelo apoio e motivação dispensados sem medidas ao longo de minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a Vânia Azevedo Nakauth pela orientação na realização deste trabalho.

Ao Coorientador Leonn Mendes Soares Pereira por todo ensinamento e auxílio prestado na construção desta monografia.

A todos que participaram deste estudo.

Ao laboratório de virologia (LabVir) por disponibilizar todo aporte necessário para a concretização desta pesquisa.

Aos meus pais, por acreditarem no meu sonho de ser biomédica e por terem feito absolutamente tudo que estava ao seu alcance pela minha formação como profissional e ser humano.

À minha irmã, por ser meu exemplo de força e determinação na conquista dos meus objetivos e por todo incentivo que me foi dado durante a graduação.

“Escolha seus aliados e aprenda a lutar acompanhado, porque ninguém vence uma guerra sozinho.” (Chuan Tzu)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	1
ABREVIATURAS.....	2
RESUMO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1 O FÍGADO E AS LESÕES HEPÁTICAS.....	4
1.2 O VÍRUS DA HEPATITE C.....	6
1.2.1 Histórico da hepatite C.....	7
1.2.2 Taxonomia e Estrutura do HCV.....	8
1.2.3 Epidemiologia do HCV.....	9
1.2.4 Patogênese.....	10
1.2.5 Replicação do HCV.....	11
1.3 A RESPOSTA IMUNE NA HEPATITE C.....	13
1.4 AS CÉLULA TREG COMO MECANISMO DE CONTROLE DA RESPOSTA IMUNE.....	14
1.5 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3.....	15
1.6 O POLIMORFISMO rs3761549.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 ASPÉCTOS ÉTICOS.....	19
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	19
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO.....	20
3.4 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	20
3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	21
3.5.1 Extração de DNA.....	21

3.5.2 Identificação do Polimorfismo rs3761549.....	21
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA.....	22
4.2 ASPÉCTOS HISTOPATOLÓGICOS.....	23
4.3 ASPÉCTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES.....	25
5. DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura anatômica do fígado.....	5
Figura 2 – Vírus da hepatite C.....	8
Figura 3 – Esquematização genômica do HCV.....	10
Figura 4 – Prevalência estimada da infecção pelo HCV de acordo com a localização geográfica.....	11
Figura 5 – Replicação do HCV.....	14
Figura 6 – Representação esquemática do gene FOXP3 e a localização do polimorfismo rs3761549.....	18
Figura 7 – Comparação da curva viral plasmática do HCV, Níveis de AST e ALT entre os genótipos do polimorfismo <i>rs3761549</i> do gene FOXP3 em portadores de hepatite C crônica.....	26

ABREVIATURAS

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

GGT – Gama Glutamil Aminotransferase

HAV – Vírus da Hepatite A

HBV – Vírus da Hepatite B

HC – Hepatite Crônica

HCS – Célula Hepática Estrelada

HCV – Vírus da Hepatite Crônica

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

ORF – Open Reading Frame

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UTR – Untranslated Region

RESUMO

Estudos sugerem que os polimorfismos no gene *FOXP3* tem papel essencial na função e desenvolvimento de linfócitos T reguladores. O polimorfismo rs3761549 ocorre devido uma substituição de citocina (C) para timina (T) na posição -2383 da região promotora do gene *FOXP3* e já foi associado a algumas doenças como psoríase, endometriose e câncer de mama. Dessa forma, o presente estudo objetiva avaliar a influência do polimorfismo rs3761549 no gene *FOXP3* na progressão da hepatite C, buscando identificar possíveis marcadores genéticos vinculados à patologia. O polimorfismo foi investigado pela técnica de PCR em tempo real, com ensaio *TaqMan® SNP Genotyping Assays C_27058744_10*. Em virtude do gene *FOXP3* estar localizado no cromossomo sexual, dividiu-se as populações em masculina e feminina, onde a frequência genotípica de CC na população feminina de pacientes infectadas foi 82,22% e 89,26% no grupo controle feminino. O genótipo CT 17,77% no grupo de pacientes infectadas e de 10,72% no grupo controle feminino. Na população masculina, a frequência do alelo selvagem C foi de 94,11% em homens infectados e 91,63% no grupo controle. A frequência do alelo mutante T foi 8,89% em infectados e 5,37% no grupo controle. Não houve diferenças significativas na frequência genotípica e alélica entre os genótipos. Em pacientes com nível de atividade inflamatória entre 0 a 1, 91,89% apresentaram o genótipo CC e 8,11% CT. Nos pacientes com atividade inflamatória entre 2 e 3, 92,00% possuíam o genótipo CC e 8,00% CT. Em pacientes com nível de injúria hepática moderada, 89,47% possuíam o genótipo CC e 10,53% CT, ao passo que nos pacientes com injúria hepática avançada, 91,38% possuíam o genótipo CC, 5,17 CT e 3,45% TT. Não foram encontrados valores estatísticos significativos entre a frequência do polimorfismo e níveis de atividade inflamatória ($p=1,0000$). Não houve significância estatística entre os marcadores bioquímicos AST($p=0,1938$), ALT ($p=0,2145$) e a frequência do polimorfismo, com exceção do GGT ($p=0,0369$) Diante destes resultados o polimorfismo rs3761549 pode indiretamente contribuir à progressão da doença em portadores de HCV.

Palavras Chave: HCV, *FOXP3*, Polimorfismo rs3761549

1. INTRODUÇÃO

1.1 O FÍGADO E AS LESÕES HEPÁTICAS

O fígado pesando aproximadamente 1.500 g, é a maior glândula do corpo humano e está situado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, logo abaixo do diafragma. Está dividido em quatro lobos: direito, esquerdo, caudado e quadrado, dos quais os dois primeiros constituem quase a sua totalidade (Figura1) (Gartner & Hiatt, 2003).

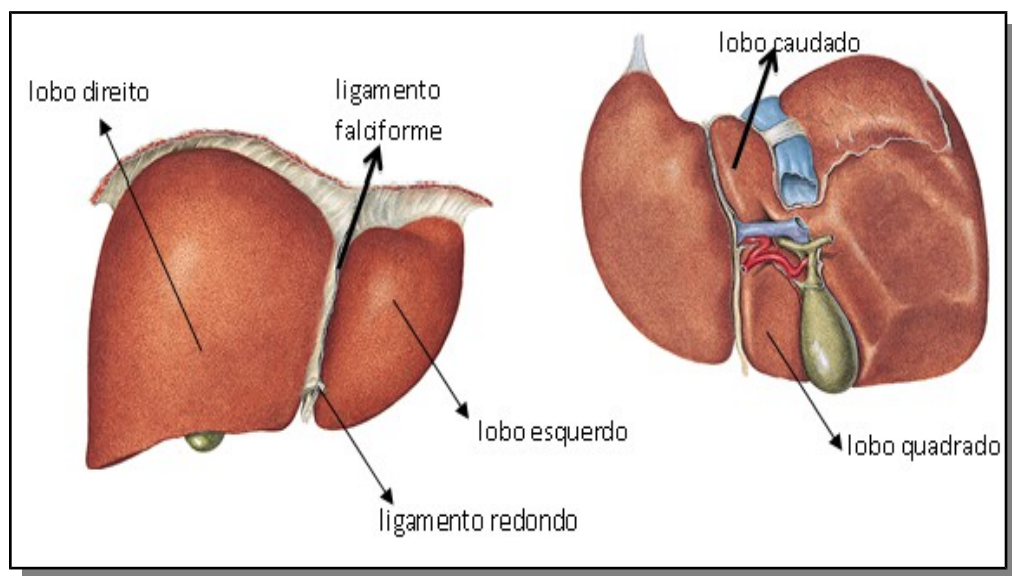


Figura 1 – Estrutura anatômica do fígado (Adaptado de Sobotta Atlas de Anatomia Humana 21 ed.)

De modo geral, as funções-chave do fígado podem ser divididas em três áreas: contribuições para o metabolismo de todo o corpo, destoxificação, e excreção de produtos residuais ligados às proteínas e de produtos residuais lipossolúveis (Berne & Levy, 2009). Estas atividades são realizadas conjuntamente por, pelo menos, dez tipos diferentes de células, entre elas: hepatócitos, colangiócitos, células endoteliais, sinusoidais, macrófagos, diferentes tipos de linfócitos, células dendríticas e células estreladas hepáticas (HCS), que são arranjadas em uma

estrutura parenquimatosa que facilita a sua interação cooperativa (Berasain & Avila, 2015).

Os hepatócitos que se constituem no principal tipo de célula do fígado estão dispostos em cordões anastomosados que formam placas ao redor das quais circula grande volume de sangue. A infecção do fígado por certos vírus, ou a superexposição desse órgão a substâncias tóxicas, como o álcool, mata hepatócitos e ativa as células estreladas hepáticas, que passam a sintetizar quantidades excessivas de colágeno, que dão ao órgão o aspecto histológico da fibrose. Quando a agressão é crônica, a fibrose passa a ser irreversível, condição conhecida como cirrose, onde as áreas cicatrizadas fibróticas diminuem a massa de hepatócitos, reduzindo desse modo a capacidade de síntese, metabolismo e excreção do fígado (Berne & Levy, 2009).

