

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia

AMANDA VANSAN MARANGON

Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina

Maringá
2010

AMANDA VANSAN MARANGON

Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Ana Maria Sell

Maringá
2010

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M311i Marangon, Amanda Vansan
Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com interferon-alfa peguilado e ribavirina. / Amanda Vansan Marangon. -- Maringá, 2010.
93 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno.
Co-orientador : Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sell.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, 2010.

1. Hepatite C. 2. Hepatite C - *KIR*. 3. Hepatite C - HLA. 4. Células NK. 5. Hepatite C - Tratamento. 6. Hepatite C crônica - Tratamento. 7. Hepatite C crônica fibrose. 8. Imunogenética. I. Moliterno, Ricardo Alberto, orient. II. Sell, Ana Maria, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas. Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.0796

ERRATA

MARANGON, Amanda Vansan. **Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina.** Maringá 2010. 93 f., il., color., figs., tabs. Dissertação (mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia)- Dep. de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2010.

Folha (tabela 2)	Linha da tabela	Onde se lê	Leia-se
28	2	C4, C5, C6	Cw4, Cw5, Cw6

FOLHA DE APROVAÇÃO

AMANDA VANSAN MARANGON

Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a Dr^a Luiza Tamie Tsuneto
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Dennis Armando Bertolini
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a Dr^a Neiva Sellan Lopes Gonçalves
Universidade Estadual de Campinas

Prof^a Dr^a Maria da Graça Bicalho
Universidade Federal do Paraná

Aprovada em 26 de fevereiro de 2010

Local de defesa: Sala 005, Bloco I-90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA(S)

Dedico este trabalho aos meus pais que muitas vezes desistiram dos próprios sonhos para que eu pudesse realizar os meus. A vocês todo o meu amor e a minha gratidão.

AGRADECIMENTO(S)

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, sabedoria e por ser tão generoso comigo.

Aos meus pais, Roberto e Edna, e a minha irmã Aline, pelo apoio, compreensão, amor e carinho. Sem vocês com certeza eu não teria conseguido.

Ao meu orientador Ricardo a minha admiração e gratidão, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança transmitida ao longo desses dois anos.

A minha co-orientadora Ana que em todos esses anos de convivência sempre me apoiou e me ensinou muito tanto no âmbito profissional, quanto pessoal e, mais que uma orientadora é uma amiga.

A professora Jeane que sempre me ajudou em todas as horas, e pela qual tenho grande carinho e admiração.

A toda equipe do Laboratório de Imunologia Básica da Universidade Estadual de Maringá, aos professores Luíza, Márcia, Rafael e Sueli.

Aos funcionários Fabiano, Marco, Helen, Edna, Silvana e Dona Neusa que estiveram presentes em todas as etapas vividas no mestrado, sempre me apoiando e incentivando.

As minhas amigas Gláucia, Daniela e Viviane pela amizade e companheirismo.

A Dayse, ao Dr. Giovanni e a todas as outras pessoas que muito generosamente forneceram as amostras as quais pude trabalhar.

As secretárias do PBF, Luciane e “Amelinha”, pela dedicação e prontidão em me atender e ajudar sempre que necessário.

E ainda, a todos aqueles que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

EPÍGRAFE

Dê o primeiro passo com fé.
Você não precisa ver toda a escada.
Apenas suba o primeiro degrau.

(MARTIN LUTHER KING JR.)

Influência dos genes *KIR* e HLA na progressão da hepatite C e na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina

RESUMO

A taxa de progressão da Hepatite C em portadores crônicos do vírus da hepatite C (VHC) ao estágio de cirrose é altamente variável e os fatores genéticos do hospedeiro que modificam o curso da doença não são bem entendidos. O objetivo deste estudo foi investigar os alelos HLA de classe I e II e os genes *KIR* e uma possível associação com a progressão da hepatite C e com a resposta ao tratamento. Para tanto, foram selecionados 145 pacientes com presença de RNA-VHC confirmado por testes moleculares, com infecção ocasionada somente pelo genótipo 1 do VHC. As alterações estruturais no fígado foram analisadas usando a classificação METAVIR, e os pacientes foram classificados em dois grupos: pacientes com alterações estruturais ausentes, leves ou moderadas (graus F0, F1, F2); e pacientes com alterações estruturais avançadas, incluindo cirrose (graus F3 e F4). Após a biópsia, os pacientes foram tratados com Interferon-alfa peguilado (1.5ug/ Kg/ dia) e Ribavirina (1g/ pac/ dia) durante 48 semanas para eliminação do VHC, os quais foram classificados em respondedores (RVS), não respondedores (NRS) e pacientes que responderam inicialmente, mas recidivaram dentro de 6 meses após término do tratamento (REC). Os pacientes foram tipificados utilizando a metodologia PCR-rSSO Luminex. A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher e χ^2 quadrado com correção de Yates, onde valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. O alelo DRB1*11 e o haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 apresentaram-se associados com proteção ao desenvolvimento de dano hepático severo ($P=0,0016$; OR=0,23; IC 95%=0,09-0,58 e $P=0,0032$; OR=0,24; IC 95%=0,08-0,64, respectivamente). Em relação à resposta ao tratamento foi encontrada associação entre resposta virológica sustentada e o alelo DQB1*03 ($P=0,03$; OR=2,4; 95% IC=1,14-5,0). Não foram encontradas associações entre os genes *KIR* e susceptibilidade ao VHC e desenvolvimento de dano estrutural no fígado. Entretanto, o ligante HLA-C2 foi associado à infecção crônica pelo VHC ($P= 0,04$; OR= 1,6; 95%IC=1,03-2,52). Conclui-se, portanto, que os alelos HLA-DRB1*11, DQB1*03, o haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 e o ligante HLA-C2 podem influenciar de forma distinta a progressão da hepatite C e a resposta ao tratamento.

Palavras-chave: Hepatite C, HLA, receptores KIR, células NK.

Influence of *KIR* genes and HLA ligands in both the progression of chronic hepatitis C and in the response to interferon-alfa peguilated and Ribavirin treatment.

ABSTRACT

The rate of hepatitis C progression to cirrhosis in individuals with hepatitis C virus (HCV) is highly variable and the host factors that modify the course of disease are poorly understood. The aim of this study was investigate the HLA class I and II and *KIR* genes and their possible association with progression of hepatitis C and response to treatment. For this, were selected 145 patients with RNA-HCV confirmed by molecular tests, infected only by the HCV genotype 1. The liver hepatic lesions were analyzed using METAVIR classification and the patients were classified in two groups: patients without or with mild structural lesions (F0, F1 and F2 degrees); and patients with advanced structural lesions, included cirrhosis (F3 e F4 degrees). After biopsies all patients were treated with interferon-alfa peguilated (1.5ug/ Kg/ dia) plus ribavirin(1g/ pac/ dia) for 48 weeks to clearence HCV, which were classified in responders (RVS), non responders (NRS) and patients that in the onset obtained response, but recidivate in the period of 6 months after end of treatment. The patients were typed using PCR-rSSO Luminex. Statistical analysis was performed using the Fisher exact test and Chi-Squares with Yates correction and $P < 0.05$ was considered significant. The DRB1*11 allele and the HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 haplotype were associated with protection to the development of hepatic damage ($P=0.0016$; OR= 0.23; IC 95%= 0.09 – 0.58 e $P= 0.0032$; OR= 0.24; IC 95%=0.08-0.64, respectively). With respect to the treatment response was found association between the DQB1*03 allele and sustained virological response ($P=0.03$; OR=2.4; 95% IC=1.14-5.0). No association between the *KIR* genes and susceptibility to HCV and development of hepatic damage. However the HLA-C2 ligand was associated to development of chronic hepatitis C ($P= 0.04$; OR= 1.6; 95%IC=1.03-2.52). In summary, the HLA-DRB1*11, DQB1*03, the HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 haplotype and the HLA-C2 ligand seems to influence in distinct ways the hepatitis C progression and the response to treatment

Keywords: Hepatitis C, HLA, *KIR* receptors, NK cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Localização e estrutura do MHC em humanos	16
Figura 2 Estrutura de uma molécula HLA de classe I.....	17
Figura 3 Estrutura de uma molécula HLA de classe II.....	18
Figura 4 Estrutura dos receptores KIR	21
Figura 5 Localização cromossômica dos genes <i>KIR</i>	22
Figura 6 Organização exon-intron dos genes <i>KIR</i>	24
Figura 7 Organização do haplótipo A e dois haplótipos B.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Epítomos de Bw4 e seus alelos correspondentes.....	27
Tabela 2 Receptores KIR e seus ligantes	28

Dissertação elaborada e formatada conforme
as normas das publicações científicas:

Journal of medical virology (artigo 1)

Disponível em:

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/32763/home>

Human Immunology (artigo 2) Disponível em:

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home

Hepatology (artigo 3) Disponível em:

<http://www3.interscience.wiley.com/journal/106570044/home/ForAuthors.html>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	13
1.1	O vírus.....	13
1.2	Transmissão.....	13
1.3	Grupo de risco.....	14
1.4	História Natural da infecção.....	14
1.5	Genes HLA.....	15
1.6	Moléculas HLA de classe I e classe II.....	16
1.7	HLA e Hepatite C.....	18
1.8	Célula Natural Killer.....	19
1.9	Receptores KIR.....	20
1.10	Genes <i>KIR</i>	21
1.11	Organização dos genes <i>KIR</i> e variabilidade Haplotípica.....	22
1.12	Ligantes de KIR.....	26
1.13	KIR e Hepatite C.....	28
1.14	Tratamento da hepatite C.....	29
1.15	HLA na resposta ao tratamento.....	30
1.16	Justificativas.....	31
1.17	Objetivos.....	32
1.18	Referências Bibliográficas.....	34
2	CAPÍTULO II.....	41
2.1	Efeito protetor de HLA-DRB1*11 no desenvolvimento de dano hepático em pacientes brasileiros com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.....	42
2.2	Analyzes of <i>KIR</i> genes and their HLA ligands in the progression to Cirrhosis in patients with Chronic Hepatitis C.....	59
2.3	Influência dos alelos HLA de classe I e II na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina em pacientes com hepatite C crônica.....	75
3	CAPÍTULO III.....	91
3.1	Conclusões.....	92
3.2	Perspectivas Futuras.....	93

CAPÍTULO I

O VÍRUS

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a maior causa mundial de doença hepática crônica, com cerca de 170 a 200 milhões de pessoas infectadas no planeta e 3 a 4 milhões de novos casos ao ano ⁽¹⁾. Destes indivíduos infectados, 50% irão necessitar de tratamento, podendo evoluir para cura ou, alternativamente, progressão da doença para hepatite crônica, cirrose, insuficiência hepática ou carcinoma hepatocelular. ⁽¹⁾

O VHC foi identificado pela primeira vez em 1989 ⁽²⁾ e nestes 20 anos desde a sua descoberta vem sendo alvo de intensas pesquisas e investigações clínicas quanto ao seu papel em causar doença hepática e a sua habilidade em persistir em face da defesa imunitária celular. O VHC é um vírus esférico e envelopado que pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *hepacivírus*. ⁽³⁾ Possui um genoma de 9600 nucleotídeos formado por uma fita positiva de RNA, 3 proteínas estruturais (core, E1 e E2) e 7 proteínas não estruturais (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) ⁽⁴⁾.

A comparação da sequência de nucleotídeos de diversas variantes do vírus encontradas em diferentes regiões do mundo, revelou a existência de pelo menos seis principais grupos genéticos do vírus (genótipos) que foram enumerados de 1 a 6. Cada um dos genótipos pode ser dividido em inúmeros subtipos (designados pelas letras a, b, c etc) ^(4,5). Alguns genótipos têm distribuição global (1-3), enquanto outros são somente encontrados em regiões específicas (5a e 6a) ⁽⁴⁾. No Brasil, os genótipos ou subtipos mais frequentes são 1a, 1b, 2a, 2b e 3, com predominância do genótipo 1 sobre os genótipos não-1 ⁽⁶⁾. Apesar de existirem alguns relatos feitos em diversas regiões do Brasil, ^(7,8) não se conhece ainda, com precisão, a prevalência e distribuição do VHC no país.

TRANSMISSÃO

O VHC é transmitido de forma eficaz através de contato direto com sangue contaminado. As taxas de transmissão vertical e perinatal são relativamente baixas (3-6%) e a transmissão via sexual tem sido considerada ineficiente ⁽⁹⁾. Em um estudo recente realizado na Itália, casais monogâmicos foram acompanhados por um período de 10 anos, e dos 770 parceiros de pacientes com hepatite C crônica, apenas 3 adquiriram o VHC nesse período ⁽¹⁰⁾. Apesar de conhecidas as rotas de transmissão do vírus, em muitos casos não se consegue identificar a via de infecção.

Na década de 1980, 2 a 10% das unidades de sangue transmitiam VHC em países desenvolvidos⁽¹¹⁾. A introdução de testes anti-VHC para doadores de sangue em meados de 1990 diminuiu drasticamente a transmissão do vírus por transfusão sanguínea nestes países⁽¹²⁾. A partir de então, a transfusão de sangue passou a ser mais segura, porém ainda hoje existem indivíduos com hepatite C que adquiriram o vírus antes de 1992, por meio de transfusão sanguínea e/ou hemoderivados⁽¹³⁾, e ainda não sabem da infecção.

GRUPOS DE RISCO

Atualmente usuários de drogas injetáveis, pessoas com tatuagens e *piercings*, alcoólatras, portadores de HIV, transplantados, hemodialisados, hemofílicos, presidiários e sexualmente promíscuos são considerados pertencentes ao grupo de risco de adquirir hepatite C⁽¹⁴⁾. Nos Estados Unidos, nos últimos anos, 15 a 27 mil pessoas se infectaram com o VHC pelo uso de drogas injetáveis⁽¹⁵⁾. Observou-se, ainda, que indivíduos usuários de drogas injetáveis adquirem hepatite C com maior rapidez que outras infecções virais⁽¹⁶⁾; e de acordo com Sutton *et al* (17), em um estudo realizado na Inglaterra e país de Gales, cerca de 50 a 90% dos usuários de drogas já entraram em contato com o VHC após cinco anos de uso.

O vírus pode ser detectado de 1 a 2 semanas após a exposição, pela presença de RNA viral no soro dos pacientes⁽¹⁸⁾. O período de incubação (desde a exposição até o aparecimento dos sintomas) é de aproximadamente 7 semanas, porém a maioria dos indivíduos com infecção aguda não apresentam sintomas^(18,19); por essa razão, a maioria das infecções são diagnosticadas ao acaso em decorrência da elevação de transaminases ou em estágio avançado da doença quando as complicações hepáticas já ocorrem.

HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO

Estima-se que 20 a 50% dos infectados possam resolver a infecção espontaneamente⁽¹⁹⁾. Pacientes com doença aguda sintomática e mulheres jovens, têm uma taxa maior de resolução espontânea da infecção que outros grupos, e tendem a eliminar o RNA viral em até 12 semanas após início dos sintomas⁽²⁰⁻²²⁾. Na grande maioria dos casos, porém, não há eliminação viral, e o vírus persiste progredindo para infecção crônica. A doença crônica pode ser evidenciada por alterações histopatológicas, as quais iniciam com uma inflamação no fígado, que frequentemente pode estar associada à fibrose, podendo evoluir para cirrose e em alguns casos hepatocarcinoma⁽²³⁾. É estimado que 20% dos doentes crônicos evoluam para cirrose, principalmente em 20 anos após infecção, e que, desses, 0 a 3 % irão desenvolver hepatocarcinoma⁽²⁴⁾.

Fatores como genótipo viral, idade, sexo, obesidade, alcoolismo e co-infecções podem influenciar o curso da hepatite C, porém esses fatores sozinhos não explicam a variabilidade da progressão da doença⁽²⁵⁾. A presença de indivíduos saudáveis que albergam o vírus indica que o VHC parece não ter efeito citopático direto nos hepatócitos infectados⁽²⁵⁾. Sendo assim, a progressão da doença resulta aparentemente da resposta imune do hospedeiro, na qual as células do sistema imune reconhecem e lisam os hepatócitos infectados, resultando no processo de fibrose⁽²⁶⁾.

A resposta imune do hospedeiro envolve uma complexa interação entre o sistema imune inato e adaptativo que determinam os resultados de infecção por organismos patogênicos⁽²⁷⁾. Nesse contexto, a diversidade genética dos genes envolvidos na resposta imune pode explicar, em parte, a variabilidade da resposta a infecções⁽²⁸⁾.

Entre as muitas famílias de genes de resposta imune, destacam-se os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade Humano (do inglês: Major Histocompatibility Complex) ou HLA (do inglês: Human Leucocyte Antigen)⁽²⁷⁾.

GENES HLA

Esses genes apresentam extensa variabilidade e codificam moléculas que possuem participação efetiva na resposta imune, promovendo a interação entre os epítomos de um dado patógeno e o repertório de células T do hospedeiro. Desta forma, dependendo da variante HLA do indivíduo, este pode responder de forma diferente ao mesmo antígeno⁽²⁷⁾.

Os genes HLA estão localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21.31) dentro da região MHC (do inglês: Major Histocompatibility Complex) e constituem os genes mais polimórficos do genoma humano (Figura 1). Os genes HLA são herdados seguindo as leis de Mendel e são expressos de forma co-dominante em cada indivíduo. Podem ser divididos em genes de classe I, classe II e classe III que codificam diferentes produtos importantes na apresentação de antígenos, dos quais os principais produtos são as moléculas HLA de classe I e classe II.

Os genes de classe I, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C* estão próximos do telômero do loco do HLA, enquanto os genes de classe II estão mais próximos do centrômero no loco do HLA. Existem alguns genes que são chamados de semelhantes à classe I, pois lembram os genes de classe I, porém possuem pouco ou nenhum polimorfismo. Um desses genes é o gene *HLA-G*, que parece ter participação no reconhecimento de antígenos pelas células *Natural Killer (NK)*⁽²⁷⁾.