A fibrose, principal fisiopatologia decorrente de uma injúria crônica ao fígado, é um processo comum na insuficiência hepática e é responsável por muitas complicações clínicas no estágio final das doenças deste órgão. Inicialmente representa um processo passivo, pelo qual a morte celular leva à condensação do estroma preexistente (Harttroft et al., 1951). A influência do sexo na progressão da fibrose é um dos fatores mais bem estudados. O sexo masculino aumenta em 10 vezes a taxa de progressão da fibrose, independentemente da idade (Massard et al., 2006).

O fígado tem vários elementos celulares capazes de sintetizar e depositar os componentes da matriz extracelular (fibroblastos, miofibroblastos e até os próprios hepatócitos). Todavia, vários estudos têm demonstrado que a célula-chave na produção da fibrose no fígado é a HCS, situada no espaço de Disse (Geerts et al., 2001).

Durante a lesão hepática crônica, as HCS se diferenciam em um fenótipo miofibroblástico ativado que se caracteriza por uma acentuada proliferação e secreção de componentes da matriz extracelular, como colágeno do tipo I, II, III, IV e V, laminina e elastina, com a predominância do colágeno do tipo I (Blonhoff & Wake, 1991). A ativação das HCS é acompanhada pela perda das gotas lipídicas ricas em

vitamina A, por uma reorganização e expressão de proteínas de citoesqueleto como α -actina de músculo liso e desmina (Kisseleva & Brenner, 2006). O estágio da fibrose é medido através de escalas de estadiamento como a METAVIR e ISHAK. Este permite prever a progressão para cirrose (Massard et al., 2006).

O conceito clínico da cirrose é o de uma doença crônica do fígado que cursa com manifestações de insuficiência hepática e hipertensão porta. Já o conceito anatômico prevê a presença de fibrose que envolve todo o fígado, acompanhada da transformação do parênquima em nódulos regenerativos. O que faz a peculiaridade da cirrose é um processo generalizado de regeneração nodular do parênquima, acompanhado de um complexo de alterações vasculares, que inclui fístulas porto-hepáticas e artériovenosas, intra-hepáticas, desvios porto-sistêmicos e capilarização sinusoidal, alterações estas que privam os hepatócitos do contato com a sua matéria prima (Popper, 1977).

1.2 O VÍRUS DA HEPATITE C

1.2.1 Histórico da Hepatite C

A descoberta do Vírus da hepatite C (HCV) ocorreu somente em 1989, após extensa pesquisa desenvolvida para encontrar as causas da hepatite pós transfusional (Choo et al., 1989). A suspeita da existência do HCV surgiu nos anos 70, quando foram relatados vários casos de indivíduos infectados por um agente infeccioso diferente dos vírus da hepatite A e B (HAV e HBV), que causava hepatite crônica e era frequentemente transmitido por sangue e produtos sanguíneos (Alter et al., 1989).

Em 1989, mediante sucessivos estudos de biologia molecular, Qui-Lim-Choo, George Kuo, Daniel Bradley e Michael Houghton, após seis anos de intensa investigação (1982-1988), identificaram finalmente o genoma do agente viral (clonagem molecular direta) responsável por 80 a 90% das hepatites pós transfusionais não-A e não-B. Tal agente foi denominado de vírus da hepatite C (Choo et al., 1989). No mesmo ano da identificação do HCV, George Kuo relatou o

desenvolvimento de um teste sorológico para a detecção dos anticorpos contra a infecção pelo HCV (anti-HCV total).

Também neste mesmo ano da descoberta do HCV, estudos publicados nos Estados Unidos revelaram a presença sérica do anti-HCV em seguimento de pacientes com história de hepatite pós-transfusional aguda e entre pacientes com hepatite crônica não-A, não-B (Alter et al., 1989). Na Espanha, estudos publicados em 1989 revelaram a detecção sérica do anti-HCV na maioria dos pacientes pertencentes a grupos de risco, principalmente naqueles com história de hepatite pós-transfusional não-A e não-B (Esteban et al., 1989).

Finalmente, em 1991, Choo e colaboradores conseguiram identificar a sequência genômica completa do HCV e, a partir de então, foi possível desenhar sondas de hibridização e iniciadores para amplificação do genoma viral por PCR. Ainda em 1991, foram criados clones específicos para HCV que foram utilizados na produção de ensaios para pesquisar anticorpos contra o vírus, permitindo que a triagem de doadores de sangue para a hepatite C fosse feita em todo mundo (Chiba et al., 1991).

1.2.2 Taxonomia e estrutura do HCV

O HCV é um vírus de RNA de cadeia simples e sentido positivo, com cerca de 9000 ribonucleótidos, pertencente à família *Flaviviridae* e ao gênero *hepacivirus*. O vírus é formado pelo material genético, no centro, rodeado por uma estrutura proteica de forma icosaédrica que, por sua vez, está envolvida por um envelope. Este é constituído por uma membrana bilipídica com duas glicoproteínas (E1 e E2) formando heterodímeros (Figura 2) (Saeed et al., 2014).

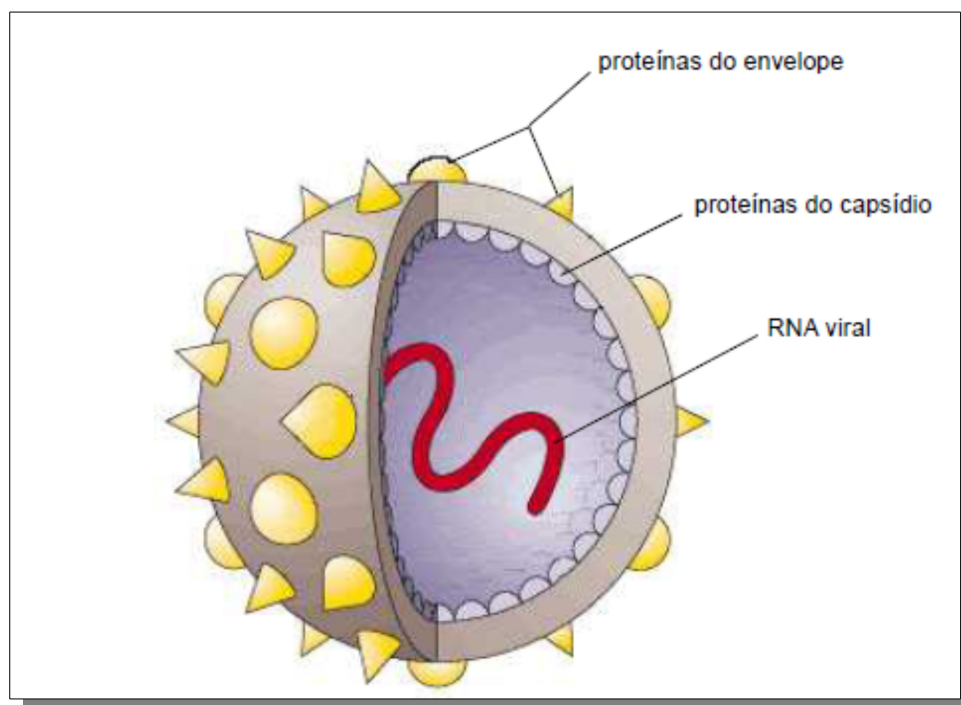


Figura 2–Vírus da hepatite C (Adaptado de Strauss, 2001)

O genoma do HCV apresenta regiões curtas não codificadoras e hiperconservadas nas extremidades 5' e 3'-UTR (Untranslated Regions) (Taylor et al., 2000). A região 5'-UTR, altamente conservada, possui 341 nucleotídeos com uma estrutura secundária complexa que funciona como IRES (Internal Ribosome Entry Site), que permite a ligação direta do RNA viral ao ribossomo da célula infectada, próxima ao códon de iniciação da ORF (Open Reading Frame), possibilitando a tradução das proteínas virais. A 3'-UTR é dividida em três regiões: um segmento hipervariável de 40 nucleotídeos, uma cauda poli-U variável em extensão e uma região altamente conservada de 98 nucleotídeos, essencial para a replicação in vivo (Bisceglie, 1999; Bartenschlager; Lohmann, 2000; Rosenberg, 2001).

As regiões 5' e 3'-UTR flanqueiam uma única sequência codificadora conhecida como ORF, que codifica uma poliproteína precursora de aproximadamente 3010 resíduos de aminoácidos, que é sintetizada em ribossomos associados ao retículo endoplasmático e é clivada co e pós traducionalmente via mecanismos de sinalização do hospedeiro e proteases virais, gerando cerca de 10

diferentes proteínas estruturais e não estruturais (NS), além da proteína P7 (Taylor et al., 2000).

As proteínas estruturais virais são derivadas da região 5' do RNA genômico, e as proteínas não-estruturais da região 3'. Assim os genes estão organizados na seguinte sequência: região estrutural que consiste de 3 genes, sendo eles, o core (codifica proteínas do nucleocapsídeo), o *E1* e o *E2* (codificam proteínas do envelope, que são consideradas os principais componentes proteicos do vírus), gene da proteína P7 que faz a ponte entre as regiões estrutural e não-estrutural e codifica canais de íons, situando-se entre os genes *E2* e *NS2*, e região não-estrutural que apresenta seis ORFs (*NS2*, *NS3*, *NS4a*, *NS4B*, *NS5a*, *NS5b*) codificadoras das proteínas funcionais, como as enzimas transcriptase reversa, replicase/helicase, serina protease e metaloproteinase (Figura 3) (Stadhouders et al., 1997; Roingeard et al., 2004; Whidby et al., 2009).

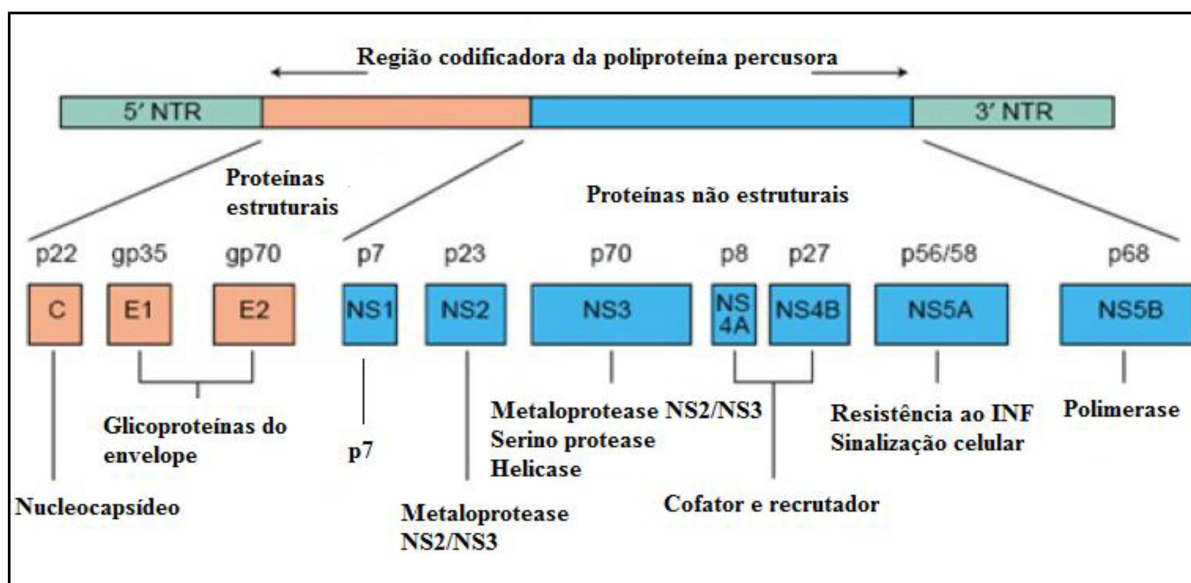


Figura 3 – Esquematização do genoma do HCV (Adaptado de Ashfaq et al., 2011)

1.2.3 Epidemiologia do HCV

A infecção pelo HCV representa atualmente uma situação pandêmica, tendo sido estimado recentemente pela Organização Mundial de Saúde que cerca de 2% (aproximadamente 123 milhões de indivíduos) da população mundial se encontrava infectada por este vírus. Apesar de a hepatite C (HC) ser considerada uma endemia mundial, existe um elevado grau de variação geográfica de sua distribuição (Shepard et al., 2005).

Em muitos países faltam dados, e as estimativas são baseadas em médias ponderadas para as regiões. A prevalência da infecção pelo HCV é considerada baixa no Reino Unido, Escandinávia (0,01% a 0,1%), Américas, Europa Ocidental, Austrália e África do Sul (0,2% a 0,5%). Prevalências intermediárias são encontradas no Leste Europeu, Mediterrâneo, Oriente Médio e Índia. Outros países com prevalência intermediária incluem Brasil, Europa Oriental, e partes da África e da Ásia (Figura 4) (Perz et al., 2004)

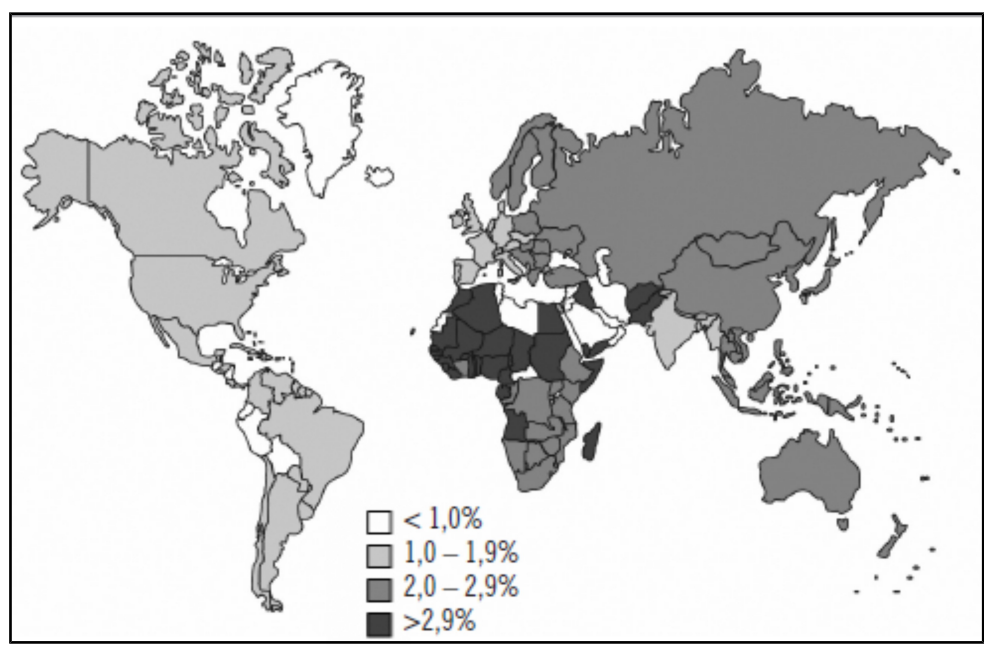


Figura 4 - Prevalência estimada da infecção pelo HCV de acordo com a região geográfica (adaptado de Perz, 2004).

Segundo Shepard e colaboradores (2005), a prevalência do HCV no Brasil é de 1,1%. Essa estatística é baseada na investigação de pacientes positivos para HCV em bancos de sangue, entretanto, este dado não é preciso uma vez que somente uma pequena parcela da população pratica a doação de sangue e se submete a esse procedimento. Desta forma, este dado de prevalência pode estar mascarando uma possível prevalência maior da hepatite C no Brasil. Todavia, um estudo realizado por Paltanin e Reiche (2002), também em bancos de sangue brasileiros, mostrou uma positividade para HCV de 0,9%, semelhante ao apresentado por Shepard.

1.2.4 Patogênese

A infecção pelo HCV raramente é diagnosticada na fase aguda, isso porque a maioria dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos. A fase aguda da HC é tipicamente definida como os primeiros 6 meses após a exposição vírica. A principal complicação da infecção aguda pelo HCV é a evolução para a cronicidade (Westbrook et al., 2014). A infecção aguda caracteriza-se pela presença do RNA viral no soro, pelo aumento das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e pela soroconversão com o aparecimento de anticorpos anti-HCV (Sharma et al., 2014).

A infecção aguda é um processo dinâmico que pode ser dividido em 3 fases, havendo continuidade entre elas. Na primeira fase, ou “pré-ramp-up”, com uma duração média de 7-21 dias, mas podendo estender-se até aos 2 meses, a carga vírica torna-se quantificável. Efetivamente, a viremia é o primeiro sinal detectável de infecção. Na segunda fase, ou “ramp-up”, com uma duração média de 8-10 dias, os níveis de RNA viral aumentam exponencialmente. Na terceira e última fase, ou “plateau”, que ocorre entre 40-60 dias, há estabilização da viremia. Após esta fase, a infecção pode resolver espontaneamente ou progredir para infecção crônica (Sharma et al., 2014).

A resolução espontânea (RE) da HC aguda ocorre numa percentagem que varia entre os 15-40% dos doentes, apesar de existir alguma discordância entre os estudos. Considera-se que há RE quando a carga viral de RNA não é detectável no soro num intervalo de 3 a 6 meses após a exposição. Contudo, pelo facto da maioria dos doentes ser assintomática, é difícil definir o período em que esta ocorre (Westbrook et al., 2014).

A maioria dos doentes infetados evolui para a cronicidade (cerca de 75-85% dos casos). A Hepatite C crônica define-se pela persistência do RNA do HCV por mais de 6 meses após a transmissão vírica. Esta transição de infeção aguda para infeção crônica é, frequentemente sub-clínica. O diagnóstico de HC crônica baseia-se na detecção de anti-HCV e RNA do HCV, na presença de sinais de hepatite crônica, enzimas hepáticas elevadas ou alterações histológicas como por exemplo a fibrose (Sharma et al., 2014).

1.2.5 Replicação do HCV

Os mecanismos de interação do HCV com a célula hospedeira não estão bem estabelecidos devido à falta de modelos de culturas celulares eficientes que possibilitem esse estudo. Acredita-se que a membrana do HCV é originada a partir da membrana do retículo endoplasmático do hospedeiro e que a proteína E1 funcione como proteína de fusão do envelope com a membrana do hospedeiro durante a infeção. De modo semelhante, a glicoproteína E2 é a responsável pela ligação a receptores celulares do hospedeiro (Tellinghuisen et al., 2002).