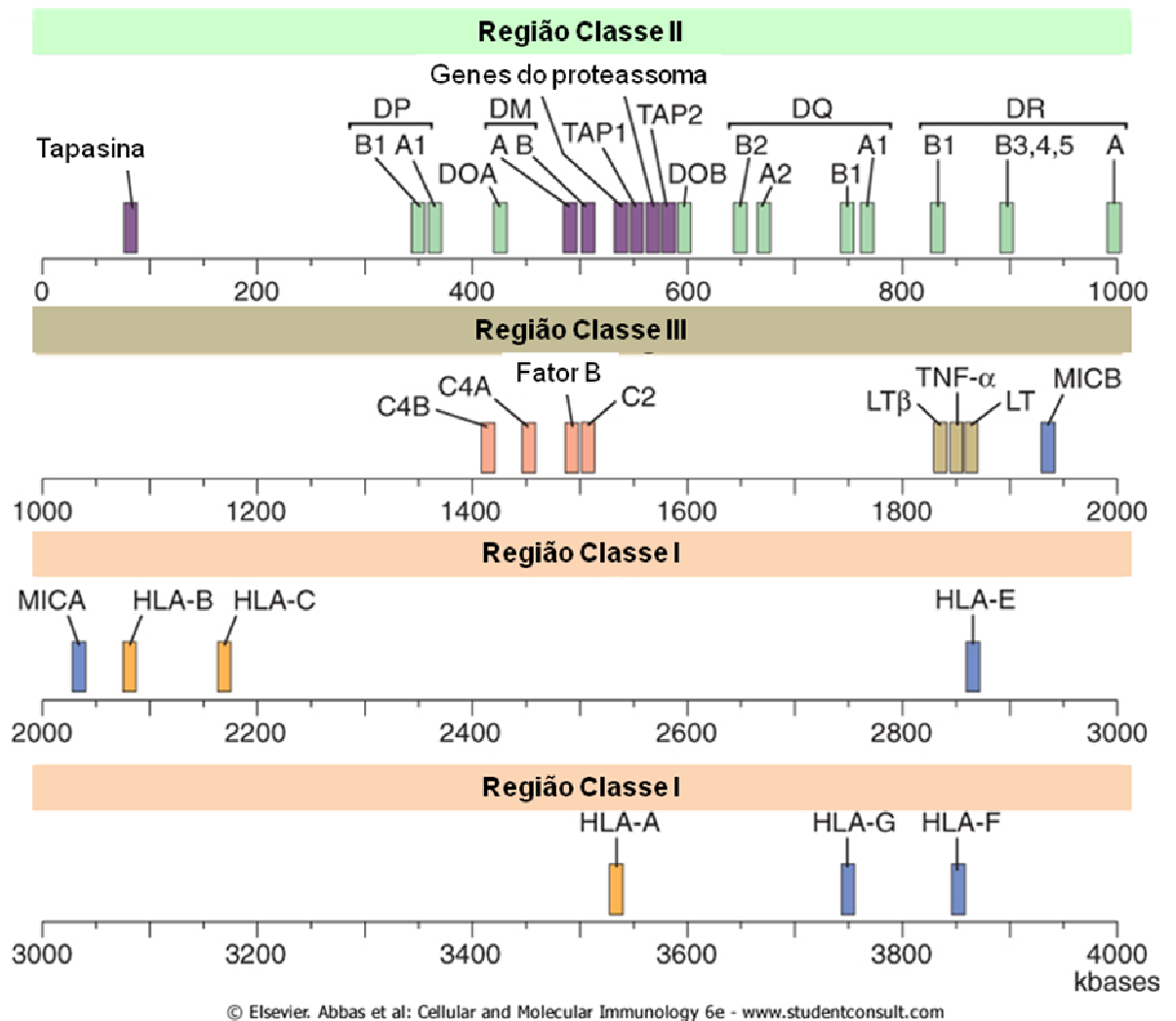


Figura 1: Estrutura do MHC em humanos FONTE: disponível em: www.studentconsult.com

MOLÉCULAS HLA CLASSE I E CLASSE II

Estruturalmente cada molécula HLA apresenta uma fenda (ou sulco) extracelular que se liga a peptídeos protéicos, seguido de um par de domínios tipo imunoglobulina, a qual é ancorada à membrana celular por regiões transmembranares e citoplasmáticas⁽²⁷⁾.

As moléculas HLA de classe I (HLA-A, -B e -C), possuem distribuição variada, sendo encontradas em todas as células nucleadas. São formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas de forma não-covalente; uma cadeia α composta por três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) codificada por genes do locus MHC e outra cadeia que não é codificada por genes do MHC chamada de $\beta 2$ -microglobulina. Os resíduos polimórficos das moléculas HLA de classe I são encontrados nos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, onde contribuem para as variações na ligação de peptídeos e no reconhecimento pelas células T dos diversos alelos de classe I. As moléculas

HLA de classe I apresentam peptídeos aos linfócitos citotóxicos CD8⁺ (CTLs) ⁽²⁷⁾. A estrutura de uma molécula do MHC de classe I está apresentada na figura 2.

Diferentemente das moléculas HLA de classe I, as moléculas HLA de classe II possuem distribuição restrita, sendo encontradas somente em alguns poucos tipos de células denominadas células apresentadoras de antígenos (APC), das quais as mais importantes são as células B, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais do timo. As moléculas HLA de classe II (HLA-DR, -DQ e -DP) são heterodímeros que possuem duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia α composta por dois domínios ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e uma cadeia β que também possui dois domínios ($\beta 1$ e $\beta 2$), sendo ambas codificadas pelos genes do MHC II. Nas moléculas HLA de classe II a maior parte do polimorfismo se encontra na cadeia β e elas apresentam peptídeos aos linfócitos TCD4⁽²⁷⁾. A estrutura de uma molécula HLA de classe II está apresentada na figura 3.

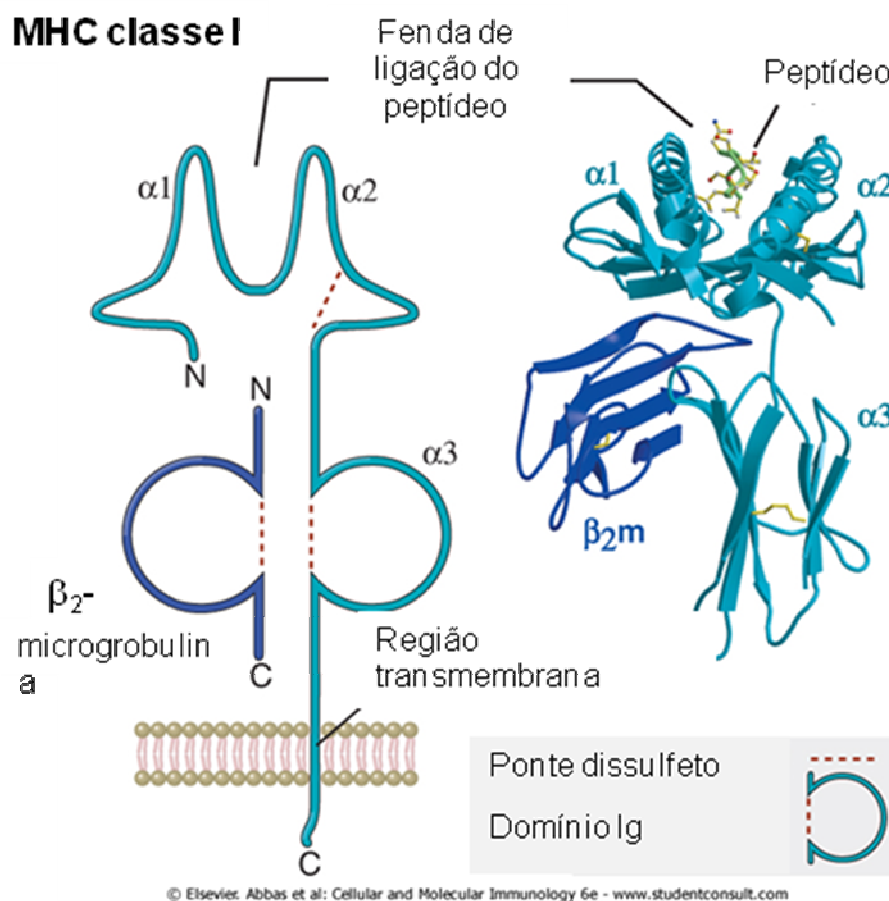


Figura 2: Estrutura de uma molécula HLA de classe I. O diagrama da esquerda ilustra as diversas regiões da molécula. Domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ da cadeia α , codificados por diferentes éxons. Cadeia polipeptídica β_2 -microglobulina não codificada pelo MHC, ligada não-covalentemente à cadeia α . O diagrama à direita mostra a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-B27 ligada a um peptídeo, exibido pela cristalografia de raios X. FONTE: disponível em: www.studentconsult.com

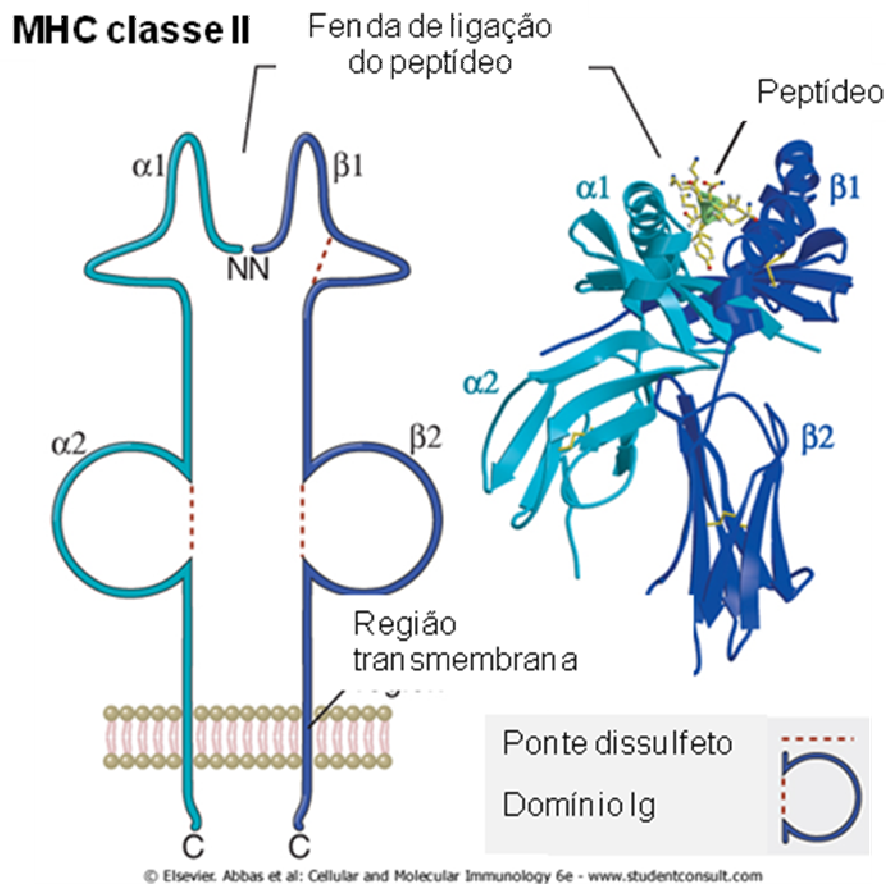


Figura 3. Estrutura de uma molécula HLA de classe II O diagrama a esquerda ilustra as diversas regiões da molécula. Domínios α_1 e α_2 da cadeia α e β_1 e β_2 da cadeia β . As duas cadeias são formadas por genes do MHC. O diagrama a direita exibe a estrutura da porção extracelular da molécula HLA-DR1 com um peptídeo ligado a ela, conforme demonstrado pela cristalografia de raios X. FONTE: disponível em: www.studentconsult.com

HLA E HEPATITE C

Muitos estudos têm relacionado variantes HLA com a eliminação viral espontânea ou com a persistência da infecção pelo VHC. Thio *et al* (29), em um estudo realizado com 444 pacientes com infecção persistente e 231 com infecção resolvida, nos Estados Unidos, em 2002, relataram associações entre HLA-A*11:01, -B*57 e -C*01:02 e eliminação viral espontânea (OR=0,49, 95%IC=0,27-0,89; OR=0,62, 95%IC=0,39-1,00 e OR=0,43, 95%IC=0,21-0,89), respectivamente, e também associação dos alelos HLA-A*23:01 e -C*04 com persistência do vírus (OR=1,78, 95%IC=1,01-3,11 e OR=1,78, 1,21-2,59), respectivamente.

Quanto aos alelos HLA de classe II, DRB1*11:01 e DQB1* 03:01 parecem estar envolvidos na eliminação viral espontânea do VHC em diferentes populações⁽³⁰⁻³²⁾. Por outro

lado, McKiernan *et al* (33), em um estudo realizado com pacientes irlandeses, encontraram maior frequência dos alelos DRB1*01:01 e DQB1*05:01 em indivíduos com eliminação viral sustentada quando comparado com pacientes cronicamente infectados ($P=0,002$). Também relatou os alelos DRB1*03:01:1 e DQB1*02:01 mais frequentes em indivíduos com infecção crônica ($P=0,001$).

Em um estudo realizado na Europa, Thursz *et al* (34), encontraram associação de DRB1*11:01 e DQB1*03:01 com eliminação viral espontânea ($P=0,013$, OR=2,14, 95%IC=1,11-4,12 e $P=0,004$, OR=2,22, 95%IC=1,24-3,96), respectivamente, e DRB1*07:01 e DRB4*01:01 com infecção persistente ($P=0,027$, OR=2,04, 95%IC=1,03-4,17 e $P=0,002$, OR=2,38, 95%IC=1,29-4,35), respectivamente.

No Brasil, um estudo realizado na região de São Paulo com 104 indivíduos infectados, encontrou associação de DRB1*01 e DQB1*03 com eliminação viral espontânea ($P=0,003$, OR=4,59, 95%IC=1,70-12,41 e $P=0,029$, OR=2,83, 95%IC=1,14-7,02), respectivamente ⁽³⁵⁾.

Além dos genes HLA, outros marcadores genéticos podem estar envolvidos na patogênese da hepatite C.

CÉLULA NATURAL KILLER

A principal célula efetora contra infecções virais é o linfócito T citolítico (CD8+), porém muitos vírus desenvolvem variados mecanismos para evadir ao sistema imune ⁽²⁸⁾. Um destes mecanismos é diminuir a expressão de moléculas HLA de classe I na célula infectada. Os linfócitos TCD8+ necessitam da apresentação de fragmentos antigênicos por moléculas HLA de classe I para reconhecer, tornar-se ativados e lisar a célula infectada.

Sendo assim, a diminuição na expressão de HLA classe I em células infectadas por vírus pode levar, por um lado, a uma resistência à citólise por linfócitos TCD8+, mas por outro lado, a uma susceptibilidade à destruição espontânea por células *natural killer* (NK), um conceito conhecido como hipótese do “missing-self”. As células NK são capazes de perceber a diminuição da expressão de moléculas HLA de classe I ou a ausência de expressão dessas moléculas, desencadeando citotoxicidade contra as células que estiverem alteradas. Assim, as células NK passam a ser componentes especialmente importantes na resposta imune inata contra infecções virais ⁽³⁶⁻³⁸⁾.

As células *natural killer* são uma linhagem de células relacionadas com linfócitos, que constituem cerca de 5 a 20% das células mononucleares no sangue e no baço. Podem ser rapidamente recrutadas para tecidos ou órgãos por fatores quimiotáticos produzidos por células alteradas e são capazes de destruir as células-alvo via citólise direta e citotoxicidade

celular dependente de anticorpos. Essas células também são responsáveis pela secreção de interferon-gama (INF- γ), o qual ativa macrófagos e células dendríticas (CDs) e direcionam a resposta imune adaptativa mediada por LyTh1⁽³⁹⁾.

RECEPTORES KIR

A função das células NK é finamente regulada por meio do balanço de diferentes receptores presentes em sua superfície, dos quais se destacam os receptores conhecidos como KIR (do inglês: killer cell immunoglobulin-like receptors: receptores semelhantes à imunoglobulina das células *natural killer*)⁽⁴⁰⁾. Esses receptores são membros da superfamília das imunoglobulinas (Ig) e foram identificados pela primeira vez em 1990, por Moretta *et al* (41).

Os receptores KIR podem ser inibidores, ou seja, inibem a citotoxicidade da célula NK, ou podem ser ativadores. Estruturalmente são formados por dois ou três domínios extracelulares (D0, D1 e/ou D2), uma região transmembranar e uma cauda citoplasmática que pode ser longa ou curta. Os receptores KIR que possuem cauda citoplasmática longa tem função inibidora das células NK pela presença nos domínios citoplasmáticos de um ou dois motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM: do inglês: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs), os quais liberam sinais inibidores. Já os receptores KIR com cauda citoplasmática curta não apresentam ITIMs; porém, possuem um resíduo de aminoácido no domínio transmembranar que permite associação do receptor KIR com a molécula DAP-12, a qual libera sinais ativadores através de motivos de ativação baseados em tirosina (ITAM: do inglês: Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs). Uma exceção é o receptor KIR2DL4, pois o mesmo tem uma cauda longa com a presença de um ITIM e possui um resíduo de aminoácido na região transmembranar. As características estruturais dos receptores KIR são apresentadas na figura 4⁽⁴²⁾.