A interação das proteínas não estruturais do HCV com a membrana do retículo endoplasmático forma um complexo de replicação que otimiza o processo de produção de novas partículas virais, protegendo-as da degradação intracelular. De acordo com Moradpour e colaboradores (2003), a formação desse complexo é responsável pela alteração na conformação das membranas do retículo endoplasmático da célula infectada.

A polimerase de RNA dependente de RNA do HCV mostra-se suficiente para iniciar a transcrição do RNA viral, mesmo sem a formação do complexo de replicação (Demarini et al., 2003), no entanto, Moradpour e colaboradores (2003) mostraram que a associação da RNA polimerase viral às membranas é essencial para a replicação do ácido nucleico do vírus. Finalmente a liberação das partículas virais recém-formadas ocorre por exocitose, estando os virions dentro das vesículas produzidas pelo retículo endoplasmático (Figura 5) (Rosenberg, 2001).

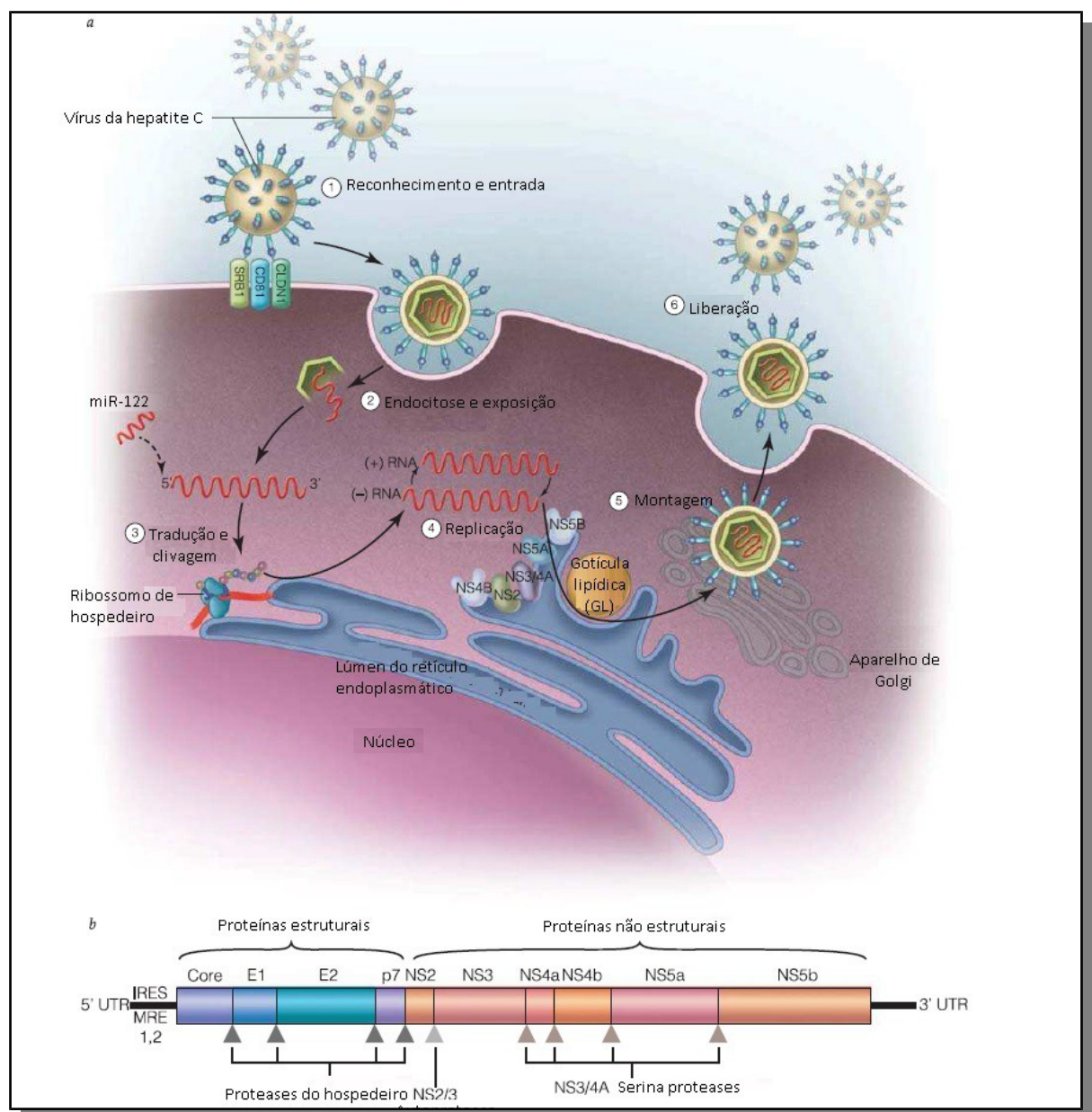


Figura 5 – Replicação do HCV (Adaptado de Rosenberg, 2001)

1.3 A RESPOSTA IMUNE NA HEPATITE C

A existência de quasiespecies e a grande capacidade mutagênica do vírus da hepatite C propiciam o constante escape à intensa resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro. Assim, cerca de 85% dos indivíduos infectados evoluem para a cronicidade. A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, em anos ou décadas, costuma apresentar um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas com enzimas normais até a hepatite crônica intensamente ativa, cirrose e hepatocarcinoma (Missale et al., 1998).

A resposta do hospedeiro face a uma infecção pelo HCV é composta por uma resposta imune não específica, incluindo a produção interferon e ação de células *natural-killer*, e por resposta anti-viral específica, incluindo os componentes da resposta humoral e celular (Cojocar et al., 2007).

Na resposta ao HCV, os estudos mostram que na fase aguda da infecção uma resposta sustentada pelas células TCD4+ e TCD8+ está intimamente associada com um curso de auto-limitação da infecção (Ishii & Koziel, 2008). As células TCD4+ são cruciais para o controle bem-sucedido do HCV, uma vez que na ausência de resposta dessas células, tanto as células TCD8+ específicas quanto a produção de anticorpos neutralizantes não conseguem controlar a viremia do HCV (Kaplan et al., 2007). Semelhantemente a resposta no HBV, as células TCD8+ assumem tanto uma função efetora não citolítica quanto citolítica (Guidotti & Chisari, 2001), sendo que na infecção aguda essa resposta é mais vigorosa e tem como alvos múltiplos epítomos, enquanto que na fase crônica a resposta ocorre de forma mais lenta e como uma diminuição na quantidade de epítomos (Wedemeyer et al., 2002).

Embora a resposta de células T específicas à infecção sejam essenciais no combate as hepatites B e C, elas também podem causar danos e reações autoimunes no fígado, especialmente no contexto da infecção viral crônica. Portanto, muitos mecanismos de regulação do sistema imunológico controlam as respostas imunitárias específicas aos vírus a fim de evitar danos no tecido (Billerbeck et al., 2007).

1.4 AS CÉLULAS TREG COMO MECANISMO DE CONTROLE DA RESPOSTA IMUNE

Estudos clínicos sugerem que as células T reguladoras (Treg) participam da supressão da imunidade celular para HCV. Com efeito, um aumento no número e na funcionalidade de Tregs tem sido detectado em pacientes com infecção crônica pelo HCV, em comparação com aqueles cuja infecção foi resolvida (Ward *et al.*, 2007).

As Tregs representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25+ e do fator nuclear FOXP3. Induzem a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica. Atualmente são descritas pelo menos dois tipos de Tregs: naturais e adaptativas (Bacchetta *et al.*, 2007) .

As chamadas Tregs naturais expressam constitutivamente o receptor de cadeia α da IL-2 (CD25), sendo assim denominadas CD4+CD25+ (Yagi *et al.*, 2004). São produzidas naturalmente nos corpúsculos de Hassal no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e representam 5% a 10% das células T CD4+ periféricas. Além do marcador CD25 as Tregs naturais também expressam outros marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação destas células, entre os quais estão: CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), GITR (*Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), TNFR-2 (*tumor necrosis factor receptor-2*) e HLA-DR (*human leucocyte antigen*) (Sakaguchi *et al.*, 2005).

As Tregs denominadas adaptativas, por sua vez são geradas na periferia após uma variedade de estímulos antigênicos ou em condições ditas tolerogênicas, (Taams *et al.*, 2006). Estas células exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (Januleit *et al.*, 2003). Vários tipos de Tregs adaptativas têm sido descritos, incluindo TR1, que produzem IL-10 e cuja função supressiva está bem documentada nas doenças alérgicas, autoimunes e transplante alogênico⁵. Outras Tregs adaptativas citadas são: TR3 (produtoras de TGF- β), células T CD4-CD8-, *natural-killer*, CD8+ supressora e gama-delta (Tang *et al.*, 2008).

1.5 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3

O gene *FOXP3* humano está localizado no braço curto do cromossomo X, consiste de 11 exons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos, também denominada FOXP3 (Figura 6). É expresso predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos e particularmente nas células TCD4⁺ e CD25⁺. A proteína FOXP3 é um fator de transcrição, cuja função é exercida sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos. Acredita-se que o fator FOXP3 exerça funções efetora e facilitadora sobre os genes de proteínas chaves na ativação celular, incluindo a IL-2 e o GM-CSF (Torgerson et al., 2007).

O fator FOXP3 é membro da subfamília P das proteínas FOX e assim como os demais fatores de transcrição, é composto por três domínios (repressor, central e ligante de DNA ou *forkhead*). No domínio *forkhead* foram identificadas a maioria das mutações que afetam o gene *FOXP3*, denominadas missenses (as que levam a substituição de um aminoácido por outro); muito embora outros tipos de mutações (deleções ou substituições) possam ocorrer e afetar os outros domínios (Coffer et al., 2004).

A importância do *FOXP3* nas células Treg foi bem estabelecida a partir do estudo de Brunkow *et al.* (2001), os quais identificaram uma mutação no gene *FOXP3*, responsável pelo fenótipo de camundongos *scurfy* que apresenta distúrbios autoimunes graves.

A mutação do *FOXP3* é observada nos pacientes com a síndrome IPEX (*Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), uma doença fatal ligada ao cromossomo X, caracterizada clinicamente por múltiplas doenças autoimunes (Bennett *et al.*, 2001; Gambineri *et al.*, 2003; Bacchetta *et al.*, 2006). Tanto os camundongos *scurfy* quanto indivíduos com síndrome IPEX apresentam deficiência de células Treg funcionais, devido à alteração genética no fator de transcrição FOXP3, enfatizando, assim, a sua importância no desenvolvimento das células Treg (Ziegler, 2006).

1.6 O POLIMORFISMO *rs3761549*

Os polimorfismos localizados na região promotora do gene *FOXP3* podem direta ou indiretamente alterar o nível de expressão de *FOXP3* nas células e, consequentemente, o desenvolvimento e função de células Treg (Oda *et al.*, 2013). O polimorfismo *rs3761549* ocorre devido uma substituição de citosina (C) para timina (T) na posição -2383 da região promotora do gene, correspondendo aos alelos C e T, respectivamente (Zhang *et al.*, 2009).

A diferença funcional entre ambos os alelos do polimorfismo *rs3761549* foi inicialmente proposto pelo estudo de Inoue e colaboradores, que sugeriram o alelo T como essencial para a ligação do fator de transcrição Ying-Yang-1 (YY1) ao gene *FOXP3*, quando comparado ao alelo C. Os autores sugerem que portadores do genótipo CC apresentam um baixo nível de expressão de *FOXP3* e, consequentemente, uma redução na função supressora das células Treg. Particularmente, esta diminuição da função reguladora pode aumentar a atividade de células T auto reativas causando uma grave destruição do tecido da tireoide em pacientes portadores da doença de Hashimoto (Inoue *et al.*, 2010).

Além de ter sido associado com endometriose (André *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2012) e doenças autoimunes da tireoide (Inoue *et al.*, 2010; Bossowski *et al.*, 2014), o polimorfismo *rs3761549* foi associado também com alergia alimentar (Bottema *et al.*, 2010), psoríase (Song *et al.*, 2012), carcinoma hepatocelular relacionado à Hepatite B (Chen, Y. *et al.*, 2013). Entretanto, nenhum tipo de associação foi observado em rinite alérgica (Zhang *et al.*, 2009) e câncer de mama (Jahan *et al.*, 2014).

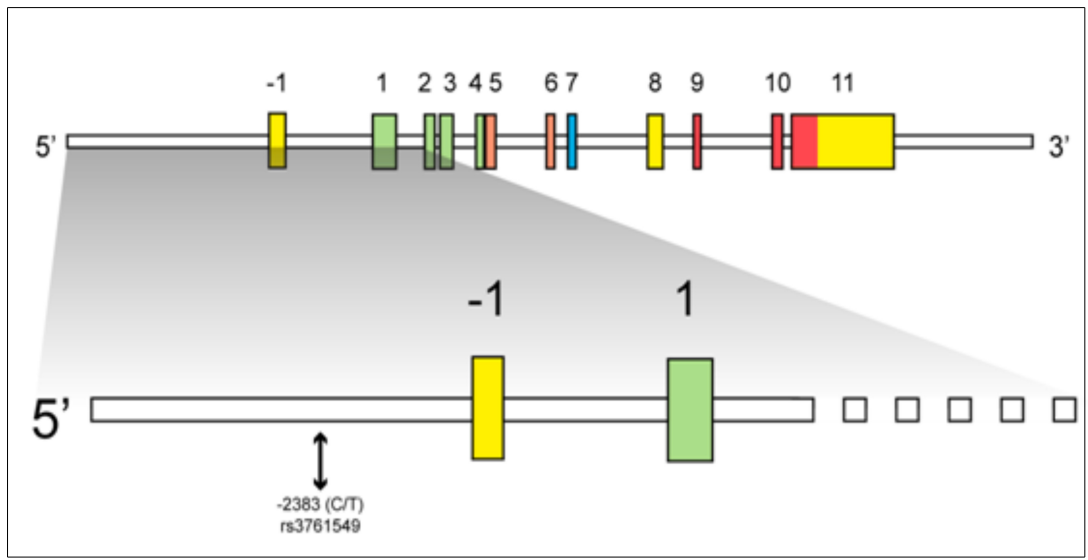


Figura 6 - Representação esquemática do gene *FOXP3* e a localização do polimorfismo rs3761549 na região promotora. (Adaptado de Hermes, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência do polimorfismo -2383 (C>T) (*rs3761549*) do gene *FOXP3* em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite C buscando identificar associações com a progressão da infecção.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (*rs3761549*) do gene *FOXP3* em portadores de hepatite C, e no grupo controle;

- Correlacionar a frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (*rs3761549*) do gene *FOXP3* com os marcadores bioquímicos de atividade hepática [níveis séricos de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e gama glutamil transpeptidase (GGT)] e moleculares (HCV-RNA) da hepatite C crônica.

- Correlacionar a frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (*rs3761549*) no gene *FOXP3* com os níveis de atividade inflamatória e injúria hepática segundo a classificação francesa de METAVIR.

3. MATEIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS 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).

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo transversal e analítico, cuja coleta de material foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário João Barros Barreto onde foram selecionados casos consecutivos de pacientes portadores crônicos do HCV.

Todos os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente e submetidos à investigação complementar que consta de exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos e virológicos, sendo estes dados transcritos dos prontuários para o protocolo de pesquisa específico.

O estudo contou com a participação de dois grupos distintos:

a) Grupo 1 – 95 amostras de portadores crônicos de hepatite C, caracterizados por alterações clínicas e dos testes hepáticos.

b) Grupo 2 – 300 amostras de doadores saudáveis do HEMOPA, os quais apresentarem negatividade para marcadores sorológicos das hepatites B, C, D e HIV.

Em virtude do gene *FOXP3* estar localizado no cromossomo sexual, dividiu-se as populações em masculina e feminina.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO

Foram incluídos indivíduos com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os gêneros, persistência de alanino-aminotransferases elevadas ou não e que não estejam fazendo terapia antiviral. Foram excluídos da pesquisa indivíduos que não preencherem os requisitos estipulados acima e aqueles pacientes coinfectados pelo vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite D (HDV) e/ou Vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pacientes que utilizaram ou estejam em uso de terapia antiviral específica contra o HCV.

3.4 PROCEDIMENTOS HISTOPATOLÓGICOS

Espécimes de biópsia hepática foram obtidos apenas daqueles pacientes com indicação médica para investigação de alterações de parênquima hepático, dentro do protocolo de atendimento clínico. As biópsias hepáticas foram realizadas por profissionais médicos, com agulha de Trucut e dirigidas pela ultra-sonografia. Cada amostra foi examinada no Departamento de Anatomia Patológica da UFPA, obedecendo às rotinas de serviços, 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 francesa de METAVIR (Bedossa & Poynard, 1996), pontuando a atividade do infiltrado inflamatório periportal e peri-septal (atividade inflamatória) de 0 a 3 (A0-A3). As alterações estruturais do parênquima hepático (grau de fibrose) foram pontuadas de 0 a 4 (F0-F4), onde se adotou que “F0-F2” indica injúria hepática moderada e “F3-F4” injúria hepática avançada. Pacientes não submetidos ao protocolo de biópsia, cujo os dados referentes aos aspectos histopatológicos constavam no prontuário, também foram classificados segundo a mesma metodologia.