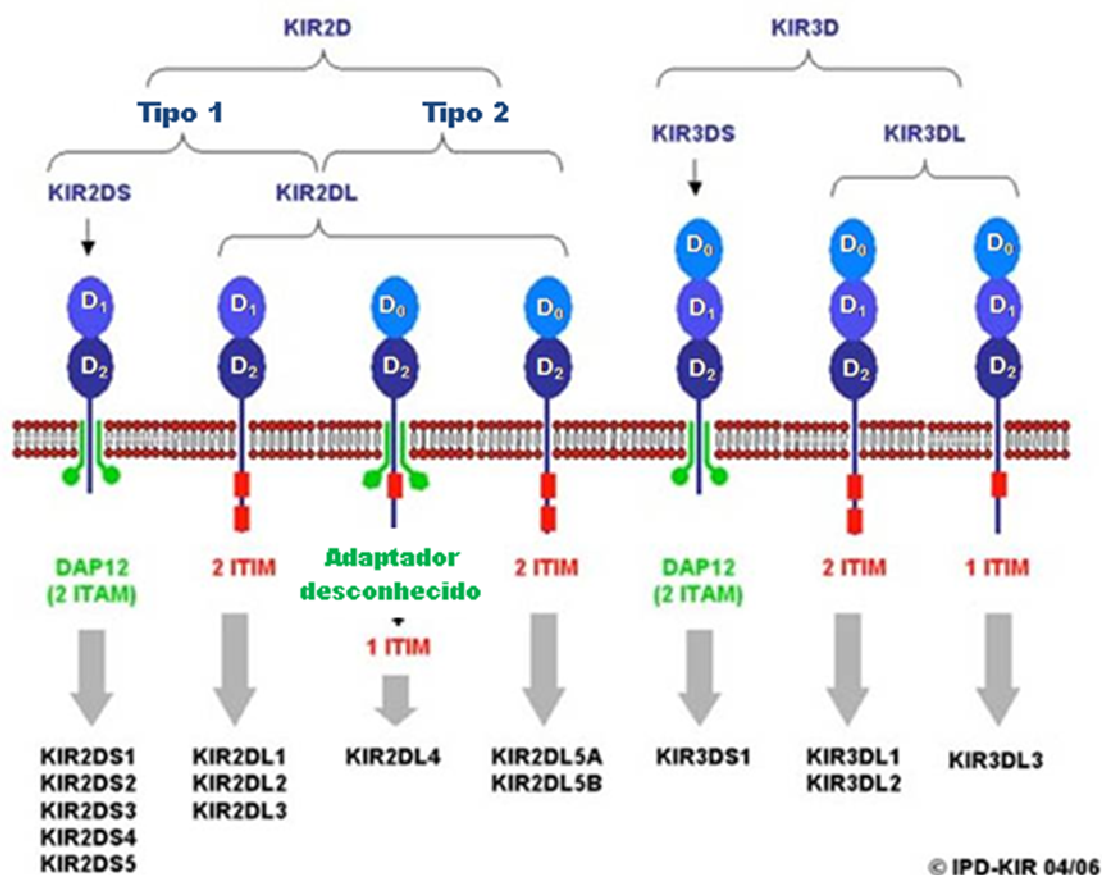


Figura 4. Estrutura dos receptores KIR. Características estruturais das proteínas KIR com dois (KIR2D) ou três (KIR3D) domínios extracelulares semelhantes à Ig. A associação dos receptores KIR ativadores com as proteínas adaptadoras é mostrado em verde, enquanto os motivos de inibição baseados em tirosina (ITIM) dos receptores inibidores são mostrados em vermelho. A letra D seguida dos números 0, 1 e 2 indicam os domínios extracelulares semelhantes à Ig. Os receptores do tipo 1 apresentam os domínios extracelulares D1 e D2 e os receptores do tipo 2 apresentam os domínios extracelulares D0 e D2. FONTE: Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> Acesso em: outubro de 2009

GENES *KIR*

Em humanos, os genes que codificam esses receptores estão presentes no cromossomo 19q13.4, dentro do Complexo de Receptores Leucocitários (LRC: do inglês: Leukocyte Receptor Complex), ocupando um espaço de aproximadamente 150Kb (Figura 5). Até o momento foram bem caracterizados 15 genes *KIR* (*2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5A*, *2DL5B*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*, *2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5* e *3DS1*) e 2 pseudogenes (*2DP1* e *3DP1*)⁽⁴²⁾.

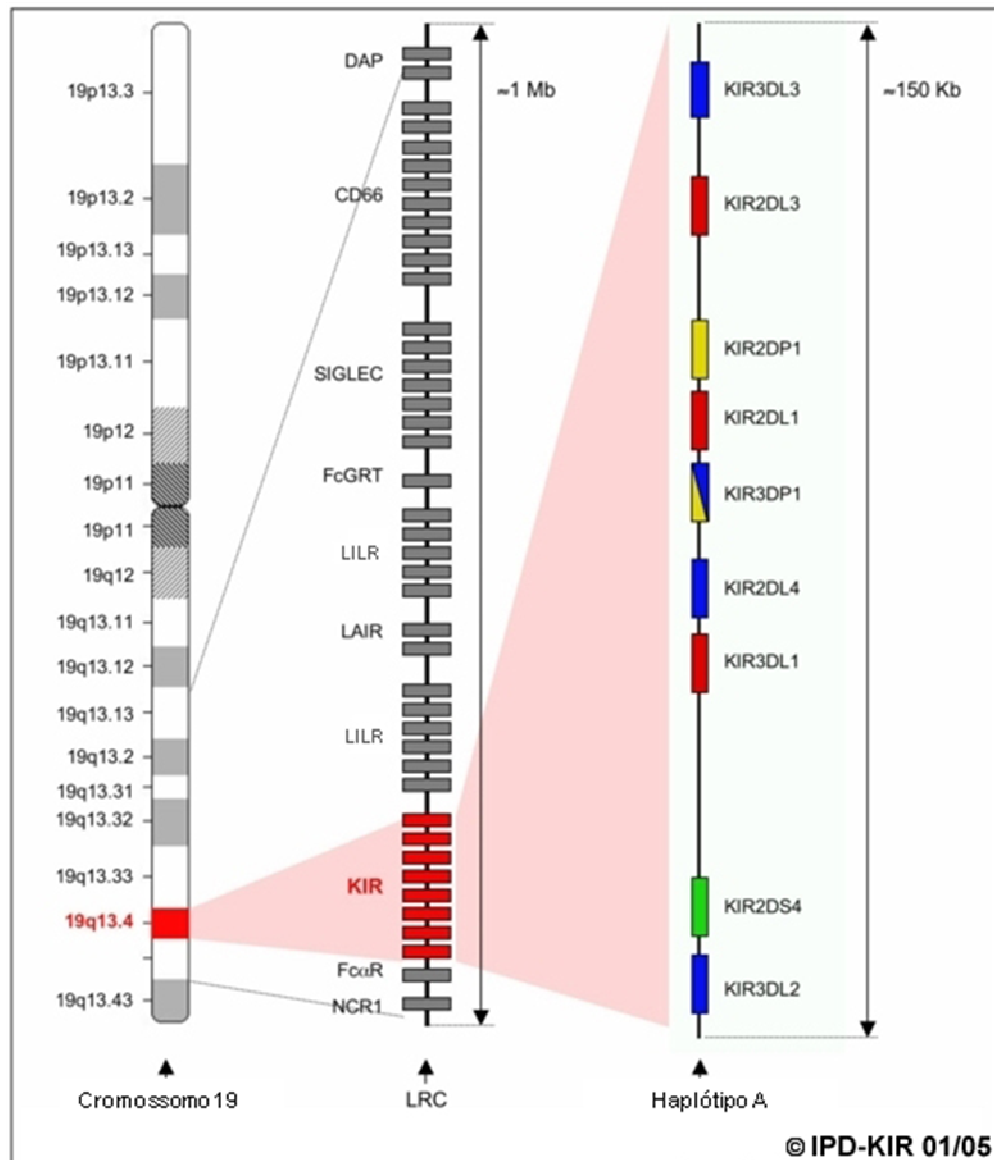


Figura 5. Localização cromossômica dos genes *KIR*. Localização cromossômica do LRC (complexo de receptores leucocitários) destacando os genes *KIR* que se situam no cromossomo 19 (19q13.4). Dentro do LRC encontram-se várias famílias de genes, dentre elas estão os LILRs (leukocyte Ig-like receptors); os ILTs (Ig-like transcripts); os KIRs (killer cell immunoglobulin-like receptors); os GPVI (platelet collagen receptor glycoprotein VI); os receptores IgAFc, FCAR e NKp46; além dos LAIRs (leukocyte-associated Ig-like receptors) e genes das proteínas adaptadoras transmembrânicas DAP. Fonte: disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/index.html> acesso em outubro 2009

ORGANIZAÇÃO DOS GENES *KIR* E VARIABILIDADE HAPLOTÍPICA

Os genes *KIR* são organizados em nove *exons*. Os dois primeiros *exons* codificam as seqüências sinais ou líderes. Os *exons* três, quatro e cinco codificam os domínios semelhantes a imunoglobulinas D0, D1 e D2, respectivamente. O *exon* seis codifica a região de inserção da

molécula na membrana plasmática, e o *exon* sete codifica a região transmembranar. Por último, os *exons* oito e nove codificam os domínios citoplasmáticos^(42,43). Os genes *KIR* com domínios extracelulares podem ser divididos em dois tipos: tipo 1 e tipo 2. Os genes *KIR* do tipo 1 têm uma organização genômica idêntica àquela que codifica moléculas *KIR* com três domínios semelhantes às imunoglobulinas. No entanto, nesses genes, o *exon* três é um *pseudoexon*, que não codifica o domínio D0, sendo codificados apenas os domínios D1 e D2. Exemplos desta classe são os genes *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3* e todos os genes *KIR2DS*. Os genes *KIR* do tipo dois têm completa ausência do *exon* quatro; como consequência, os receptores desta classe não possuem o domínio D1, apresentando somente os domínios D0 e D2. Os genes que pertencem a esta classe são os genes *KIR2DL4*, *KIR2DL5A* e *KIR2DL5B*. O *exon* três também é um *pseudoexon* no *KIR2DP1*, que também contém um *pseudoexon* quatro. *KIR2DP1* é um pseudogene juntamente com *KIR3DP1*. A organização dos genes *KIR* está apresentada na figura 6⁽⁴²⁾.

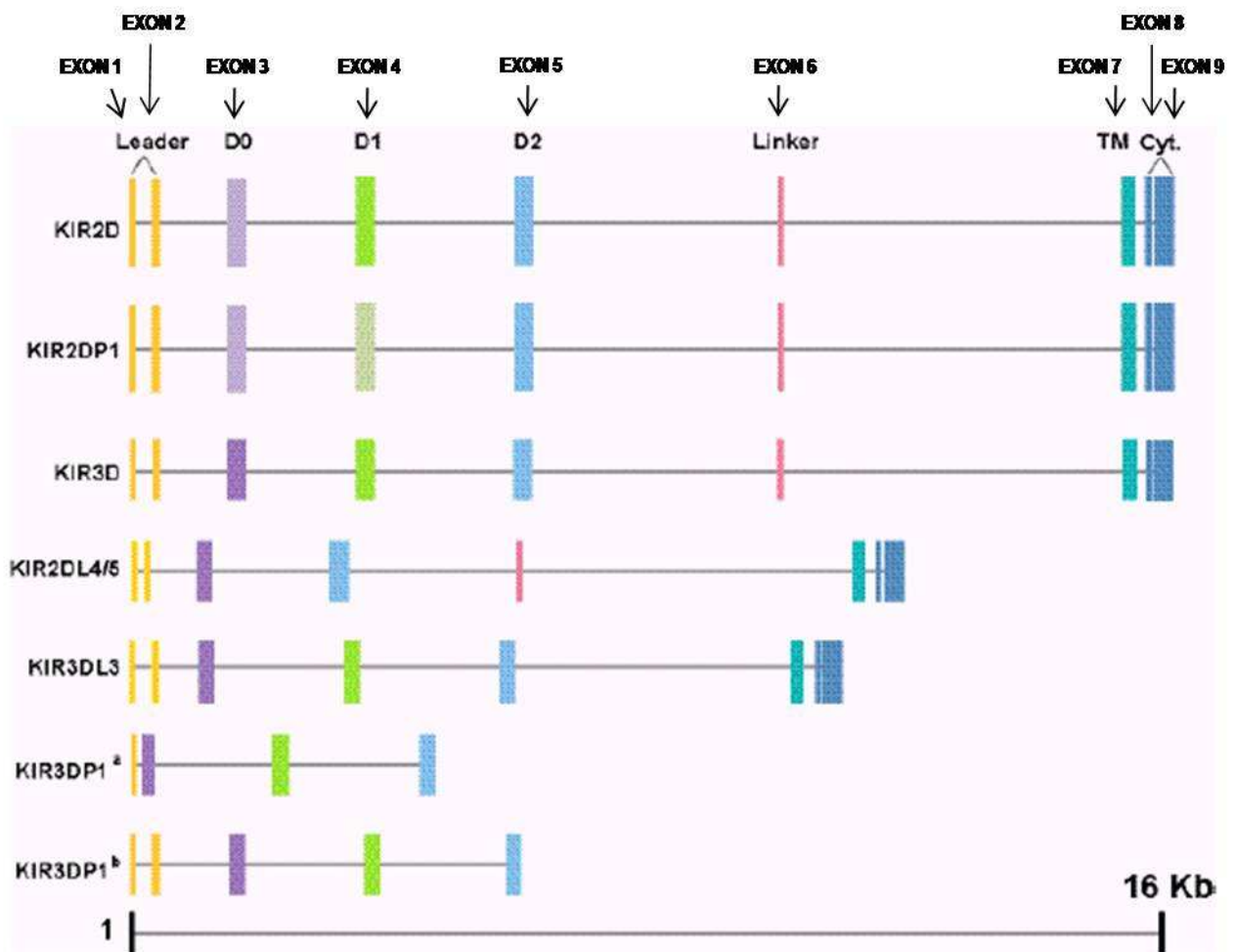


Figura 6. Organização exon-intron dos genes KIR. Exon 1 e 2 (em amarelo) codificam a sequência sinal ou líder; exon 3 (em roxo) codifica o domínio extracelular D0, exon 4 (em verde-claro) codifica o domínio D1, exon 5 (em azul-claro) codifica o domínio D2; exon 6 (em rosa) codifica a sequência de união; exon 7 (em azul-turquesa) codifica a região transmembrana; e exons 8 e 9 (em azul-escuro) que codificam a cauda citoplasmática. Os genes *KIR* do tipo 1 (*KIR2DL1*, *2DL2/3* e todos os *2DS*), tem uma organização genômica semelhante, porém, o exon 3 nesses genes é um pseudoexon (lilás). O exon 3 também é um pseudoexon no *KIR2DP1*, que também contém um pseudoexon 4 (verde mais claro). Os genes *KIR* do tipo 2 que incluem *2DL4*, *2DL5A* e *2DL5B* são caracterizados pela completa ausência do exon 4. Adaptado de Carrington e Norman, 2003)

Estudos populacionais realizados nos últimos anos revelaram uma ampla diversidade nos locos dos genes *KIR* e relacionaram esse polimorfismo à susceptibilidade a diversas doenças e neoplasias. O repertório dos genes *KIR* varia de um indivíduo para outro, fazendo com que existam inúmeros haplótipos *KIR*, os quais diferem tanto em número quanto em conteúdo gênico⁽⁴⁴⁾. Alguns genes *KIR* estão presentes na maioria dos indivíduos, também conhecidos como “genes de moldura do haplótipo” (do inglês: framework) e são os genes

KIR2DL4, *3DL2*, *3DL3* e *3DP1*; os outros genes exibem flexibilidade de presença e ausência em diferentes populações.

Baseado no conteúdo gênico, os haplótipos podem ser divididos em 2 conjuntos primários, denominados A e B, os quais foram diferenciados por *Southern Blot* em estudos de Uhrberg *et al* (45). O haplótipo A é muito frequente em diversas populações, possui 7 genes (*KIR2DL1*, *2DL3*, *2DL4*, *2DS4*, *3DL1*, *3DL2* e *3DL3*), 2 pseudogenes (*KIR2DP1* e *3DP1*) e apresenta uma característica importante: a presença de apenas um gene ativador (*KIR2DS4*)⁽⁴²⁾. Esse gene, frequentemente, exibe uma deleção de 22 pares de bases no exon 5, na porção que determina a inserção da molécula na membrana celular, que, consequentemente, faz com que o receptor não consiga ser ancorado na superfície da célula e seja secretado na forma solúvel. Sendo assim, indivíduos homozigotos para o haplótipo A e para a deleção no gene *KIR2DS4* não possuem nenhum gene *KIR* ativador^(46,47). O Haplótipo B apresenta número variado de genes e de combinações, podendo ter até seis genes ativadores. Já foram identificados mais de 40 diferentes haplótipos B por análise de segregação^(46,48). A figura 7 representa o haplótipo A e dois haplótipos B.