3.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

3.5.1. Extração de DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA total a partir de células do sangue total periférico das amostras, de acordo com o protocolo do kit de isolamento de ácido nucléico da *Puregene, Gentra Systems, Inc. USA*. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

3.5.2 Identificação do Polimorfismo rs3761549

Para a genotipagem do polimorfismo *rs3761549* foi empregada a técnica de PCR em tempo real (qPCR), utilizando o equipamento StepOne PLUS Sequence Detector (AppliedBiosystems, Foster City, CA, E.U.A.). Utilizando *primers* e sondas do ensaio *TaqMan® SNP Genotyping Assays C_27058744_10* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para cada reação foram utilizados 7 µl de água destilada, 10 µl de TaqMan® Universal PCR Master Mix [2X], 1 µl de TaqMan® Assay [20X] e 2 µl de DNA extraído, totalizando 20 µl de volume final. Na amplificação e detecção dos polimorfismos foram utilizadas as seguintes ciclagens de temperatura: 60 °C por 30 segundos, seguido de 95°C por 10 minutos, e 50 ciclos das de 92 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 minuto e 30 segundos.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estimativa das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo estudado foi estimada por contagem direta. A comparação dessas frequências entre os grupos e a análise de equilíbrio genotípico foi realizada através do teste G e da lei de equilíbrio de Hardy-Weinberg, respectivamente. A frequência do polimorfismo foi correlacionada às variáveis do estudo através do teste Manny Whitney. Todas essas análises estatísticas foram realizadas através do programa bioestat 5.0 e Graphpad Prism 6.1, adotando um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA

Para o polimorfismo em questão, a frequência genotípica de CC na população feminina de portadores da hepatite C crônica foi de 37 (82,22%) e de 133 (89,26%) no grupo controle feminino. O genótipo CT, obteve frequência de 8 (17,77%) no grupo de pacientes infectadas e de 16 (10,72%) no grupo controle feminino. O genótipo TT não foi encontrado em nenhum dos grupos femininos. Não houve significância estatística na frequência genotípica do polimorfismo ($p=0,2088$). A distribuição dos genótipos encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde o grupo de portadores da hepatite crônica apresentou $p=0,5128$ e o grupo controle $p=0,4886$.

Foi determinada a frequência alélica da população feminina na qual observou-se que o alelo selvagem C foi encontrado em 82 (91,11%) mulheres infectadas e em 149 (94,63%) do grupo controle feminino. O alelo mutante T estava presente em 8 (8,89%) mulheres infectadas e em 16 (5,37%) do grupo controle feminino. Não houve significância estatística na análise da frequência alélica da população feminina ($p=1,0000$).

Na população masculina determinou-se a frequência alélica, na qual 47 (94,00%) homens infectados pelo vírus da hepatite C possuíam o alelo selvagem C enquanto este estava presente em 138 (91,39%) homens do grupo controle. A frequência do alelo T foi de 3 (6,00%) no grupo de homens infectados e de 13 (8,61%) no grupo controle. Não houve significância estatística na frequência alélica da população masculina ($p=0,7653$) (tabela 1).

Tabela 1 – Frequência alélica e genotípica do polimorfismo rs3761549 (C>T) do gene *FOXP3* nos portadores de hepatite C crônica e grupo controle.

Perfil genotípico e alélico	H.C.C n(%)	G.C n(%)	p*
Mulheres			
rs3761549 (C>T)			
CC	37 (82,22)	133 (89,26)	0,2088
CT	8 (17,77)	16 (10,72)	
TT	0	0	
*C	82 (91,11)	149 (94,63)	1,0000†
*T	8 (08,89)	16 (05,37)	
Homens			
rs3761549 (C>T)			
C	47 (94,00)	138 (91,39)	0,7653†
T	3 (6,00)	13 (08,61)	

H.C.C: portadores de hepatite C crônica; G.C: grupo controle; *: alelos analisados; *: Qui-quadrado; †: Teste Exato de Fischer.

4.2 ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS

No que diz respeito a comparação da frequência do polimorfismo rs3761549 com os aspectos histopatológicos, 34 (91,89%) portadores do genótipo CC e 3 (8,11%) portadores do genótipo CT apresentaram grau de atividade inflamatória de 0 a 1. 23 (92,00%) portadores do genótipo CC e 2 (8,00%) portadores do genótipo CT

apresentaram grau de atividade inflamatória de 2 a 3. Não observou-se diferença significativa em relação a atividade inflamatória ($p=1,0000$).

17 (89,47%) portadores do genótipo CC e 2 (10,53%) portadores dos genótipos CT apresentaram injúria hepática moderada, enquanto 53 (91,38%) portadores do genótipo CC e 3 (05,17%) portadores do genótipo CT apresentaram quadro de injúria hepática avançada. Não houve significância estatística em relação aos níveis de injúria hepática ($p=0,9913$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação da frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (rs3761549) do gene *FOXP3* com os aspectos histopatológicos dos portadores de hepatite C crônica.

Perfil genético	Atividade Inflamatória		p [#]
	0-1 n (%)	2-3 n (%)	
rs3761549 (C>T)			
HCV			
CC	34 (91,89)	23 (92,00)	1,0000
CT	3 (08,11)	2 (08,00)	
TT	0	0	
Perfil genético	Injúria Hepática		p [#]
	Moderada n (%)	Avançada n (%)	
rs3761549 (C>T)			
HCV			
CC	17 (89,47)	53 (91,38)	0,9913
CT	2 (10,53)	3 (05,17)	
TT	0	2 (03,45)	

4.3 ASPECTOS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES

Quando comparados a carga viral plasmática do HCV ($p=0,4916$), os níveis de ALT ($p=0,2145$) e AST($p=0,1938$) entre os genótipos, não verificamos significância estatística, entretanto, a comparação dos valores de GGT entre os genótipos apresentou uma significância estatística com $p=0,0369$ (Figura 7).

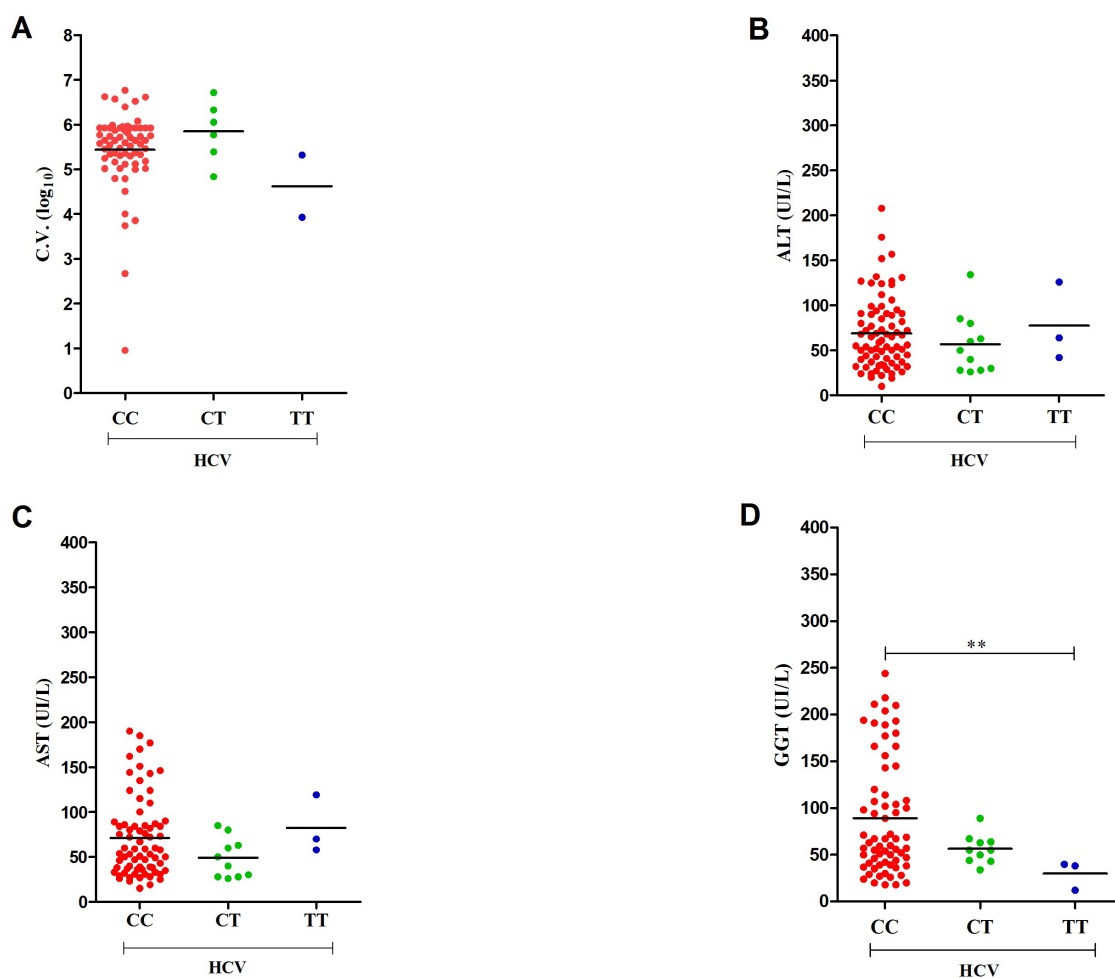


Figura 7 – Comparação da carga viral plasmática do HCV, níveis de ALT e AST entre os genótipos

5. DISCUSSÃO

Segundo Cheney e colaboradores (2000), o sistema imune do hospedeiro do HCV desempenha um papel duplo onde participa tanto limitando a replicação do vírus, como estabelecendo a lesão tecidual. Assim, na infecção crônica pelo HCV, a resposta imune celular está implicada na lesão hepatocelular, além de ser fator determinante para a cronificação da doença e a resistência ao tratamento antiviral (Cacciarelli *et al.*, 1996; Edwards-Smith *et al.*, 1999).

Estudos vem investigando a relevância imunogenética de polimorfismos em um único nucleotídeo localizados na região promotora do gene *FOXP3*, devido à mesma estar envolvida na iniciação da transcrição e na interação com elementos de atuação em cis que regulam a expressão gênica, podendo refletir eventualmente no nível de expressão de *FOXP3* e assim na ativação das células Treg, no âmbito, por exemplo, de susceptibilidade a infecções (Hoogendoorn *et al.*, 2003). O polimorfismo trabalhado em nosso estudo já foi associado a endometriose, independentemente da fase da doença (André *et al.*, 2011); com a psoríase (Song *et al.*, 2012) e a alergia alimentar (Bottema *et al.*, 2010). O genótipo CC foi relacionado a gravidade da doença de Hashimoto (Inoue *et al.*, 2010) e o alelo T foi considerado um fator de risco associado ao lúpus eritematoso sistêmico na população chinesa (Lan *et al.*, 2010).

No que diz respeito as hepatites virais, existem poucos estudos que investigam a associação do polimorfismo rs3761549 no gene *FOXP3*. Apenas um estudo foi realizado por Chen e colaboradores em pacientes chineses com carcinoma hepatocelular (CHC) relacionado a hepatite B crônica, onde foi encontrada uma frequência significativa do genótipo CC em pacientes carcinogênicos, enquanto os genótipos CT e TT foram associados a recorrência do CHC. Em nosso estudo, contudo, estimamos a frequência alélica e genotípica do polimorfismo em um grupo de portadores do vírus da hepatite C e outro grupo controle, e observamos que não houve uma diferença significativa de um genótipo ou alelo específico em indivíduos infectados, em relação a indivíduos não infectados pelo vírus da hepatite C.

Um estudo realizado por Speletas e colaboradores (2010) afirma que a expressão do gene *FOXP3* aparece significativamente aumentada em pacientes portadores do vírus da hepatite C e esta foi correlacionada com a intensidade da inflamação. Entretanto, os testes estatísticos realizados por nosso estudo, sugerem que o aumento da atividade inflamatória, e da presença ou ausência de cirrose não estão sendo orientados pela presença do polimorfismo, uma vez que não houve significância estatística na comparação da frequência do polimorfismo com aspectos histopatológicos dos portadores de hepatite C crônica.

Segundo Whitfield (2001), a injúria hepática ou o bloqueio dos ductos biliares podem causar um acúmulo de GGT no fígado e excessiva secreção na circulação sanguínea. Na prática clínica, os valores circulantes de GGT são comumente utilizados como potenciais indicadores de dano hepático. Nosso estudo apresentou uma significância estatística dos valores de GGT quando comparado aos genótipos do polimorfismo em portadores de hepatite C crônica. Sugere-se que uma maior expressão do gene *FOXP3* e consequentemente um maior desenvolvimento e função das células Treg em portadores do genótipo mutante TT, expliquem os níveis mais baixos de GGT nesta população.

Os resultados de Ward e colaboradores (2007) complementam diversos estudos anteriores que indicam que as respostas imunes mediadas por células T desempenham um importante papel na progressão da doença. Nossos resultados mostram que a presença do polimorfismo rs3761549 no gene *FOXP3* pode indiretamente influenciar na progressão da infecção pelo vírus da hepatite C.

6. CONCLUSÃO

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou uma análise a cerca da interação do polimorfismo rs3761549 do gene *FOXP3* com a hepatite C crônica, gerando informações que podem ser usadas como base para estudos clínicos e terapêuticos futuros. Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- O genótipo CC predominou tanto na população feminina de portadoras de hepatite C crônica quanto no grupo controle. Seguido do genótipo CT. A frequência do alelo C também se sobressaiu sobre a frequência do alelo T no grupo de mulheres. A frequência alélica de C também foi superior a frequência de T no grupo de homens infectados e no grupo controle.

- Quando correlacionamos a frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (rs3761549) com os níveis de atividade inflamatória e injúria hepática não observamos significância estatística.

- Ao correlacionarmos a frequência do polimorfismo -2383 (C>T) (rs3761549) com os marcadores moleculares (Carga viral) e bioquímicos de atividade hepática (ALT e AST), não observamos significância estatística. Entretanto, uma significância estatística foi observada na correlação com os níveis do marcador bioquímico GGT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTER HJ, PURCELL RH, SHIH JW, MELPOLDER JC, HOUGHTON M, CHOO QL, et al. (1989). **Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis.** N Engl J Med. 30: 1494-1500.
- ANDRÉ, G.M., BARBOSA, C.P., TELES, J.S., VILARINO, F.L., CHRISTOFOLINI, D.M., BIANCO, B. (2011) **Analysis of *FOXP3* polymorphisms in infertile women with and without endometriosis.** Fertility and sterility 95(7): 2223–2227.
- ASHFAQ, U. A., JAVED, T., REHMAN, S., NAWAZ, Z., RIAZUDDIN, S. (2011) **An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses.** Virology Journal 8: 161.
- BACCHETTA R, GAMBINERI E, RONCAROLO MG. (2007) **Role of regulatory T cells and *FOXP3* in human diseases.** J Allergy Clin Immunol. 120(2):227-35; quiz 36-7.
- BACCHETTA, R., PASSERINI, L., GAMBINERI, E., DAI, M., ALLAN, S. E., PERRONI, L., DAGNA-BRICARELLI, F., SARTIRANA, C., MATTHES-MARTIN, S., LAWITSCHKA, A., AZZARI, C., ZIEGLER, S.F., LEVINGS, M.K., RONCAROLO, M.G. (2006). **Defective regulatory and effector T cell functions in patients with *FOXP3* mutations.** Journal of Clinical Investigation 116: 1713–1722.
- BARTENSCHLAGER, R.; LOHMANN V. (2000) **Replication of hepatitis C virus.** J. Gen. Virol. 81: 1631-1648.
- BENNETT, C.L., CHRISTIE, J., RAMSDELL, F., BRUNKOW, M.E., FERGUSON, P.J., WHITESELL, L., KELLY, T.E., SAULSBURY, F.T., CHANCE, P.F., OCHS, H.D. (2001) **The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*.** Nature Genetics 27(1): 20–21.
- BERASAIN, C., AVILA, M. A. (2015). **Regulation of hepatocyte identity and quiescence.** Cellular and Molecular Life Sciences 20: 3831-51.
- BERNE R, LEVY M. (2009). **Tratado de Fisiologia Humana.** 4 ed. Rio de Janeiro. Guanabara-koogan.
- BILLERBECK, E., BOTTLER, T., THIMME, R. (2007) **Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8⁺ Tcells in chronic hepatitis C virus infection.** World Journal of Gastroenterology 13 (36): 4858-4864.
- BISCEGLIE, A.M.D. (1999) **Hepatitis C – virology ad future antiviral targets.** Am. J. Med. 107: 45-48.
- BLONHOFF R, WAKE K (1991). **Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinal metabolism and fibrosis.** 5: 271-277.

BOSSOWSKI, A., BORYSEWICZ-SAŃCZYK, H., WAWRUSIEWICZ-KURYLONEK, N., ZASIM, A., SZALECKI, M., WIKIERA, B., BARG, E., MYŚLIWIEC, M., KUCHARSKA, A., BOSSOWSKA, A., GOŚCIK, J., ZIORA, K., GÓRSKA, M., KRĘTOWSKI, A. (2014). **Analysis of chosen polymorphisms in *FoxP3* gene in children and adolescents with autoimmune thyroid diseases.** Autoimmunity 47(6): 395–400.

BOTTEMA, R.W., KERKHOF, M., REIJMERINK, N.E., KOPPELMAN, G.H., THIJS, C., STELMA, F.F., SMIT, H.A., BRUNEKREEF, B., VAN SCHAYCK, C.P., POSTMA, D.S. (2010). **X-Chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts.** Allergy 65: 865-874.

BRUNKOW, M. E., JEFFERY, E. W., HJERRILD, K. A., PAEPER, B., CLARK, L. B., YASAYKO, S. A., WILKINSON, J.E., GALAS, D., ZIEGLER, S.F., RAMSDELL, F. (2001). **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** Nature Genetics 27: 68–73.

CACCIARELLI, T. V.; MARTINEZ, O. M.; GISH, R. G. et al. (1996). **Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: preand posttreatment with interferon alfa.** Hepatology. v. 24, n.1, p.6-9.

CHAN J (2014) **Hepatitis C.** Disease-a-Month 60: 201-212.

CHEN, Y., ZHANG, H., LIAO, W., ZHOU, J., HE, G., XIE, X., FEI, R., QIN, L., WEI, L., CHEN, H. (2013). **FOXP3 gene polymorphism is associated with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma in China.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR 32: 39.

CHENEY, C. P.; CHOPRA, S.; GRAHAM, C. (2000). **Hepatitis C.** Infect Dis Clin North Am. v.14, n.3, p.633-667.