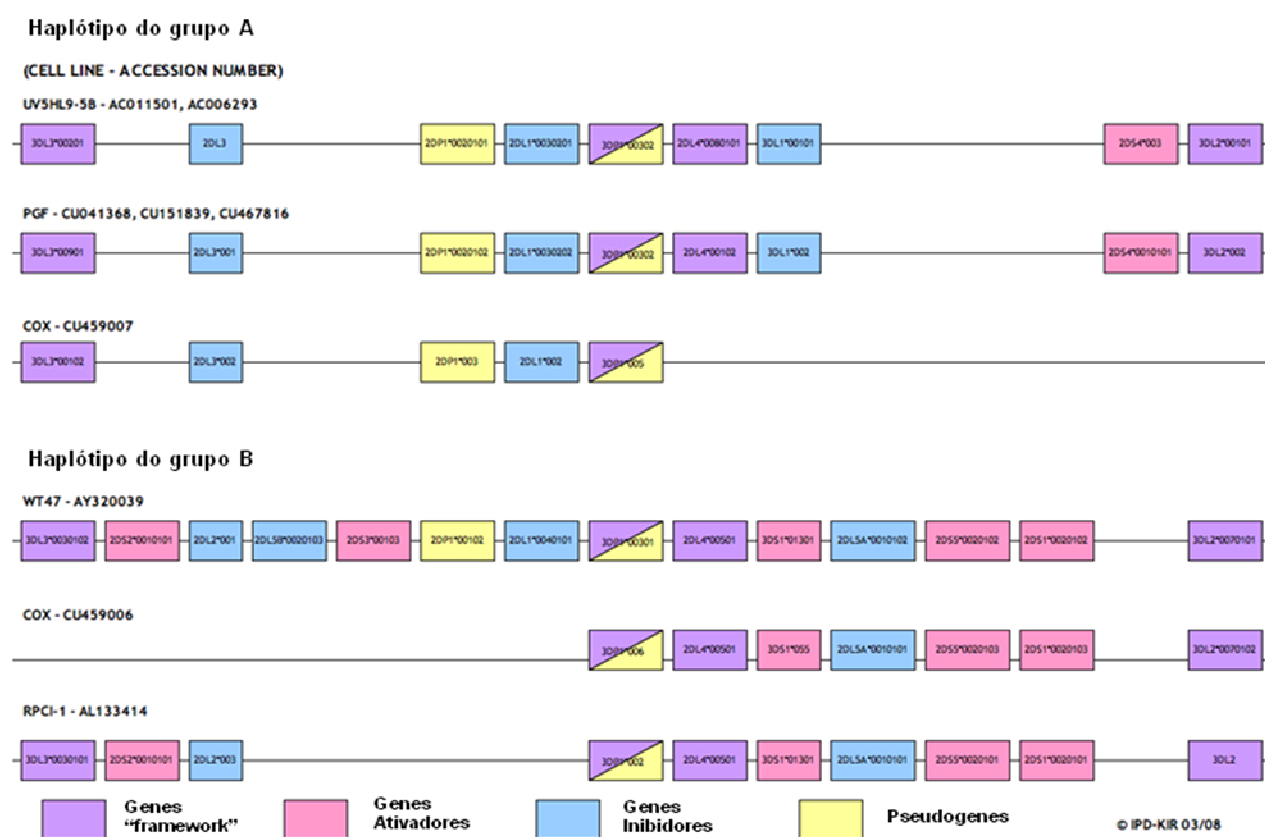


Figura 7. Organização do haplótipo A e dois haplótipos B. FONTE: disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html> Acesso em outubro 2009

LIGANTES DE KIR

Os ligantes dos receptores KIR são as moléculas HLA de classe I. Os receptores inibidores KIR2DL1, 2DL2 e 2DL3 reconhecem alguns ligantes HLA-C, os quais podem ser divididos em dois grupos baseado em dimorfismos na posição 77 e 80 da alfa hélice da molécula: grupo 1 (HLA-C1) possui o aminoácido serina na posição 77 e asparagina na posição 80 (Ser77/Asn80) e o grupo 2 (HLA-C2) que possui uma asparagina na posição 77 e uma lisina na posição 80 (Asn77/Lys80) ⁽⁴⁹⁾. KIR2DL1 se liga as moléculas HLA-C2 enquanto KIR2DL2/2DL3 se ligam as moléculas HLA-C1. As moléculas HLA-B podem ser divididas em Bw4 e Bw6 de acordo com a expressão de um ou dois epítomos sorológicos mutuamente exclusivos, que são especificados por 5 variações de aminoácidos nas posições 77, 80, 81, 82 e 83 (Tabela 1, atualizada em <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Bw6 é encontrado exclusivamente em moléculas HLA-B, enquanto Bw4 está presente também em moléculas HLA-A.⁽⁵⁰⁾ Alguns estudos demonstraram que o receptor KIR3DL1 se liga apenas a moléculas HLA-B com especificidade Bw4, com diferentes graus afinidade.⁽⁵¹⁾ Recentemente foi descoberto que os alelos HLA-A*23:01, A*24:02 e A*32:01 que possuem especificidade Bw4, também parecem ser ligantes do receptor KIR3DL1⁽⁵²⁾. KIR2DL4 se liga especificamente a molécula HLA-G, uma molécula HLA não clássica que é primariamente expressa no trofoblasto fetal, células endoteliais tímicas e na córnea ⁽⁵³⁾. Já o receptor KIR3DL2 se liga especificamente às moléculas HLA-A3 e A11⁽⁵⁴⁾. Os receptores ativadores KIR2DS1, 2DS2 e 3DS1 possuem grande similaridade em seus domínios extracelulares com os receptores inibidores KIR2DL1, KIR2DL2/3 e KIR3DL1, respectivamente e, portanto parecem se ligar aos mesmos ligantes HLA dos seus correspondentes inibidores. KIR2DS4 se liga especificamente a alelos HLA-C*04⁽⁵⁵⁾ (Tabela 1). Ligantes para os receptores KIR2DL5, 2DS5, 2DS3 e 3DL3 ainda não foram identificados.

Tabela 1 Epítomos de Bw4 e seus alelos correspondentes

Epítopo sorológico	Classe I	Posição do aminoácido					Alelos correspondentes
		77	80	81	82	83	
Bw4	HLA-B, HLA-A	Asn	Ile	Ala	Leu	Arg	B*07:36, B*07:38, B*07:81, B*08:31, B*15:13, B*15:16, B*15:17, B*15:23, B*15:24, B*15:67, B*15:95, B*B*27:02, B*27:30, B*27:57, B*38:01, B*38:05, B*38:06, B*38:07, B*38:09, B*38:10, B*38:12, B*38:13, B*38:14, B*38:16, B*38:19, B*38:20, B*40:13, B*40:19, B*44:06, B*44:18, B*44:25, B*44:50, B*49:01, B*49:03, B*49:04, B*49:05, B*49:06, B*49:07, B*51, B*52:01, B*52:03, B*52:04, B*52:05, B*52:06, B*52:07, B*52:08, B*52:10, B*52:11, B*52:12, B*52:13, B*52:14, B*52:15, B*52:16, B*53:01, B*53:02, B*53:04, B*53:06, B*53:07, B*53:08, B*53:10, B*53:14, B*53:15, B*53:17, B*53:18, B*53:19, B*54:12, B*56:21, B*57, B*58, B*59:01, B*59:02, B*59:03, B*59:04, B*59:05, A*02:87, A*92:29, A*92:36, A*23, A*24 (com exceção de A*24:04, A*24:19, A*24:28, A*24:44, A*24:89), A*31:07, A*31:08, A*31:10, A*32:03.
	HLA-B	Asn	Thr	Ala	Leu	Arg	B*08:02, B*13, B*15:36, B*15:89, B*18:09, B*27:01, B*37:10, B*38:02, B*38:03, B*38:04, B*38:08, B*38:15, B*40:47, B*40:96, B*44 (com exceção de B*44:09, B*44:46, B*44:50, B*44:75), B*47:04, B*49:02, B*51:54, B*51:58, B*53:09, B*53:11, B*53:13, B*56:07.
	HLA-B, HLA-A	Ser	Ile	Ala	Leu	Arg	B*15:87, B*48:18, B*52:09, B*53:05, B*53:16, A*32 (Exceto A*32:03).
	HLA-B	Asp	Thr	Leu	Leu	Arg	B*07:27, B*15:43, B*27 (com exceção de B*27:01, B*27:02, B*27:04, B*27:30, B*27:31, B*27:53, B*27:57) B*37 (com exceção de B*37:10), B*38:17, B*53:03

Tabela 2 Receptores KIR e seus ligantes.

Ligantes	Alelos ou grupo de alelos	Receptores KIR
HLA-C do grupo 2	HLA-C2; C*03:07; C*03:15; Cw4; Cw5; Cw6; C*07:07, C*07:09; C*12:05; C*12:04:1/2; C*15 (exceto C*15:07); C*16:02; C*17 e C*18.	2DL1, 2DS1
HLA-C do grupo 1	HLA-C1; C*03 (exceto C*03:07, 03:10, 03:15); C*07 (exceto C*07:07, 07:09); C*08; C*12 (exceto C*12:05, 12:04:1/2); C*13; C*14 (exceto C*14:04); C*15:07 e C*16 (exceto C*16:02).	2DL2, 2DL3 e 2DS2
HLA- Bw4	HLA-B13, B17, B27, B37, B38, B44, B47, B49, B51, B52, B53, B57, B58, B59, B63, B77, B*15:13, B*15:16, B*15:17, B*15:23, B*15:24, HLA-A*23:01, A*24:02, A*32:01	3DL1 e 3DS1
HLA A3 e A11	HLA-A3 e A11	3DL2
HLA-G	HLA-G	2DL4
HLA-C*04	HLA-C*04	2DS4

KIR E HEPATITE C

Poucos estudos dos genes *KIR* em associação com hepatite C vêm sendo desenvolvidos, porém com resultados interessantes. Khakoo *et al* (56) sugerem que uma fraca interação entre receptores inibitórios das células NK e seus ligantes podem ter efeito protetor contra a infecção pelo VHC em indivíduos inoculados com baixas doses de VHC.

Em outro estudo, Romero *et al* (57) avaliaram 39 pacientes com clareamento viral espontâneo e 121 pacientes com infecção crônica e encontraram uma associação entre *KIR2DL3/2DL3* e seu ligante C1/C1 e eliminação viral espontânea ($P=0,03$, $OR=3,05$). Estes autores também encontraram uma associação de *KIR2DL3* com o alelo HLA de classe II DRB1*12:01 ($P=0,0001$, $OR=22$), sugerindo que os genes *KIR* e a apresentação de peptídeos a linfócitos T via HLA de classe II estão ambos envolvidos na resolução da infecção por VHC.

Paladino *et al* (58) encontraram uma diminuição na frequência dos genes *KIR2DL2* ($P=0,04$) e *2DS2* ($P=0,014$) e um aumento de *2DS5* ($P=0,04$) em pacientes que resolveram a infecção; e nos pacientes com presença do RNA viral e altos níveis de transaminases hepáticas encontraram aumento da frequência de *KIR2DS3*. No entanto, o

número de amostras utilizadas nesse estudo foi pequeno, dificultando a confirmação dos resultados encontrados.

Os estudos relacionando os alelos HLA e os genes *KIR* com a hepatite C, em sua maioria, avaliam apenas a susceptibilidade à infecção pelo VHC e/ou eliminação viral espontânea, comparando pacientes infectados e controles saudáveis. Contudo, poucos estudos avaliam a influência dos alelos HLA e dos genes *KIR* no desenvolvimento de dano hepático e/ou severidade da hepatite C em portadores crônicos da doença.

Tendo em vista a diversidade na resposta à infecção pelo VHC que faz com que muitos pacientes evoluam de forma benigna por décadas, enquanto outros rapidamente progridem para dano hepático severo, estudos que avaliem os fatores genéticos envolvidos na progressão da doença tornam-se importantes. Além disso, a população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo e, portanto, constitui um grupo especial para o estudo dos genes HLA e *KIR* e a infecção pelo VHC, visto que estudos de diferentes regiões e de indivíduos com diferentes descendências podem prover informações importantes na patogênese e no curso clínico da doença.

TRATAMENTO DA HEPATITE C

Os interferons (IFNs) são glicoproteínas naturais produzidas por células da maioria dos vertebrados em resposta a agentes estranhos. Os IFNs podem estimular a função efetora das células NK, dos linfócitos T citolíticos e dos macrófagos, são capazes de regular a expressão de moléculas HLA de classe I e classe II, induzir síntese de imunoglobulinas por células B e estimular a proliferação de células T de memória. Oferecem assim, várias maneiras de controlar a replicação viral por modularem a resposta imune inata e adaptativa.⁽⁵⁹⁾ Os IFNs são classificados em três tipos: tipo I, os quais formam a superfamília das citocinas da resposta imune inata, na qual o principal representante é o IFN alfa; o tipo II, que inclui somente o IFN-gama; e uma nova classe de IFNs humanos, os quais foram identificados recentemente ((IFN- λ 1 ou IL-29, IFN- λ 2 (IL-28A) e IFN- λ 3 (IL-28B)) que foram classificados como IFNs do tipo III⁽⁵⁹⁾.

O interferon exógeno utilizado no tratamento da hepatite C é o IFN alfa. Atualmente dispõem-se duas formas de apresentação do IFN alfa. Uma chamada de Interferon alfa Convencional, e outra chamada de Interferon Peguilado⁽⁶⁰⁾.

A conjugação do reagente PEG (bis-monometoxipolietilenoglicol) com o IFN alfa (interferon peguilado) confere muitas propriedades à molécula, resultando numa redução dos efeitos adversos relacionados com o excesso de concentração máxima,

redução do risco de fracasso terapêutico pela manutenção da concentração sérica, e o conforto de 1 aplicação semanal⁽⁶¹⁾

A Ribavirina é um análogo de nucleosídeo que possui grande espectro de ação antiviral contra DNA e RNA vírus e sua ação parece estar relacionada a um mecanismo imunomodulador que estimula a produção de citocinas da resposta Th1 (IL-2 e IFN-gama) enquanto suprime a produção de citocinas da resposta Th2. A combinação de IFN mais ribavirina aumenta a eficácia do tratamento⁽⁵⁹⁾. No Brasil, o programa Nacional para Prevenção e Controle das Hepatites Virais, disponibiliza o medicamento interferon injetável e a Ribavirina oral de forma gratuita, segundo critérios próprios de diagnóstico e tratamento⁽⁶⁰⁾.

O sucesso no tratamento da hepatite C é caracterizado pela presença de “resposta virológica sustentada” (RVS), que ocorre quando o RNA viral se torna indetectável no soro do paciente 6 meses após do término do tratamento^(25,60). No entanto, a resposta ao tratamento difere nos pacientes infectados por diferentes genótipos do vírus. De modo geral, indivíduos infectados com o genótipo 1 do vírus tem taxas menores de RVS em comparação com genótipos 2 e 3⁽⁶²⁾.

Como já discutido, o escape viral da resposta imunológica e a cronificação da doença dificultam a erradicação do vírus, fazendo com que muitos pacientes não consigam adquirir sucesso no tratamento. Fatores como idade acima de 40 anos na época da infecção, sexo masculino, co-infecção com vírus da hepatite B (VHB) e com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e alcoolismo parecem influenciar negativamente a doença e a resposta ao tratamento.⁽⁶³⁾ No entanto, Foster *et al* (64) sugere que os fatores relacionados ao hospedeiro têm papel principal em determinar os resultados da resposta ao tratamento em pacientes que são tratados pela primeira vez. Nesse sentido, estudos avaliando as variantes HLA vêm sendo realizados como possíveis fatores de influência na resposta ao tratamento da hepatite C.

HLA E A RESPOSTA AO TRATAMENTO

Um estudo realizado no Japão avaliou 172 pacientes com hepatite C com diferentes genótipos virais e que fizeram uso de interferon isolado por seis meses, encontrando associação com HLA B55, B62, Cw03 e Cw04 com melhor resposta ao tratamento⁽⁶⁵⁾. Outro estudo na Croácia, nas mesmas condições, avaliou 112 pacientes

(55 respondedores e 57 não- respondedores) e identificou o C*07 como preditor de boa resposta ao IFN ($P=0,011$)⁽⁶⁶⁾. Jiao e Wang (67) estudaram 113 pacientes chineses e observaram que DRB1*07 foi encontrado em maior frequência naqueles que apresentavam boa resposta ao tratamento com interferon mais ribavirina e eram infectados com o genótipo 2 do vírus. Por outro lado, DRB1*04 foi encontrado com maior frequência naqueles pacientes infectados com o genótipo 1 cuja resposta ao tratamento era insatisfatória.

Até o momento não foram realizados estudos de associação dos genes *KIR* com resposta ao tratamento da hepatite C.

Apesar desses estudos relacionarem os genes HLA e a resposta ao tratamento do VHC, muitos deles possuem variações na metodologia que dificultam uma consistente associação desses genes à hepatite C: mistura de pacientes com diferentes genótipos virais, e diferentes protocolos de tratamento, tanto em relação ao tempo quanto à combinação da droga utilizada. Estudos que avaliem o papel da genética do hospedeiro na resposta ao tratamento são úteis, pois se forem encontrados genes ou alelos que influenciem a resposta, estes podem auxiliar na avaliação clínica, bem como individualizar o tratamento a partir da constituição genética do paciente.

JUSTIFICATIVA

A diversidade genética dos genes da resposta imune como o *KIR* e os loci HLA podem explicar, em parte, a variabilidade nas respostas a infecções virais em indivíduos infectados. A caracterização genética dos genes *KIR* e dos alelos HLA de uma população com hepatite C crônica bem caracterizada, com diferentes graus de fibrose, pode permitir a análise de quais genes ou alelos podem estar envolvidos no desenvolvimento de dano hepático e quais podem prevenir esses danos.

Além disso, uma segunda análise em uma população infectada pelo VHC e fazendo tratamento com peginterferon e ribavirina permite avaliar quais destes genes podem estar envolvidos na resposta ou não resposta ao tratamento. Pouco se sabe quanto aos fatores que contribuem para que indivíduos que fazem tratamento para

hepatite C consigam ou não adquirir resposta virológica sustentada. Outrossim, estudos realizados em populações brasileiras são escassos.

Nesse contexto, este estudo justifica-se pelo fato de que se encontradas associações desses genes com desenvolvimento de dano hepático e melhor ou pior resposta ao tratamento, esses dados possam ser utilizados na clínica, ajudando na melhor escolha da medicação para o tratamento, e auxiliando no prognóstico dos pacientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar uma possível associação entre os genes *KIR* e HLA com a progressão da hepatite C e com a resposta ao tratamento para erradicação do VHC.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Identificar os genes *KIR* (*KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* e *KIR3DP1*) e alelos dos locos HLA de classe I (HLA-A*, B*, C*) e classe II (DRB1*, DQA1* e DQB1*) em uma população de indivíduos com hepatite C crônica da região de Botucatu, São Paulo, usando a técnica de PCR-SSO Luminex (polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides).
- 2) Estimar as frequências genotípicas e alélicas para estes genes na população de indivíduos com fibrose ausente a moderada (graus METAVIR F0, F1 e F2) e naqueles com fibrose avançada ou cirrose (graus METAVIR F3 e F4).
- 3) Estimar as frequências genotípicas e alélicas para estes genes na população de indivíduos com resposta virológica sustentada, sem resposta virológica sustentada e naqueles que apresentaram recidiva ao tratamento com Peginterferon mais Ribavirina.

- 4) Avaliar, estatisticamente, uma associação entre os genes *KIR* e alelos HLA com o desenvolvimento de dano hepático (diferentes graus de fibrose) e com a resposta ao tratamento.