CHIBA J, OHBA h, MATSUURA Y, WATANABE Y, KATAYAMA T, KIKUCHI S, SAITO I, MIYAMURA T. (1991) .Serodiagnosis od hepatitic C virus (HCV) infection of with an HCV core protein molecularly expressed by recombinat baculovirus. **Proc. Natl. Acad. Sei USA.** V. 88(11), p. 4641-5.

COFFER PJ, BURGERING BM. (2004) **forkhead-box transcription factors and their role in the immune system.** Nat Rev Immunol. 4(11):889-99.

COJOCARU M, COJOCARU IM, IACOB S. (2007) **HCV Infection – related autoimmunity.** Rom J Intern Med. 3(2):230-235.

DEMARINI DJ, JOHNSTON VK, KONDURI M, GUTSHALL LL, SARISK RT. (2003) intracellular hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity. J. virol. Methods. V. 113(1), p. 65-8.

EDWARDS-SMITH, C. J.; JONSSON, J. R.; PURDIE, D. M. et al. (1999). **Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa.** Hepatology. v.30, n.2, p.526-530.

ESTEBAN JI, ESTEBAN R, VILADOMIU L, LÓPEZ-TALAVERA JC, GONZÁLEZ A, HERNÁNDEZ JM, et al. (1989) **Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain.** Lancet. 2: 294-297.

GAMBINERI, E., TORGERSON, T.R., OCHS, H.D. (2003) **Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of *FOXP3*, a critical regulator of T-cell homeostasis.** Current Opinion in Rheumatology 15: 430–435.

GARTNER P., HIATT L. (2003) **Tratado de histologia.** 5. ed. Rio de Janeiro. Guanabara-koogan.

GEERTS A. (2001). **History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells.** Seminars in Liver Diseases 21: 311-335.

GUIDOTTI, L. G., ROCHFORD, R., CHUNG, J., SHAPIRO, M., PURCELL, R., CHISARI, F. V. (1999) **Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection.** Science 284 (5415): 825-829.

HARTTROFT WS, RIDOUT JH. (1951). **Pathogenesis of cirrhosis produced by choline deficiency; escape of lipid from fatty hepatic cysts into the biliary and vascular systems.** Am J Pathol. 27: 951-989.

HOOGENDOORN, B., COLEMAN, S. L., GUY, C. A., SMITH, K., BOWEN, T., BUCKLAND, P. R., O'DONOVAN, M. C. (2003) **Functional analysis of human promoter polymorphisms.** Human Molecular Genetics 12 (18): 2249-2254.

INOUE, N., WATANABE, M., MORITA, M., TOMIZAWA, R., AKAMIZU, T., TATSUMI, K., HIDAKA, Y., IWATANI, Y. (2010). **Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of *FOXP3* with prognosis of autoimmune thyroid diseases.** Clinical and Experimental Immunology 162(3): 402–406.

ISHII, S., KOZIEL, M. J. (2008) **Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus.** Clinical Immunology 128 (2): 133-147.

JAHAN, P., RAMACHANDER, V.R.V., MARUTHI, G., NALINI, S., LATHA, K.P., MURTHY, T.S.R. (2014) ***Foxp3* promoter polymorphism (rs3761548) in breast cancer progression: a study from India.** Tumour Biology 35: 3785–3791.

JONULEIT H, SCHMITT E. (2003) **The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations.** J Immunol.171(12): 6323-7.

KAPLAN, D. E., SUGIMOTO, K., NEWTON, K., VALIGA, M. E., IKEDA, F., AYTAMAN, A., NUNES, F. A., LUCEY, M. R., VANCE, B. A., VONDERHEIDE, R. H., REDDY, K. R., MCKEATING, J. A., CHANG, K. M. (2007) **Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C.** Gastroenterology 132 (2): 654-666.

KESSELEVA T, BRENNER DA. (2006). **Hepatic stellate cells and the reverse of fibrosis.** Journal of gastroenterology and hepatology. 21: S84-S87.

LOHMANN, V.; KORNER, F.; HERIAN, U.; BARTENSCHLAGER, R. (1997) **Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity.** J. Virol. 71: 8416-8428.

MASSARD J, RATZIU V, THABUT D. (2006) **Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C.** Journal of Hepatology 44: S19-S24.

MISSALE G, BERTONI R, LAMONACA V, VALLI A, MASSARI M, MORI C, RUMI MG, HOUGHTON M, FIACCADORI F, FERRARI C. (1998) **Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response.** Journal of Clinical Investigation. 98:706-714.

MORADPOUR D, GOSERT R, EGGER D, PENIN F, BLUM HE. (2003). **Membrane association of hepatitis C virus nonstructural proteins and identification of the membrane alteration that harbors the viral replication complex.** Antiviral Res. v. 60(2), p. 103-9.

ODA, J.M.M., HIRATA, B.K.B., GUEMBAROVSKI, R.L., WATANABE, M.A.E.(2013). **Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases.** Journal of genetics 92(1): 163–171.

PALTANIN, REICHE EM. (2002) **Seroprevalence of anti-hepatitis C virus antibodies among blood donors.** Rev Saude Publica V. 36(4), p. 393-9.

PERZ JF, FARRINGTON LA, PECORARO C, HUTIN YJF, ARMSTRONG GL. (2004) **Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection.** In: 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America.

PICCIRILLO CA. (2008) **Regulatory T cells in health and disease.** Cytokine 2008;43(3):395-401.

POPPER H. (1977). **Pathologic aspects of cirrhosis: a review.** American Journal of Pathology 87: 227-264.

ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BRAND, D; AIT-GOUGHOUlte, M. (2004). **Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis.** Biol. Cell. 96: 103-108.

ROINGEARD, P.; HOURIOUX, C.; BLANCHARD, E.; BRAND, D; AIT-GOUGHOUlte, M. (2004). **Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis.** Biol. Cell. 96: 103-108.

SAEED U, WAHEED Y, ASHRAF M (2014) **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.

SAKAGUCHI, S. (2005). **Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nature Immunology* 6 (4): 345-352.

SHARMA SA, FELD JJ (2014) **Acute hepatitis C: management in the rapidly evolving world of HCV.** *Curr Gastroenterol Rep* 16:371

SHEPARD, C. W., FINELLI L., E ALTER, MJ. (2005) **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet infect dis*, 5, pp. 558-567.

SONG, Q.-H., SHEN, Z., XING, X.-J., YIN, R., WU, Y.-Z., YOU, Y., GUO, H., CHEN, L., HAO, F., BAI, Y. (2012). **An association study of single nucleotide polymorphisms of the *FOXP3* intron-1 and the risk of Psoriasis vulgaris.** *Indian journal of biochemistry & biophysics* 49(1): 25–35

SPELETAS M., KARANIKAS V., ZAMANAKOU M., KALALA F., LOULES G., KERENIDI T., (2010). Foxp3 expression in human cancer cells. *Journal of translational medicine*. 92:706-734.

STADHOUDERS, P.H.; COOREMAN, M.P. (1997) **Chronic hepatitis C virus disease: an evaluation of procedures for diagnosis and treatment.** *Neth. J. Med.*, 51: 213-224.

TAAMS LS, PALMER DB, AKBAR AN, ROBINSON DS, BROWN Z, HAWRYLOWICZ CM. (2006) **Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation.** *Immunology*. 118 (1),1-9.

TANG Q, BLUESTONE JA. (2008). **The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation.** *Nat Immunol*. 2008;9(3):239-44.

TAYLOR, D.R.; SHI, S.T.; LAI, M.M. (2000) **Hepatitis C virus and interferon resistance.** *Microbes Infect.* 2: 1743-1756.

TELLINGHUISEN TL, RICE CM. (2002) **Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors.** *Curr. Opin Microbiol*. V. 5(4), p. 419-27.

TORGERSON TR, OCHS HD. (2007). **Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases.** *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 7(6):515-21.

WARD S.M., FOX B.C., BROWN P.J., WORTHINGTON J., FOX S.B., CHAPMAN R.W., FLEMING K.A., BANHAM A.H., KLENERMAN P. (2007) **Quantification and localisation of *FOXP3*+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection.** *J. Hepatol*. 47(3), 316-24.

WEDEMEYER, H., HE, X. S., NASCIMBENI, M., DAVIS, A. R., GREENBERG, H. B., HOOFNAGLE, J. H., LIANG, T. J., ALTER, H., REHERMANN, B. (2002) **Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection.** *Journal of Immunology* 169 (6): 3447-3458.

WESTBROOK RH, DUSHEIKO G (2014) **Natural history of hepatitis C.** *Journal of Hepatology* 61: S58-S68

WHIDBY, J.; MATEU, G.; SCARBOROUGH, H.; DEMELER, B.; GRAKOU, A.; MARCOTRIGIANO, J. (2009). **Blocking hepatitis C virus infection with recombinant form of envelope protein 2 ectodomain.** *J. Virol.* 83(21):11078-11089.

YAGI H, NOMURA T, NAKAMURA K, YAMAZAKI S, KITAWAKI T, HORI S, *et al.* (2004). **Crucial role of *FOXP3* in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells.** *Int. Immunol.* 16(11):1643-56.

ZIEGLER, S. F. (2006). ***FOXP3*: Of mice and men.** *Annual Review of Immunology.* 24: 209–226.