Referências Bibliográficas:

1. World Health Organization Hepatitis C: Disponível Em: http://Www.Who.Int/Csr/Disease/Hepatitis/Hepatitisc_Whocdscsrlyo2002_2.Pdf Acesso 15 de agosto de 2008.
2. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. Science 1989; 244:359–362.
3. Trepo C, Vierling J, Zeytin FN, Gerlich WH. The First Flaviviridae Symposium. Intervirology 1997; 40:279–88.
4. Simmonds, P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus - 15 Years On. J Gen Virology 2004; 85: 3173-3188.
5. Simmonds, P, Holmes, EC, Cha, T-A. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. J Gen Virology 1993; 74: 2391–2399.
6. SBH – Relatório do grupo de estudos da sociedade brasileira de hepatologia. epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. Disponível em www.sbhepatologia.org.br Acesso em agosto de 2008.
7. Corvino SM, Henriques RMS. Distribuição dos genótipos do VHC em pacientes das regiões de Botucatu, Bauru e Assis, São paulo, Brasil. Revista do Instituto Adolfo Lutz 2006; 2 (65):137-140.
8. Martins RMB, Teles SA, Freitas NR, Motta-Castro ARC, Souto FJD, Mussi A, Amorim RMS, Martins CRF. Distribution of hepatitis C virus genotypes among

- blood donors from mid-west region of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 2006; 1(48): 53-55.
9. Mast EE, Hwang LY, Seto DS, Nolte FS, Nainan OV, Wurtzel H, et al. Risk factors for perinatal transmission of hepatitis c virus (HCV) and the natural history of HCV infection acquired in infancy. *J Infect Dis* 2005; 192: 1880–1889.
 10. Vandelli C, Renzo F, Romano L, Tisminetzky S, De Palma M, Troffolini T, et al. Lack of evidence of sexual transmission of hepatitis C among monogamous couples: results of a 10-year prospective follow-up study. *Am J Gastroenterol* 2004; 99:855–859.
 11. Prati D. Transmission of hepatitis C virus by blood transfusions and other medical procedures: a global review. *J Hepatol* 2006; 45:607–616.
 12. Gonzalez A, Esteban JI, Madoz P, Viladomiu L, Genesca J, Muniz E, et al. Efficacy Of Screening Donors For Antibodies To The Hepatitis C Virus To Prevent Transfusion-Associated Hepatitis: Final Report of A Prospective Trial. *Hepatol* 1995; 22:439–445.
 13. CDC. Guidelines for viral hepatitis surveillance and case management. morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. June 2002: 1-43. acesso em agosto de 2008.
 14. Ferreira CT, Silveira TR, Hepatites Virais: aspectos da epidemiologia e prevenção. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2004; 7(4) 473-87.
 15. Alter MJ. Prevention of spread of Hepatitis C. *Hepatol* 2002; 36 (S1): 93-8.
 16. Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Lyles CM, Cohn S, Thomas DL. Incidence and risk factors for hepatitis C among injection drug users in Baltimore, Maryland. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3274–3277.

17. Sutton AJ, Gay NJ, Edmunds WJ, Hope VD, Gill ON, Hickman M. Modelling the force of infection for hepatitis B and hepatitis C in injecting drug users in England and Wales. *BMC Infect Dis* 2006 6:93.
18. Hoofnagle JH. Course and outcome of hepatitis c. *Hepatology* 2002; 36 (Suppl 1):S21–9.
19. Blackard JT, Shata MT, Shire NJ, Sherman et al. Acute Hepatitis C Virus Infection: a Chronic Problem. *Hepatology*. 2008; 47(1): 321–331.
20. Brasil. Consenso Sobre Condutas Nas Hepatites Virais B E C. Sociedade Brasileira De Hepatologia 2005. Disponível Em: <http://www.sbhepatologia.org.br> Acesso em agosto de 2008.
21. McCaughan GW, Omata M. Asian pacific association for study of the liver consensus statement on the diagnosis, management and treatment of hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol* 2007; 22: 615-33.
22. Bialek SR, Terrault NA. The Changing epidemiology and natural history of Hepatitis C Virus Infection. *Clinics in Liver Dis* 2006; 10: 697–715.
23. Thomas DL, Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 383– 398.
24. NIH Consensus Statement On Management Of Hepatitis C, NIH Consensus State Sci Statements 19:1–46 2002.
25. Focaccia, Roberto. Tratado De Hepatites Virais. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 854p.
26. Rehermann B, Chang KM, McHitchinson J, Kokka R, Houghton M, Rice CM, et al. Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis B and C viruses in chronically infected patients. *J virol* 1996;70:7092-7102.

27. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. O complexo principal de Histocompatibilidade. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. Editora Revinter Capítulo 5; 6ª Edição. Rio de Janeiro; 2007. P.97-113
28. Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of viral infections. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:510–516.
29. Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW et al. HLA-C*04 and hepatitis C virus persistence. *J Virol* 2002; 76:4792-4797.
30. Vejbaesya S, Songsivilai S, Tanwandee T, Rachaibun S, Chantangpol R, Dharakul T. HLA association with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2000; 61: 348-353.
31. Yenigun A, Durupinar B. Decreased frequency of the HLADRB1*11 allele in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2002; 76: 1787-1789.
32. Yee LJ Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Gen Immun* 2004; 5: 237–245
33. Mckiernan SM, Hagan R, Curry M, Mcdonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D. Distinct MHC Class I And II Alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004; 40:108-114.
34. Thursz M, Yallop R, Goldin R et al. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1999; 354: 2119–2124
35. Cursino-Santos JR, Donadi EA, Martinelli. ALC, Louzada-Junior P, Martinez-Rossi NM. Evolution of Hepatitis C virus infection under host factor influence in an ethnically complex population. *Liver Int* 2007; 27(10): 1371-1378.

36. Kärre K. NK cells, MHC, Class I molecules and the missing-self. *Scand J Immunol* 2002; 55:221-228.
37. Vivier E. What is natural in natural killer cells? *Immunol Lett* 2006; 107 : 1–7
38. Vivier E, Romagné F. Good news, bad news for missing-self recognition by NK cells: autoimmune control but viral evasion. *Immunity* 2007; 26: 549-551.
39. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade natural. In: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular E Molecular*. Editora Revinter Capítulo 5; 6ª Edição. Rio de Janeiro; 2007. P.19-46.
40. Parham P. Killer cell immunoglobulin-like receptor diversity: balancing signals in the natural killer cell response. *Immunol Lett* 2004; 92: 11–13
41. Moretta A, Tambussi G, Bottino C, Tripodi G, Merli A, Ciccone E, Pantaleo G, Moretta L A Novel Surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ Natural Killer cells *J Exp med* 1990; 171: 695-714.
42. Carrington M., Norman P. The Kir Gene Cluster. 2003. Disponível Em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/Mono_003/Ch1d1.Pdf
Acesso em 12 de agosto de 2008.
43. Bashirova AA, Martin MP, Mcvicar DW, Carrington M. The Killer Immunoglobulin-Like Receptor Gene Cluster: Tuning The Genome For Defense *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7:277–300
44. Middleton D, Williams F, Halfpenny IA. Kir Genes *Transp Immunol* 2005 Mar;14:135-42.
45. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes *Immun* 1997; 7: 753–763

46. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B.. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002; 169:5118–29
47. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MDA. Common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the rhesus monkey. *Tissue Antigens* 2002 60: 254–258.
48. Khakoo SI, Carrington M KIR and disease: A model system or system of models? *Immunol Rev* 2006; 214:186–201
49. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The yin and yang of HLA and KIR in human disease. *Semin Immunol* 2008; 20: 343–352.
50. Muller CA, Blum E, Gekeler V, Steiert I, Weiss E, Schmidt H. Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6. *Immunogenetics* 1989;30:200–207.
51. Gumperz JE, Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P. The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med* 1995; 181:1133–1144.
52. Stern M, Rugger Li, Capanni M, Mancusi A, Velardi A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood*;112 (3): 708-710.
53. Rajagopalan S, Long EO. A Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all Natural killer cells. *Journal Exp med* 1999; 189(7): 1093–100.

54. Dohring C, Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 1996;156(9):3098–101.
55. Katz G, Markel G, Mizrahi S, Arnon Ti, Mandelboim O. Recognition Of HLA-C*4 but not HLA-C*6 by the NK cell receptor killer cell ig-like receptor two domain short tail number 4. *J Immunol* 2001;166 (12):7260–7.
56. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004 (305):872-874.
57. Romero V, Azocar J, Zúñiga J, Clavijo OP, Terreros D, Gu X, et al Interaction of Nk inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC Class II alleles in hepatitis c virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008; 45: 2429–2436.
58. Paladino N, Flores AC, Marcos CY, Fainboim H, Theiler G, Arruvito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. *Tissue Antigens* 2007 69 (S-I): 109-11.
59. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferon-based therapy of hepatitis c advanced drug delivery. *Reviews* 2007; 59:1222–124.
60. Brasil, Ministério da Saúde. Portaria nº34/2007- Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C.
61. Kozlowski A, Charles SA. Development of pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C. *Biodrugs* 2001;15: 419–429.
62. Alberti A, Benvegnù, L. Management of hepatitis C. *J. Hepat* 2003;38(S1):104-118.
63. Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S. Environmental Factors as Disease Accelerators During Chronic Hepatitis C. *J Hepatol* 2008;48:657–665.

64. Foster GR, Fried MW, Hadziyannis SJ, Messinger D, Freivogel K, Weiland O. prediction of sustained virological response in chronic hepatitis c patients treated with peginterferon alfa-2a (40kd) and ribavirin. *Scand J Gastroenterol* 2007;42 (2): 247-55.
65. Miyaguchi, S. Et Al. Possible association between HLA antigens and response to interferon in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens* 1997; 6 (49): 605-11.
66. Ivic I, Bradarić N, Puizina-Ivić N, Ledina D, Lukšić B, Martinić R. HLA C*07 allele as predictor of favorable therapeutic response to interferon-alpha in patients with chronic hepatitis C. *Croat Med J* 2007; 6(48): 807-13.
67. Jiao J, Wang JB. Effects of HCV genotypes and HLA – DRB alleles on the response of chronic hepatitis C patients to interferon alpha and ribavirin. *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chin.* 2003;10 (11): 620-2.

CAPÍTULO II

Artigo: EFEITO PROTETOR DE HLA-DRB1*11 NO DESENVOLVIMENTO DE DANO HEPÁTICO EM PACIENTES BRASILEIROS COM INFECÇÃO CRÔNICA PELO VÍRUS DA HEPATITE C

TÍTULO: Efeito protetor de HLA-DRB1*11 no desenvolvimento de dano hepático em pacientes brasileiros com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

Amanda Vansan Marangon¹, Giovanni Faria Silva², Camila Fernanda Verdichio de Moraes³, Rejane Maria Tomasini Grotto³, Maria Inês De Moura Campos Pardini³, Dayse Sousa De Pauli⁴, Ana Maria Sell¹, Ricardo Alberto Moliterno¹.

¹ Immunogenetics Laboratory, Department of Clinical Analysis, Maringá State University, UEM, Maringá-PR, Brazil.

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

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

⁴ Clinical Hospital of Londrina, Londrina State University, UEL, Londrina-PR, Brazil.

CORRESPONDÊNCIA

Dr Ricardo Alberto Moliterno
Laboratório de Imunogenética
Departamento de Análises Clínicas
Universidade Estadual de Maringá Av. Colombo, 5790
Maringá, PR 87020-900
Brazil
Tel: +55 44 3261 4864
Fax: +55 44 3261 4931
e-mail: ramoliterno@uem.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os genes HLA em portadores crônicos do vírus da hepatite C e analisar o possível papel desses genes na progressão da hepatite C crônica. Para tanto, 145 pacientes brasileiros infectados somente com o genótipo 1 do vírus foram avaliados. Os pacientes não possuíam infecções concomitantes pelo HBV e HIV e/ou doenças hepáticas e não realizaram tratamento antiviral antes da biópsia de fígado. As tipificações dos alelos HLA de classe I e classe II foram realizadas pela técnica de PCR-SSO, plataforma Luminex. Foram encontradas associações entre proteção ao desenvolvimento de dano hepático com os alelos DRB1*11 (5,0% vs 18,2% $P=0,0016$; OR= 0,23; IC 95%= 0,09 - 0,58) e com o haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 (4,2% vs 15,3%; $P= 0,0032$; OR= 0,24; IC 95%=0,08-0,64). Conclui-se que os antígenos HLA podem influenciar o desenvolvimento de dano hepático em portadores crônicos do VHC.

PALAVRAS-CHAVE: HLA. Fibrose hepática. Hepatite C.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C é uma das principais causas de doença crônica no fígado. A hepatite C crônica ocorre em aproximadamente 50 a 85% dos indivíduos infectados [Villano *et al.*, 1999; Thomas e Seef, 2005] e pode ser evidenciada por alterações histopatológicas que se iniciam com uma inflamação no fígado, freqüentemente associada à fibrose, podendo evoluir para cirrose e em alguns casos hepatocarcinoma. [Goodman, 1995; Thomas e Seef, 2005].

Os fatores envolvidos na progressão da hepatite C crônica para a cirrose hepática têm sido amplamente investigados. Fatores como genótipo viral, idade, sexo, infecções concorrentes e alcoolismo podem influenciar a progressão da doença, porém esses fatores sozinhos não explicam porque muitos pacientes evoluem de forma benigna por décadas e outros rapidamente progridem para doença do fígado em estágio final [Kobayashi *et al.*, 1996; Poynard *et al.*, 1997; Freemann *et al.*, 2001; Mallat *et al.*, 2008].

Um dado relevante, caracterizado pela presença de indivíduos saudáveis que albergam o vírus, é que o VHC parece não ter efeito citopático direto nos hepatócitos infectados, [Focaccia, 2003; Pawlotski, 2004]. Nesse caso, a progressão da doença e os danos hepáticos podem resultar aparentemente da resposta imune do hospedeiro, a qual envolve uma complexa interação entre o sistema imune inato e adaptativo. [Rehermann *et al.*, 2000; Pawlotski, 2004;]

Nesse contexto, a diversidade dos genes envolvidos na resposta imune pode explicar, em parte, a variabilidade da resposta às infecções. Entre as muitas famílias de genes de resposta imune, destacam-se os genes HLA de classe I e classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Vários estudos têm relacionado variantes HLA com o desenvolvimento de infecção ou eliminação viral espontânea do VHC [Yasunami *et al.*, 1997; Kuzushita *et al.*, 1998; Asti *et al.*, 1999; Mangia *et al.*, 1999;

Harcourt *et al.*, 2000], porém são escassos os estudos que avaliam a associação HLA com a progressão da doença em portadores crônicos do vírus, especialmente em populações brasileiras. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar os genes HLA em portadores crônicos do VHC com diferentes graus de fibrose e analisar o possível papel desses genes na progressão e/ou severidade da hepatite C.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Seleção dos pacientes

No período de Setembro de 2004 a Janeiro de 2009 (± 5 anos e 4 meses) foram coletadas amostras de 761 pacientes infectados pelo vírus da hepatite C atendidos no Departamento de Medicina Interna -Divisão de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Botucatu, SP, Brasil (22°53'09" S; 48°26'42" W). Os pacientes foram criteriosamente selecionados, sendo incluídos apenas 145 pacientes no estudo. Os critérios de inclusão foram: presença de infecção crônica por VHC caracterizada pela persistência de VHC-RNA no soro, por testes moleculares e por biópsia de fígado, e infecção somente pelo genótipo 1 do vírus da hepatite C. Os outros 616 pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem sorologia positiva para o vírus da hepatite B (HBV) ou para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), presença de outras doenças hepáticas, presença de outros genótipos do vírus e/ou tratamento antiviral antes da biópsia de fígado. As informações clínicas dos pacientes foram coletadas do prontuário do paciente. O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista, Botucatu e todos os pacientes selecionados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Biópsia do Fígado

As biópsias foram realizadas usando a técnica de Menghini ou com agulha de Tru-Cut para avaliar a progressão ou severidade da doença. Os fragmentos foram analisados quando ao menos oito espaços porta estavam presentes. O tecido foi submetido às colorações: hematoxilina-eosina, Tricrômico de Masson e Reticulina. As biópsias foram analisadas por um patologista usando a classificação METAVIR: F0 - sem fibrose, F1 - fibrose periportal sem septos, F2 - fibrose entre os espaços porta com poucos septos, F3 - numerosos septos sem cirrose e F4 cirrose [Bedossa, 1993]. Os pacientes foram separados em 2 grupos de acordo com o estágio de fibrose: fibrose ausente, leve ou moderada (F0-F2, n= 85) e fibrose avançada ou cirrose (F3-F4, n= 60).

Genotipagem do VHC

A genotipagem do VHC foi definida pela técnica *reverse line probe assay* (INNOLIPA® v.1.0, Innogenetics, Ghent, Belgium), segundo as instruções do fabricante. Essa genotipagem foi precedida pela extração do RNA viral presente no plasma do paciente, seguida de uma *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), realizadas pelo kit *Amplicor VHC test* version 2.0 (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, N.J), também seguindo as instruções do fabricante.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 250uL de sangue venoso periférico coletado em tubo contendo EDTA, utilizando o kit NeoIsocolumn (One Lambda Inc., San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Tipagem HLA

As tipagens dos locos HLA (HLA-A*, -B*, -C*, -DRB1*, -DQA1* e DQB1*) foram realizadas pela técnica *polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides* (PCR-SSO, One Lambda®, Canoga Park, CA, USA), na qual o produto amplificado foi hibridizado com microesferas ligadas a sondas específicas para os alelos

HLA (One Lambda[®], Canoga Park, CA, USA). As leituras das reações foram realizadas em um citômetro de fluxo que utiliza a tecnologia Luminex (One Lambda[®]). As amostras foram analisadas pelo programa HLA Fusion[™], One Lambda.

Estatística

As comparações das frequências alélicas foram analisadas em tabelas de contingência 2x2 pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates e/ou pelo Teste de Fisher, quando necessário. Valores de *P* significativos foram corrigidos pelo número de alelos estudados em cada loco (Pc; Correção de Bonferroni). Valores de *Odds Ratio* com 95% de intervalo de confiança também foram calculados para valores de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *SISA statistics* (<http://home.clara.net/sisa/two2hlp.htm>). A fase gamética dos alelos dos diferentes locos analisados não é conhecida, pois não foi feita análise de segregação em famílias. A determinação dos haplótipos e o cálculo de suas frequências foram realizadas pelo teste de verossimilhança, utilizando o Programa estatístico Arlequin [Excoffier *et al.*, 2005]. O equilíbrio de Hardy-Weinberg [Guo e Thompson., 1992] foi feito calculando as frequências genotípicas esperadas e comparando-as com os valores observados, sendo realizado também pelo programa Arlequin [Excoffier *et al.*, 2005].

RESULTADOS

Características dos pacientes

As análises demonstraram que as distribuições das proporções das frequências genotípicas na população estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As características da população de estudo referentes a idade, gênero, fatores de risco, tempo de infecção e graus de fibrose de acordo com Score METAVIR são apresentadas na Tabela 1.

Os pacientes foram considerados como um grupo étnico misto, visto que avaliações fenotípicas baseadas em características físicas como cor da pele não são bons prognósticos de descendência genética africana [Parra *et al.*, 2003].

Alelos HLA de Classe II

O alelo HLA de classe II DRB1*11 foi menos freqüente no grupo com fibrose avançada ou cirrose quando comparado ao grupo sem fibrose ou fibrose leve a moderada (5,0% vs 18,2% $P=0,0016$; $P_c=0,0208$; OR= 0,23; IC 95%= 0,09 - 0,58), respectivamente. O alelo DQA1*05, por sua vez, também foi menos freqüente no grupo com fibrose avançada ou cirrose (19,1% vs 32,9%; $P=0,013$; OR= 0,48; IC 95%= 0,27 - 0,84), porém após correção de Bonferroni, o valor de P perdeu significância ($P_c=0,065$). Não foram encontradas diferenças significativas quando comparados os dois grupos para os alelos HLA-DQB1*. As freqüências dos alelos HLA de classe II são apresentadas na Tabela 2.

Alelos HLA de Classe I

O alelo HLA-A*02 foi mais freqüente no grupo com fibrose avançada quando comparado com o grupo de não fibrose ou fibrose leve a moderada (35% vs 20,6% $P=0,009$; OR= 2,07; IC 95%=1,24-3,52). Contudo, depois de feita a correção do P (correção de Bonferroni) o alelo HLA-A*02 perdeu a significância ($P_c=0,153$). Contrariamente, o alelo HLA-A*23 foi menos freqüente no grupo F3-F4 quando comparado ao grupo F0-F2 (0,8% vs 5,8% $P=0,029$; OR= 0,13; IC 95%= 0,01-1,06), porém, após correção de Bonferroni, o valor de P perdeu significância ($P_c=0,493$). Não foram encontradas diferenças significativas entre os alelos dos locos HLA-B* e HLA-C* nos dois grupos. As freqüências dos alelos HLA de classe I são apresentados na Tabela 3.

Haplótipos

Na análise dos haplótipos, foram encontrados 22 haplótipos no grupo F3-F4 e 28 no grupo F0-F2, dos quais HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 foi estatisticamente menos freqüente em pacientes F3-F4 que nos pacientes F0-F2 (4,2% vs 15,3%; $P=0,0032$; OR= 0,24; IC 95%=0,08-0,64).

DISCUSSÃO

Os alelos HLA de classe II têm um papel importante na resposta imune frente a infecções virais por serem proteínas chave para a apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T CD4+. Há muitas evidências de que os alelos HLA de classe II estão envolvidos no controle da infecção viral pelo VHC [Alric *et al.*, 1997; Mckiernan *et al.*, 2000; Cursino-Santos *et al.*, 2007], sendo o dado mais consistente o efeito protetor dos alelos DRB1*11 e DQB1*03 [Thio *et al.*, 2001; Yenigun., 2002; Yee, 2004], os quais têm sido fortemente associados à eliminação viral espontânea [Mangia *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 2008] e a maior resistência para o desenvolvimento de infecção crônica pelo VHC. Hong *et al.*, [2005] num estudo de meta-análise, demonstraram que indivíduos com alelos HLA-DRB1*11:01 e DQB1*03:01 reduzem o risco de desenvolverem infecção crônica pelo VHC em 102% e 136%, respectivamente, sugerindo que esses alelos possam ser fatores importantes em favorecer a eliminação do VHC e proteger contra infecção crônica.

No presente estudo, avaliou-se a influência dos alelos HLA na progressão da doença no fígado em pacientes cronicamente infectados pelo VHC e o alelo DRB1*11 foi associado com proteção ao desenvolvimento de fibrose avançada ou cirrose. Esse resultado está de acordo com outros estudos que também encontraram associação desse alelo com proteção à progressão ou à severidade da hepatite C em diferentes populações. Asti *et al.*, [1999], na Itália, encontraram o alelo DRB1*11:04 em menor

freqüência em pacientes com doença crônica no fígado de diferentes severidades quando comparados a indivíduos assintomáticos que albergam o VHC. Em um estudo realizado na França, Renou *et al.* [2002] relacionaram a severidade da hepatite C com os níveis de alanina aminotransferase (ALT), comparando pacientes com hepatite C crônica que possuíam níveis normais de ALT e pacientes com níveis de ALT elevados e encontraram maior freqüência do alelo DRB1*11 no grupo com níveis normais de ALT. Em outro estudo realizado na França Hue *et al.*, [2002] observaram menor freqüência de DRB1*11 em pacientes com cirrose (grau F4 de acordo com o score Knodell) quando comparados aos pacientes sem cirrose (F0-F3 score Knodell). Tilmann *et al.*, [2001] na Europa, observaram que DRB1*11 foi menos freqüente em indivíduos que realizaram transplantes para a doença do fígado em estágio terminal induzida pelo VHC quando comparados a doadores de sangue.

Apesar destes estudos avaliarem a progressão da hepatite C de diferentes formas, em todos eles, os alelos do grupo DRB1*11 aparecem em menor freqüência em indivíduos em estágios mais avançados da doença. Esses dados confirmam o efeito protetor de DRB1*11, demonstrando que esse alelo tem papel não só em facilitar a eliminação espontânea do VHC, como também em evitar maior dano hepático nos pacientes infectados cronicamente pelo vírus.

Em estudos de associação com a infecção crônica, o alelo HLA DRB1*11 tem sido descrito conjuntamente com DQB1*03 como alelo de proteção ao desenvolvimento de infecção crônica pelo VHC, [Mangia *et al.*, 1999; Alric *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2005]. Entretanto, nossos dados não confirmaram a associação entre DQB1*03 e progressão e/ou severidade da hepatite C crônica. Por outro lado, o alelo DQB1*03 aparece em conjunto com DRB1*11 na análise dos haplótipos, na qual o haplótipo

HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 foi significativamente menos freqüente em pacientes F3-F4 que nos pacientes F0-F2.

Em um estudo realizado na Itália, este mesmo haplótipo foi também associado com proteção ao desenvolvimento da Hepatite C. O autor sugere que a associação entre infecção pelo VHC e este haplótipo é devida primariamente ao subtipo DRB1*11:04 [Zavaglia *et al.*, 1998]. No presente estudo, o efeito protetor do haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 também parece ser devido principalmente ao DRB1*11, já que o alelo DQB1*03 não se apresentou associado a graus de fibrose leve ou moderada. Além disso, nossos dados não indicam uma associação preferencial com o alelo DRB1*11:04 (dados não mostrados).

O alelo DQA1*05 apresentou-se também com menor freqüência em pacientes F3-F4, sugerindo um papel protetor desse alelo contra injúria hepática; porém, após correção de Bonferroni o valor de *P* perdeu significância. Além disso, este alelo também está em desequilíbrio de ligação com DRB1*11(Δ' =0,46), fazendo com que esse resultado seja aparentemente secundário à associação com DRB1*11.

É interessante observar que no grupo F0-F2, de 31 pacientes DRB1*11, somente 2 (6,0%) pacientes apresentaram concomitantemente os alelos DRB1*07. Já nos grupo F3-F4, dos 6 pacientes que possuíam DRB1*11, 3 (50%) apresentavam também o alelo DRB1*07, o qual tem sido associado a maior susceptibilidade à infecção persistente pelo VHC [Fanning *et al.*, 2000; Corghi *et al.*, 2008]. Assim, esses 3 pacientes possuem um alelo de proteção e o outro de susceptibilidade à doença, e talvez, o alelo DRB1*07 nesses indivíduos contraponha a proteção dada pelo alelo DRB1*11. Contudo, DRB1*07 não se apresentou associado com dano hepático severo em portadores crônicos de VHC neste estudo. É importante ressaltar que em muitos estudos de

associação do HLA e a hepatite C, são incluídos vários genótipos virais num grupo único de pacientes o qual não foi feito no presente trabalho.

Os linfócitos T CD8⁺ vírus específicos também têm papel no controle viral e injúria hepática. A função efetora dos linfócitos T CD8⁺ compreende dois mecanismos diferentes: a lise de células infectadas (citotoxicidade), que é a função primária desses linfócitos, e também funções efetoras não citolíticas, que incluem a secreção de citocinas como interferon gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral (TNF)- α , que pode inibir a replicação viral sem lisar a célula infectada [Guidotti and Chisari, 2001]. A ativação dos linfócitos T citotóxicos requer a interação com moléculas HLA de classe I e alguns artigos encontraram associações entre os alelos HLA de classe I e susceptibilidade, proteção e/ou progressão da doença em pacientes com hepatite C crônica. Fanning *et al.*, [2004] encontraram o alelo HLA-C*04 associado à persistência da infecção por VHC. Patel *et al.*, [2006], em um estudo realizado na Inglaterra, observaram uma maior proporção de pacientes F2-F4 expressando HLA-B*18 quando comparados com controles. Thio *et al.*, [2002] em um estudo comparando pacientes com infecção persistente e com eliminação viral espontânea, relataram associações entre HLA-A*11:01, -B*57 e -C*01:02 e eliminação viral. Os autores também encontraram associação dos alelos HLA-A*23:01 e -C*04 com susceptibilidade à persistência viral.

No presente trabalho o alelo HLA-A*23 apresentou-se menos freqüente no grupo F3-F4, sugerindo proteção ao desenvolvimento de dano hepático; entretanto, após correção de Bonferroni o valor de *P* perdeu significância. Thio *et al.*, [2002] encontraram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de infecção crônica pelo VHC em pacientes HLA-A*23.

Alguns alelos HLA-C* podem ser importantes na infecção pelo VHC porque são ligantes para alguns receptores das células *Natural Killer*, os quais parecem influenciar

a persistência viral [Kakhoo *et al.*, 2004]. Contudo, no presente estudo não foram encontradas associações significativas entre os alelos HLA-C* e progressão à cirrose em pacientes cronicamente infectados.

CONCLUSÃO

Nos últimos anos muitos estudos têm associado os genes do complexo MHC à progressão, severidade ou atividade da infecção por VHC, com muitos resultados diferentes. Em muitos desses estudos a definição de “menor severidade da doença” varia desde a dados bioquímicos (nível ALT) a danos histológicos. Neste estudo, os pacientes foram caracterizados cuidadosamente quanto ao “status” da infecção crônica, e quanto a possíveis interferentes, formando um grupo com características bem homogêneas, que permitiu analisar com maior clareza a genética do hospedeiro e inferir que o alelo HLA-DRB1*11 constitui um fator genético importante não só na proteção contra o desenvolvimento de infecção crônica, mas também em proteger contra dano hepático severo em pacientes cronicamente infectados pelo VHC.

REFERÊNCIAS

Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, et al. 1997. Genes of The Major Histocompatibility Complex Class II Influence The Outcome Of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol* 113: 1675–1681.

Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Burel C, Sandre K et al. 2000. Study of Host- And Virus-Related Factors Associated With Spontaneous Hepatitis C Virus Clearance. *Tissue Antigens* 56: 154–158.

Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, et al. 1999. Human Leukocyte Antigen Class II and III Alleles And Severity Of Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. *Hepatology* 29: 1272–1279.

Bedossa, P. 1993. Presentation of a grid for computer analysis for complication of histopathologic lesions in chronic viral hepatitis C. *Ann Pathol* 13(4):260-5.

Corghi DB, Gonçalves NSL, Marques SBD, Junior FLG. 2008. Distribution of the Human Leukocyte Antigen Class II Alleles in Brazilian Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Braz J Med Biol Res* 41: 884-889.

Cursino-Santos JR, Donadi EA, Martinelli ALC, Louzada-Junior P, Martinez-Rossi NM. 2007. Evolution of Hepatitis C Virus Infection Under Host Factor Influence In An Ethnically Complexpopulation. *Liver Int* 27: 1371-1378.

Guo S, Thompson E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometric* 48:361-372.

Excoffier LG, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin Ver. 3.0: An Integrated Software Package For Population Genetics Data Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, Wynne F, Whelton M, Shanahan F. 2000. Viral Clearance In Hepatitis C (1b) Infection: Relationship With Human Leukocyte Antigen Class II In a Homogeneous Population. *Hepatology* 31:1334–1337.

Fanning LJ, Kenny-Walsh E, Shanahan F. 2004. Persistence of Hepatitis C Virus in A White Population: Associations With Human Leukocyte Antigen Class I. *Hum Immunol* 65:745–751.

Freeman AJ, Dore GJ, Law MG, Thorpe M, Overbeck JY, Lloyd AR, Marinos G, Kaldor JM. 2001. Estimating Progression to Cirrhosis In Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology* 34 (4):809-816

Focaccia, Roberto. *Tratado De Hepatites Virais*. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 854p.

Goodman ZD, Ishak KG. 1995. Histopathology Of Hepatitis C Virus Infection. *Semin Liver Dis* 15:70 – 81.

Guidotti LG, Chisari FV. 2001. Noncytolytic Control of Viral Infections by The Innate And Adaptive Immune Response. *Annu Rev Immunol* 19:65–91.

Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi, J Collier J, Chapman R, Phillips R, Klenerman P. 2001. Effect of HLA Class II Genotype On T Helper Lymphocyte Responses and Viral Control In Hepatitis C Virus Infection. *J Viral Hepatitis* 8: 174-179

Harris RA, Sugimoto K, Kaplan DE, Ikeda F, Kamoun F, Chang KM. 2008. Human Leukocyte Antigen Class II Associations With Hepatitis C Virus Clearance And Virus-Specific CD4 T Cell Response Among Caucasians And African Americans. *Hepatology* 48(1):70-79.

Haruna Y, Miyamoto T, Yasunami R, Kanda T, Fushimi I, Kotoh K. 2000. Human Leukocyte Antigen DRB1*1302 Protects Against Bile Duct Damage and Portal Lymphocyte Infiltration in Patients with Chronic Hepatitis C. *J Hepatology* 32: 837–842.

Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. 2005. Human Leukocyte Antigen Class II DQB1*0301, DRB1*1101 Alleles And Spontaneous Clearance Of Hepatitis C Virus Infection: A Meta-Analysis. *World J Gastroenterol* 11(46):7302-7307

Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F et al. 2002. Human Leukocyte Antigen Class II Alleles May Contribute To The Severity Of Hepatitis C Virus-Related Liver Disease. *J Infect Dis* 186:106–9

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J et al. 2004. HLA And Nk Cell Inhibitory Receptor Genes In Resolving Hepatitis C Virus Infection. *Science* 305:872-874.

Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K. 1996. The Natural Course Of Chronic Hepatitis C: A Comparison Between Patients With Genotypes 1 And 2 Hepatitis C Viruses. *Hepatology* 23: 695–699.

Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S et al. 1998. Influence of HLA Haplotypes On The Clinical Courses Of Individuals Infected With Hepatitis C Virus. *Hepatology* 27: 240–244.

Mallat A, Hezode C, Lotersztajn S. 2008. Environmental Factors As Disease Accelerators During Chronic Hepatitis C. *J Hepatology* 48:657–665.

Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, et al. 1999. HLA Class II Favors Clearance of HCV Infection and Progression of The Chronic Liver Damage. *J Hepatology* 30: 984–989

Mckiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald JSA, Nolan N, Crowley J, et al. 2000. The MHC Is A Major Determinant Of Viral Status, But Not Fibrotic Stage, In Individuals Infected With Hepatitis C. *Gastroenterology* 118: 1124–1130.

Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. 2003. Color and Genomic Ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci Usa* 100: 177–82.

Patel K, Norris S, Lebeck L, Feng A, Clare M, Pianko S et al. 2006. HLA Class I Allelic Diversity and Progression of Fibrosis In Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 2(43):241-246.

Pawlotsky JM. 2004. Pathophysiology Of Hepatitis C Virus Infection And Related Liver Disease. *Trends Microbiol* 12 (2):96-102.

Poynard T, Bedossa P, Opolon P. 1997. Natural History Of Liver Fibrosis Progression In Patients With Chronic Hepatitis C. The Obsvirc, Metavir, Clinivir, and Dosvirc groups. *Lancet* 349:825-832.

Rehermann. 2000. Interaction between the Hepatitis C virus and the immune system. *Semin Liver Dis* 20(2):127-141.

Renou C, Halfon P, Pol S, Cacoub P, Jouve E, Bronowicki JP et al. 2002. Histological Features And HLA Class II Alleles In Hepatitis C Virus Chronically Infected Patients With Persistently Normal Alanine Aminotransferase Levels. *Gut* 51:585–590.

Thio CL, Thomas DL, Goedert JL, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MH et al. 2001. Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* 184:16-21.

Thio CL, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, et al. 2002. HLA-C*04 and Hepatitis C Virus Persistence. *J Virol* 76: 4792–4797.

Thomas DL, Seef LB. 2005. Natural History of Hepatitis C. *Clin Liver Dis* 9: 383– 398.

Tillmann HL, Chen DF, Trautwein C, Kliem V, Grundey A, Berning-Haag A et al. 2001. Low Frequency of HLA-DRB1*11 in Hepatitis C Virus Induced End Stage Liver Disease. *Gut* 48:714–718.

Villano SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, Thomas DL. 1999. Persistence Of Viremia And The Importance Of Long-Term Follow-Up After Acute Hepatitis C Infection. *Hepatology* 29:908

Yasunami R, Miyamoto T, Kanda T. 1997. HLA-DRB1 Is Related To The Pathological Changes Of The Liver In Chronic Hepatitis C. *Hepatology* 7: 3–12.

Yee LJ. 2004. Host Genetic Determinants In Hepatitis C Virus Infection. *Genes Immun* 5: 237–245.

Yenigun A, Belma Durupinar. 2002. Decreased Frequency of The *HLA-DRB1*11* Allele In Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 76(4):1787–1789.

Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Bottelli R, Daielli C, Asti M et al. 1998. Association between HLA Class II Alleles and Protection From Or Susceptibility To Chronic Hepatitis C. *J Hepatology* 28:1–7.

TABELAS

Tabela I: Características dos pacientes com hepatite C crônica atendidos no Departamento de Medicina Interna – Divisão de Gastroenterologia clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de setembro de 2004 a janeiro de 2009. N=145.

PARAMETROS CLÍNICOS	Pacientes N=145	F0-F2 N=85	F3-F4 N=60
Idade (média ± SD)	43,4±10,4	39,8±9,3	48,6±9,8
Sexo n (%)			
Masculino	112 (77,3)	67 (78,8)	45 (75,0)
Feminino	33 (22,7)	18 (21,2)	15 (25,0)
Fatores de Risco n (%)			
Transusão	36 (24,8)	17 (20,0)	19 (31,7)
Uso de drogas injetáveis	24 (16,6)	22 (25,9)	2 (3,3)
Uso de gluconergan	22 (15,2)	10 (11,7)	12 (20,0)
Uso de cocaína inalada	5 (3,4)	2 (2,4)	3 (5,0)
*Outros	58 (40,0)	34 (40,0)	24 (40,0)
**Tempo de infecção (média ± SD)	21,8±8,3	19,2±6,9	25,7±8,7
***Classificação METAVIR n (%)			
F0	7 (4,8)	7 (8,2)	-
F1	43 (29,7)	43 (50,5)	-
F2	35 (24,1)	35 (41,2)	-
F3	22 (15,2)	-	22 (36,7)
F4	38 (26,2)	-	38 (63,3)

*Tatuagens, cirurgias, homossexualidade, promiscuidade e fator de risco desconhecido.

** O tempo de infecção foi calculado para 90 pacientes (F0=4, F1=25, F2=24, F3=16 e F3=21) o tempo de infecção de 55 pacientes é desconhecido.

***Classificação METAVIR: F0 - sem fibrose, F1 - fibrose periportal sem septos, F2 – fibrose entre os espaços porta com poucos septos, F3 - numerosos septos sem cirrose e F4 – cirrose.

Tabela II. Frequência alélica HLA de classe II nos 85 pacientes sem fibrose ou com fibrose leve a moderada (F0-F2) e nos 60 pacientes com fibrose avançada ou cirrose (F3-F4).

Alelos	HLA-DRB1		Alelos	HLA-DQ	
	F0-F2	F3-F4		F0-F2	F3-F4
	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)
DRB1*01	17 (10,0)	10 (8,3)	DQA1		
DRB1*03	21 (12,4)	11 (9,1)	DQA1*01	69 (40,5)	50 (41,7)
DRB1*04	15 (8,8)	19 (15,8)	DQA1*02	18 (10,6)	21 (17,5)
DRB1*07	18 (10,5)	21 (17,5)	DQA1*03	18 (10,6)	20 (16,7)
DRB1*08	11 (6,5)	06 (5,0)	DQA1*04	09 (5,2)	06 (5,0)
DRB1*09	02 (1,2)	02 (1,7)	DQA1*05	56 (32,9)	23 (19,1) ^b
DRB1*10	01 (0,6)	03 (2,5)	DQB1		
DRB1*11	31 (18,2)	06 (5,0) ^a	DQB1*02	39 (22,9)	31 (25,8)
DRB1*12	03 (1,8)	02 (1,7)	DQB1*03	54 (31,7)	33 (27,5)
DRB1*13	26 (15,3)	15 (12,5)	DQB1*04	08 (4,7)	06 (5,0)
DRB1*14	04 (2,3)	06 (5,0)	DQB1*05	31 (18,2)	23 (19,2)
DRB1*15	10 (5,8)	14 (11,7)	DQB1*06	38 (22,3)	27 (22,5)
DRB1*16	11 (6,5)	05 (4,2)			
TOTAL	170	120	TOTAL	170	120

^a $P = 0,0016$ (Qui quadrado com correção de Yates); $P_c = 0,0208$; OR= 0,23; IC 95%= 0,09 - 0,58

^b $P = 0,013$ (Qui quadrado com correção de Yates); $P_c = 0,065$ (Correção de Bonferroni); OR= 0,48; IC 95%= 0,27 - 0,84;.

Tabela III. Frequência alélica HLA de classe I nos 85 pacientes sem fibrose ou com fibrose leve a moderada (F0-F2) e nos 60 pacientes com fibrose avançada ou cirrose (F3-F4).

HLA-A			HLA-B			HLA-C		
Alelos	F0-F2 n (%)	F3-F4 n (%)	Alelos	F0-F2 n (%)	F3-F4 n (%)	Alelos	F0-F2 n (%)	F3-F4 n (%)
A*01	24 (14,1)	16 (13,3)	B*07	11 (6,5)	8 (6,7)	C*01	4 (2,3)	2 (1,7)
A*02	35 (20,5)	42 (35) ^a	B*08	11(6,5)	9 (7,5)	C*02	6 (3,5)	2 (1,7)
A*03	12 (7,1)	14 (11,7)	B*13	7 (4,1)	1 (0,8)	C*03	15 (8,8)	8 (6,7)
A*11	7 (4,1)	7 (5,8)	B*14	12 (7,1)	11 (9,2)	C*04	27 (15,8)	21 (17,5)
A*23	10 (5,8)	1 (0,8) ^b	B*15	9 (5,2)	6 (5,0)	C*05	13 (7,6)	14 (11,7)
A*24	21 (12,3)	8 (6,7)	B*18	10 (5,8)	10 (8,3)	C*06	16 (9,4)	9 (7,5)
A*25	2 (1,2)	0	B*27	3 (1,8)	1 (0,8)	C*07	38 (22,3)	27 (22,5)
A*26	10 (5,8)	3 (2,5)	B*35	24 (14,1)	15 (12,5)	C*08	9 (5,2)	11 (9,2)
A*29	11 (6,4)	6 (5,0)	B*37	3 (1,7)	1 (0,8)	C*12	15 (8,8)	4 (3,3)
A*30	8 (4,7)	5 (4,2)	B*38	5 (2,9)	1 (0,8)	C*14	1 (0,6)	4 (3,3)
A*31	9 (5,2)	2 (1,7)	B*39	4 (2,3)	3 (2,5)	C*15	10 (5,8)	6 (5,0)
A*32	5 (2,9)	5 (4,2)	B*40	6 (3,5)	3 (2,5)	C*16	6 (3,5)	7 (5,8)
A*33	5 (2,9)	2 (1,7)	B*41	5 (2,9)	4 (3,3)	C*17	7 (4,1)	4 (3,3)
A*34	0	1 (0,8)	B*42	2 (1,2)	0	C*18	3 (1,7)	1 (0,8)
A*66	0	2 (1,7)	B*44	19 (11,2)	18 (15)	TOTAL	170	120
A*68	9 (5,2)	5 (4,2)	B*45	2(1,2)	1 (0,8)			
A*74	2 (1,2)	1 (0,8)	B*49	5 (2,9)	3 (2,5)			
TOTAL	170	120	B*50	1 (0,6)	3 (2,5)			
			B*51	13 (7,6)	13 (10,8)			
			B*52	3 (1,8)	0			
			B*53	2 (1,2)	4 (3,3)			
			B*54	1 (0,6)	0			
			B*55	4 (2,3)	2 (1,7)			
			B*56	1 (0,6)	0			
			B*57	4 (2,3)	3 (2,5)			
			B*58	1 (0,6)	0			
			B*81	2 (1,2)	0			
			TOTAL	170	120			

^a $P = 0,009$ (Qui quadrado com correção de Yates); $Pc = 0,153$ (Correção de Bonferroni); $OR = 2,07$; $IC\ 95\% = 1,24-3,52$).

^b $P = 0,029$ (Teste exato de Fisher); $Pc = 0,493$; $OR = 0,13$; $IC\ 95\% = 0,01-1,06$.

Artigo: *KIR* GENES AND THEIR HLA LIGANDS IN THE PROGRESSION TO CIRRHOSIS IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS C

TITLE: *KIR* genes and their HLA ligands in the progression to Cirrhosis in patients with Chronic Hepatitis C

Amanda Vansan Marangon¹, Giovanni Faria Silva², Camila Fernanda Verdichio de Moraes³, Ana Maria Sell¹, Rejane Maria Tomasini Grotto³, Maria Inês de Moura Campos Pardini³, Dayse Sousa de Pauli⁴, Jeane Eliete Laguila Visentainer¹, Ricardo Alberto Moliterno¹.

¹ Immunogenetics Laboratory, Basic Sciences Department , Maringá State University, UEM, Maringá-PR, Brazil.

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

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

⁴ Londrina Clinical Hospital, Londrina State University, UEL, Londrina-PR, Brazil.

CORRESPONDENCE

Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Universidade Estadual de Maringá
Laboratório de Imunogenética
Departamento de Ciências Básicas da Saúde
Av. Colombo, 5790
Maringá, PR 87020-900
Brazil
Tel: +55 44 3011 4864
Fax: +55 44 3011 4931
e-mail: ramoliterno@uem.br

ABSTRACT

Natural killer (NK) cells play pivotal roles in immune responses against infection with viruses such as hepatitis C virus (HCV) and killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) are related to the activation and inhibition of NK cells. The aim of this study was to investigate the possibility that *KIR* genes and HLA ligands influence progression to cirrhosis in patients infected with hepatitis C. A total of 145 Brazilian patients with confirmed chronic hepatitis C were evaluated. Genotyping of *KIR* and human leukocyte antigen (HLA) genes was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific oligonucleotide probes. The HLA-C2 ligand was more frequent in patients than healthy controls (74.5% vs 64.3% $P=0.04$; OR= 1.6; 95%IC=1.03-2.52 respectively). The HLA-C1C2 genotype was more frequent in the patients with advanced fibrosis or cirrhosis (F3-F4 group) than F0-F2 group (61.6% vs 44.7% $P=0.06$ respectively), and also was more frequent in the F4 group than F0-F3 group (65.7% vs 46.7%; $P=0.05$; OR=2.19; 95%IC=1.01-4.73 respectively). The contribution of NK and KIR to the development of liver damage in patients chronically infected has to be further investigated.

KEYWORDS

NK cells, HLA, KIR, Hepatitis C, liver fibrosis.

ABBREVIATIONS

KIR Killer immunoglobulin-like receptor

HCV Hepatitis C virus

HLA Human leukocyte antigen

HIV Human immunodeficiency virus

HBV Hepatitis B virus

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV), first described in 1989, is a human hepatotropic virus that belongs to the *Flaviviridae* family [1,2]. Most patients with HCV infection progress to chronic disease, which can lead to liver fibrosis and the subsequent occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma [3].

Several studies have demonstrated that the immunological response to HCV infection involves both the innate and adaptive immune systems; however, the mechanisms responsible for the onset and progression of hepatic lesions during chronic hepatitis C are not fully understood. Natural killer cells (NK) are crucial components of innate response and accumulated evidence suggests that NK cells play an important role not only in host defense against pathogens in the liver but also in liver injury and repair [6-8].

The function of NK cells is regulated by a fine balance of inhibitory and activating signals, which are mediated by a diverse array of cell-surface receptors which include the killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) [6,9]. These receptors can inhibit or activate NK cells and the difference between both is mainly in the intracytoplasmatic tail. The inhibitory receptors have a long tail with an immunoreceptor tyrosine inhibitory motif, whereas the activating receptors have a short tail without this motif but with the capacity to interact with activating adaptor proteins such as DAP12 [10,11]. The KIRs specifically recognize human leukocyte antigen

(HLA) class I present on target cells, and Bw4 and distinct allotypes of HLA-C (C1 and C2 groups) are the predominant ligands for most KIR [12].

In humans, KIRs are encoded by a cluster of genes located in the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. At least 15 *KIR* genes have been thus far characterized, of which 9 are NK cell inhibitory (*KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *2DL4*, *2DL5A*, *2DL5B*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3*), 6 are activating (*KIR2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5*, *3DS1*), and 2 are pseudogenes (*KIR2DP1*, *3DP1*) [13,14]. Based on the genetic content and pattern of segregation at the population level, *KIR* haplotypes are divided into two groups, A and B, which differ in number and kind of *KIR* genes. Common to both groups of haplotypes are the ‘framework genes’: *KIR3DL2*, *3DP1*, *2DL4*, and *3DL3* [13-15].

Recently, studies have shown the important influence of *KIR* genes and ligands favoring the viral clearance in HCV infection, [16,17] but little is known on the role of these genes in liver damage and progression to cirrhosis in patients chronically infected. The aim of the present study was therefore to investigate the *KIR* genes and HLA ligands and their possible association with progression of hepatitis C.

MATERIALS AND METHODS

Study population

In the period of 2004, September to 2009, January were collected samples of 761 patients infected by the HCV attended at Internal Medicine Department, Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, SP, Brazil (22°53'09" S; 48°26'42" W). The patients were carefully selected and from those, only 145 unrelated patients were included in this study. Inclusion criteria were: the presence of chronic hepatitis C with persistence of RNA-

HCV in the serum confirmed by molecular assays and by liver biopsies, and infection only by the genotype 1. A total of 616 patients were excluded of this study by the following exclusion criteria: human immunodeficiency virus (HIV) positive serology or hepatitis B virus (HBV) co-infection, presence of other hepatic diseases, presence of other virus genotypes and history of antiviral therapy before liver biopsy.

In Addition, 289 unrelated healthy individuals from Southern Brazil, more precisely from the north and the northwest area of the state of Paraná (N/NW Paraná) registered as bone marrow donors by the Maringá Regional Hemocenter (Rudinick et al., 2008) were used as control and were compared to HCV patients (case-control study). The Brazilians form one of the most heterogeneous populations in the world and, at an individual level, skin color and physical evaluation is a poor predictor of genomic African ancestry [20]. So the individuals were considered to be a mixed ethnic group. The study protocol was approved by the Ethics Committee for Research Involving Human Beings of the Maringa State University, Maringá, Paraná, Southern Brazil, and all subjects provided written consent to participate in the study.

Liver biopsy

The biopsies in all patients were carried out using the technique of Menghini or with Tru-Cut needle to determine the degree of fibrosis and progression of infection. The fragments were analyzed when at least eight portal spaces were present and were stained with hematoxylin and eosin, masson trichrome and reticulin stain. The hepatic biopsies were analyzed by a pathologist using the METAVIR score: F0 - no fibrosis, F1 - portal fibrosis without septa, F2 - portal fibrosis and few septa, F3 – numerous septa without cirrhosis and F4 – cirrhosis [18]. The patients were stratified into two subgroups according to the fibrosis stage: absence of fibrosis or mild fibrosis (F0-F2, n=85) and advanced fibrosis or cirrhosis (F3-F4, n=60).

HCV Genotyping

The HCV genotype was defined by the reverse line probe assay (INNOLIPA® v.1.0, Innogenetics, Ghent, Belgium) according to the manufacturer's instructions. This genotyping was preceded by the extraction of RNA viral present in the plasma of the patient, followed by a *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (*Amplicor HCV test*, version 2.0, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ), according to the manufacturer's instructions.

DNA extraction Genomic DNA was isolated from 250uL of peripheral blood using NeoIsocolumn Kit (One Lambda Inc., San Diego, CA) or purelink® (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions.

KIR and HLA class I genotyping

The following *KIR* genes: *KIR2DL1*, *KIR2DL2*, *KIR2DL3*, *KIR2DL4*, *KIR2DL5*, *KIR3DL1*, *KIR3DL2*, *KIR3DL3*, *KIR2DS1*, *KIR2DS2*, *KIR2DS3*, *KIR2DS4*, *KIR2DS5*, *KIR3DS1*, *KIR2DP1* and *KIR3DP1* and the HLA class I (HLA-A,- B,- C) were genotyped by polymerase chain reaction with sequence specific oligonucleotide probes protocols (PCR-SSO) using the Luminex 100 xMAP flow cytometry dual-laser system (One Lambda Inc.), followed by flow analysis using a LABScan_ 100 flow analyzer.

KIR2DS4

The two major full-length subtype and deleted forms of *KIR2DS4* also were analyzed by PCR-SSO. The doubtful result samples were confirmed by an in house polymerase chain reaction with sequence specific primers (PCR-SSP). The specific primers for the gene *KIR2DS4* were made according to the recommendations of Martin *et al.* [19]. After PCR processing, the amplified DNA fragments were separated by 2,5% agarose gel electrophoresis for 30 minutes at 70 Volts, and subsequently, for 2

hours at 100 Volts. The primer pairs amplified a 219-bp product in exon 5 if the full-length gene was present and a 197-bp product if the deletion variant was present.

Statistical analysis

KIR and *KIR*-HLA ligand frequencies were obtained by direct counting. To compare the distribution of frequencies the data were organized in contingency tables, and the values were compared using a Chi-square with Yates correction or Fisher's exact test. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (95% CI) were also calculated. The analyses were carried out using SISA online statistics (<http://home.clara.net/sisa/two2hlp.htm>). *P* values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Patients' characteristics

The patients' characteristics relative to age, gender, risk factors, duration of infection and degrees of fibrosis according to METAVIR score are summarized in table 1.

***KIR* genes and HLA ligands frequencies**

First, the patients were stratified into individuals with absence of fibrosis or mild fibrosis (F0-F2, n=85) and individuals with advanced fibrosis or cirrhosis (F3-F4, n=60) and the comparison of *KIR* genes and HLA ligands was evaluated between F0-F2 and F3-F4. Next, the patients with cirrhosis (F4 stage, n=38) were separated and compared with patients without cirrhosis (F0-F3 stage, n=107). Furthermore, all patients were compared with unrelated healthy controls.

The HLA class I allele ligands of *KIR* (HLA C1, C2, Bw4 and A3/A11) were analyzed in all groups. The HLA-C2 was more frequent in the patients than in healthy controls (74.5% vs 64.3% *P*= 0.04; OR= 1.6; 95%CI=1.03-2.52 respectively). The HLA C1 and C2 ligand genotypes were also analyzed and the heterozygote HLA-C1C2

genotype showed a trend being more frequent in the F3-F4 group when compared with the F0-F2 group (61.6% vs 44.7%; $P=0.06$, OR 1.98, IC 1.02-3.9 respectively). It was also more frequent in the patients with liver cirrhosis (F4) when compared with patients without cirrhosis (F0-F3) (65.7% vs 46.7%; $P=0.05$; OR=2.19; 95%IC=1.0-4.7 respectively). The frequency distribution of HLA ligands genotypes is shown in figure 1.

The Bw4 molecules were divided into two groups on the basis of whether isoleucine or threonine was present at position 80 (Bw4-80Ile and Bw4-80Thr, respectively) and were analyzed in all patients and controls. The Bw4-80Ile showed a trend being less frequent in the group with liver cirrhosis (F4) when compared with the patients without cirrhosis (39.5% vs 56.1%, $P=0.09$; OR=0.51; 95%IC=0.24-1.0) (dates not shown).

With respect to *KIR* genes, no association between the 16 *KIR* genes and susceptibility to HCV, progression to fibrosis or cirrhosis was observed. Likewise, the distribution of *KIR2DS4* forms (the full-length gene, the deletion variant or both) was similar in all groups and the deleted variant of *KIR2DS4* was the most frequent in all groups. Although the difference did not reach statistical significance, in the analysis of *KIR2DL2* and *KIR2DL3* homozygotes and heterozygotes was observed a low frequency of the *KIR2DL3/KIR2DL3* genotype in F3-F4 group (46.7%) when compared with F0-F2 group (57.7%) (dates not shown).

In the analysis of the interactions between activating and inhibitory *KIR* loci and HLA class I ligands (*KIR2DL1* and its ligand C2; *KIR2DL2* with C1; *KIR2DL3* with C1; *KIR3DL1* with Bw4; *KIR3DL1* with Bw4-80Ile; *KIR3DL1* with Bw4-80Thr; *KIR3DL2* with A3 and/or A11; *KIR2DS1* with C2; *KIR2DS2* with C1; *KIR3DS1* with

Bw4; *KIR3DS1* with *Bw4-80Ile* and *KIR3DS1* with *Bw4-80Thr*) none receptor-ligand pair was associated with susceptibility or progression of disease.

Furthermore patients were identified as KIR AA, AB, or BB haplotypes on the basis of the multiple *KIR* genes they possessed. The KIR AA was the most frequent haplotype in all groups (33.1% in total of patients, 39.2% in F3-F4 group, 33.3% in F0-F2 group, 34.2 in F4 group, 32,7% in the F0-F3 group and 33.2% in the unrelated healthy controls), but no significant differences in the distribution of haplotypes frequencies were observed.

DISCUSSION

Mortality associated with chronic hepatitis C results mainly from the development of liver fibrosis and the subsequent occurrence of cirrhosis with complications such as hepatocellular carcinoma [3]. It has been shown that there is no relationship between viral load or genotype and fibrosis. Nevertheless, evidences suggest that host immune factors, were ones that correlate with fibrosis progression in HCV. [21,22].

The NK cells represent a fundamental component of the innate immune system. The repertoire of NK cells is extensive in the liver [23] and cytolytic activity seems to have an inverse association with liver fibrosis stage, suggesting that the presence of cytolytic active peripheral NK cells may be protective against liver disease progression [24]. NK cells likely to play pivotal roles in immune responses against hepatitis C virus infection and the KIRs are the major group of receptors that modulated NK function.

An important association seems to involving *KIR2DL3* gene. Romero *et al.* [25] reported an association between *KIR2DL3/2DL3* and its ligand HLA-C1/C1 and spontaneous HCV clearance. Khakoo *et al.* [16] also suggested that the genotypic

combination of *KIR2DL3* with HLA-C1 was protective in terms of spontaneous clearance of the virus in individuals infected with low-dose viral inoculums. They hypothesized that this KIR-ligand pair could be protective because it had a weak inhibitory function that was easily overridden by activating signals. In the hierarchy of KIR2DL-molecule-mediated inhibition, *KIR2DL3*/HLA-C1C1 appears to confer weaker inhibitory responses, while *KIR2DL1* with C2C2 is at the top of the list of the genes with the highest inhibitory power [26].

Khakoo *et al.* [16] also demonstrate that *KIR2DL2* seems to counteract *KIR2DL3*/HLA-C1C1 protection. Another study found the presence of *KIR2DL2* associated with viral clearance [27]. A recent study with intravenous drug users found a significant association between the presence of the inhibitory receptors *KIR2DL2* and/or *KIR2DL3* and the HLA-C1 homozygous genotype together with the activating receptor *KIR2DS4* in the protection from HCV infection [28].

It has become clear that the *KIR* genes and the strength of HLA-KIR interactions has functional significance and can influence disease susceptibility and all these observations suggest that NK activation enhances HCV clearance.

Most studies analyzed *KIR* genes and viral clearance; however there were no studies that analyzed *KIR* genes and progression of the disease and liver damage in chronically infected patients. In the present study the patients were carefully selected to form a homogeneous group in terms of HCV genotype and absence of viral co-infections. The data did not show any significant association at 5% level between inhibitory or activating KIR and susceptibility to HCV, progression to fibrosis or cirrhosis. Nonetheless, the frequency of the genotype *KIR2DL3*/*KIR2DL3* was higher in F0-F2 group (57.7%) when compared with F3-F4 group (46.7%). This was observed only for *KIR2DL3*/*KIR2DL3* but not for *KIR2DL3*/HLA-C1 interaction (the frequencies

of *KIR2DL3/KIR2DL3* with HLA-C1 were similar in both groups). Although the statistical power of the study was insufficient to confirm this association, the result might be an indication that *KIR2DL3* homozygote genotype can be important not only for spontaneous clearance, as previously observed, but also for protection against liver disease injury and must be better investigated.

With respect to the distribution of HLA-C ligands, the HLA-C2 was more frequent in the patients than in healthy controls (74.5% vs 64.3% $P= 0.04$; OR= 1.6; 95%IC=1.03-2.52 respectively). Khakoo *et al.* [16] reported a higher frequency of HLA-C2C2 genotype among patients with persistent infection and a higher frequency of HLA-C1C1 in individuals with resolved infection. The HLA-C2C2 and HLA-C1C1 genotypes did not show association, however the heterozygote HLA-C1C2 genotype was more frequent in individuals with advanced fibrosis or cirrhosis when compared with patients without fibrosis or mild fibrosis (61.6% vs 44.7%; $P=0.06$, OR 1.98, IC 1.0-3.9 respectively) and more frequent in cirrhotic patients than non cirrhotic (65.7% vs 46.7%; $P= 0.05$; OR=2.19; 95%IC=1.0-4.7 respectively). The finding that heterozygosity for the HLA-C1 and C2 genotype may be important in the disease may reflect the particularly delicate balance in immune responsiveness in the patients chronically infected. With respect to the HLA-B Bw4 ligands a trend towards a higher frequency of Bw4-80Ile in patients without liver cirrhosis was observed. (data not shown).

Several case/control studies have reported an association between the presence/absence of specific KIRs and disease progression following infection with some oncogenic viruses [29]. The activating receptor *KIR3DS1* was found significantly more frequent in cervical intraepithelial neoplasia 3 (CIN/3) cancer cases in comparison to healthy controls [30]. Conversely, in HIV infection, it was described a significant

association between *KIR3DS1* and HLA-Bw4 alleles with protection from AIDS progression [31]. Recently, López-Vázquez *et al.* [32] in a research realized in Spain, found that the HLA-B Bw4-80Ile epitope and the *KIR3DS1* gene had a protective effect against the development of hepatocellular carcinoma in patients infected with hepatitis C, especially in those with minimal liver damage. In contrast, Paladino *et al.* [17] found an increased frequency of two copies of *KIR3DS1* and HLA-Bw4 in cirrhotic patients infected with hepatitis C. These finds suggest that *KIR3DS1* seems to be important on the progress of infectious diseases; however the results are still contradictories. In the present study no associations were found between *KIR3DS1*/ HLA-Bw4 genotypes and the progression of HCV infection.

CONCLUSION

Significant association with *KIR* genes to cirrhosis progression in patients with chronic hepatitis C was not found, although *KIR2DL3/KIR2DL3* genotype was more frequent in F0-F2 patients, HLA-C2 was more frequent in patients than healthy controls, HLA B Bw480Ile was more frequent in non cirrhotic patients and HLA C1C2 genotype was more frequent in F3-F4 and F4 patients. The contribution of NK and KIR to the development of liver damage in chronically infected patients have to be further investigated, mainly in large cohorts.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank all the volunteers who were part of this study. This work was supported in part by Capes, CNPq and The Brazil Health Ministry.

REFERENCES

- [1] Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-a, non-b viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–362.
- [2] Trepo C, Vierling J, Zeytin FN, Gerlich WH. The First Flaviviridae Symposium. *Intervirology* 1997;40:279–88.

- [3] Thomas DL, Seef LB. Natural history of hepatitis C. *Clin Liver Dis* 2005; 9:383–398.
- [4] Rehermann. 2000. Interaction between the Hepatitis C virus and the immune system. *Sem Liver Dis* 20(2):127-141.
- [5] Thio Cl, Gao X, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, et al. 2002. HLA-C*04 And Hepatitis C Virus Persistence. *J Virol* 76: 4792–4797.
- [6] Yamagiwa S, Kamimura H, Ichida T. Natural killer cell receptors and their ligands in liver diseases. *Med Mol Morphol* 2009;42:1–8.
- [7] Gao B, Jeong W, Tian Z. Liver: An Organ with Predominant Innate Immunity. *Hepatol* 2008;47:729-736.
- [8] Notas G, Kisseleva T, Brenner D. NK and NKT cells in liver injury and fibrosis. *Clin Immunol* 2009;130:16–26.
- [9] Carwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1:41–49.
- [10] Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 1998;391:703–7.
- [11] Carrington M., Norman P. The Kir Gene Cluster. 2003. Disponível Em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bookres.fcgi/Mono_003/Ch1d1.Pdf> Acesso Em 12 De Agosto De 2008.
- [12] Winter CC, Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 1998;161(2):571–7.
- [13] Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyman D, Lanier LL, Parham P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor. *Genes Immun* 1997;7:753–763
- [14] Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B. Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol* 2002;169:5118–29
- [15] Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT. The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics* 2000;51:268–80
- [16] Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-874.

- [17] Paladino N, Flores AC, Marcos CY, Fainboim H, Theiler G, Arruvito L, Williams F, Middleton D, Fainboim L. Increased frequencies of activating natural killer receptors are associated with liver injury in individuals who do not eliminate hepatitis C virus. *Tissue Antigens* 2007;69(S-I):109-11.
- [18] Bedossa, P. 1993. Presentation of a grid for computer analysis for complication of hispathologic lesions in chronic viral hepatitis C. *Ann Pathol* 13(4):260-5.
- [19] Martin, MP. Tipagem de genes KIR e sua aplicação em estudos de populações, associação com doenças e transplantes. Curso 3. VII Congresso da SBTMO. Curitiba. 2004.
- [20] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and Genomic Ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci Usa* 2003;100:177-82.
- [21] Friedman SL. Liver fibrosis-form bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38:S38-S53.
- [22] Benhamou Y, Di Martino V, Bochet M, Colombet G, Thibault V, Liou A, et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus-and hepatitis C virus-coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. *Hepatol* 2001;34:283-287.
- [23] Crispe IN, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today* 1996;17(11): 522-525.
- [24] Morishima C, Paschal DM, Wang CC, Yoshihara CS, Wood BL, Yeo AET et al. Decreased NK cell frequency in chronic hepatitis C does not affect ex vivo cytolytic killing. *Hepatol* 2006;43(3):573-80
- [25] Romero V, Azocar J, Zúñiga J, Clavijo OP, Terreros D, Gu X, et al. Interaction of NK inhibitory receptor genes with HLA-C and MHC Class II alleles in hepatitis C virus infection outcome. *Mol Immunol* 2008;45:2429-2436
- [26] Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Sem Immunol* 2008;20:343-352.
- [27] Montes-Cano MA, Caro-Oleas JL, Romero-Gómez M, Diago M, Andrade R, carmona I, et al HLA-C and KIR Genes in Hepatitis C Virus Infection. *Hum Immunol* 2005;66:1106-1109.
- [28] Zúñiga J, Romero V, Azocar J, Terreros D, Vargas-Rojas MI, Torres-García D et al. Protective KIR-HLA interactions for HCV infection in intravenous drug users. *Mol Immunol* 2009;46:2723-2727
- [29] Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M. The Killer Immunoglobulin-like Receptor Gene Cluster: Tuning the Genome for Defense. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;7:277-300.

[30] Carrington M, Wang S, Martin MP, Gao X, Schiffman M, Cheng J, Herrero R, Rodriguez AC, Kurman R, Mortel R et al. Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med* 2005;201:1069-1075.

[31] Martin MP, Gao XJ, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002; 31:429–434.

[32] Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Martínez-Borra J, Pérez R, Rodríguez M, Fdez-Morera JL, Protective Effect of the HLA-Bw4I80 Epitope and the Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor 3DS1 Gene against the Development of Hepatocellular Carcinoma in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *J Infec Dis* 2005; 192:162–5

TABLES

Table 1 Clinical and demographic features of patients with chronic hepatitis C attended in the Department of Internal Medicine, Gastroenterology Division, Botucatu Medical School, to September of 2004 to January of 2009, N=145.

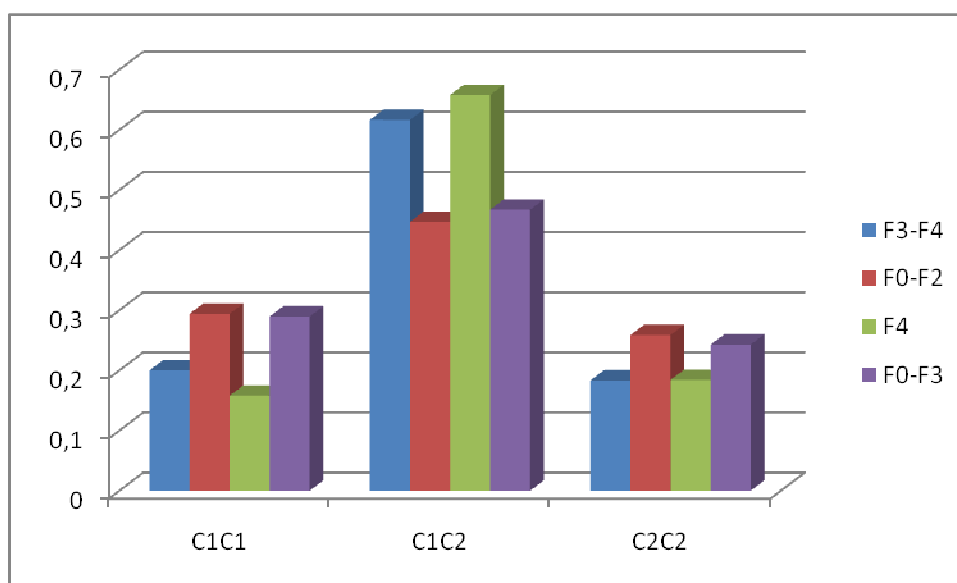
PARAMETROS CLÍNICOS	Pacientes N=145	F0-F2 N=85	F3-F4 N=60	F4 N=38
Idade (média ± SD)	43,4±10,4	39,8±9,3	48,6±9,8	50,0±9,53
Sexo n (%)				
Masculino	112 (77,3)	67 (78,8)	45 (75,0)	17 (71,1)
Feminino	33 (22,7)	18 (21,2)	15 (25,0)	11 (28,9)
Fatores de Risco n (%)				
Transusão	36 (24,8)	17 (20,0)	19 (31,7)	10 (26,3)
Uso de drogas injetáveis	24 (16,6)	22 (25,9)	2 (3,3)	2 (5,3)
Uso de gluconergan	22 (15,2)	10 (11,7)	12 (20,0)	6 (15,8)
Uso de cocaína inalada	5 (3,4)	2 (2,4)	3 (5,0)	3 (7,9)
*Outros	58 (40,0)	34 (40,0)	24 (40,0)	17 (44,7)
**Tempo de infecção (média ± SD)	21,8±8,3	19,2±6,9	25,7±8,7	27,8±9,6
***Classificação METAVIR n (%)				
F0	7 (4,8)	7 (8,2)	-	-
F1	43 (29,7)	43 (50,5)	-	-
F2	35 (24,1)	35 (41,2)	-	-
F3	22 (15,2)	-	22 (36,7)	-
F4	38 (26,2)	-	38 (63,3)	38 (100)

*Tattoo, surgeries, occupational exposition, homosexuals or promiscuous sexual behavior and unknown risk factor.

**Duration of infection was calculated only for 90 patients (F0=4, F1=25, F2=24, F3=16 and F3=21) to 55 patients the duration of infection is unknown.

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

Figure 1 HLA-C ligand (C1,C2) genotype frequencies in the patients with chronic hepatitis C.



F3-F4 (advanced fibrosis or cirrhosis) vs F0-F2 (absence of fibrosis or mild fibrosis)
F4 (cirrhosis) vs F0-F3 (absence of cirrhosis).

Artigo: “INFLUÊNCIA DOS ALELOS HLA DE CLASSE I E II NA RESPOSTA AO TRATAMENTO COM INTERFERON ALFA PEGUILADO E RIBAVIRINA EM PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”

Título: Influência dos alelos HLA de classe I e II na resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilaado e Ribavirina em pacientes com hepatite C crônica

Amanda Vansan Marangon¹, Giovanni Faria Silva², Camila Fernanda Verdichio de Moraes³, Rejane Maria Tomasini Grotto³, Maria Inês De Moura Campos Pardini³, Dayse Sousa De Pauli⁴, Ana Maria Sell¹, Ricardo Alberto Moliterno¹.

¹ Immunogenetics Laboratory, Department of Clinical Analysis, Maringá State University, UEM, Maringá-PR, Brazil.

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

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

⁴ Clinical Hospital of Londrina, Londrina State University, UEL, Londrina-PR, Brazil.

PALAVRAS-CHAVE: HLA, hepatite C, Interferon, Ribavirina

CORRESPONDÊNCIA

Dr. Ricardo Alberto Moliterno
Laboratório de Imunogenética
Departamento de Análises Clínicas
Universidade Estadual de Maringá Av. Colombo, 5790
Maringá, PR 87020-900
Brazil
Tel: +55 44 3011 4864
Fax: +55 44 3011 4931
e-mail: ramoliterno@uem.br

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar a influência dos alelos HLA em portadores crônicos do vírus da hepatite C, e analisar o possível papel desses genes na resposta ao tratamento com interferon-alfa peguilaado mais ribavirina. Para tanto, 144 pacientes brasileiros infectados com o genótipo 1 do vírus foram tratados com Interferon-alfa peguilaado na dose de 1,5ug/Kg em associação com Ribavirina na dose de 1000mg, se peso menor que 75Kg, e 1250mg, se peso maior que 75Kg, por 48 semanas. Os pacientes não possuíam infecções concomitantes pelo HBV e HIV e/ou doenças hepáticas, não realizaram tratamento antiviral prévio e foram acompanhados por mais de 6 meses após término do tratamento para garantir a resposta virológica sustentada. Os pacientes foram classificados de acordo com a resposta ao tratamento em respondedores, não respondedores e recidivantes. As tipificações dos alelos HLA de classe I e classe II foram realizadas pela técnica de PCR-SSO, plataforma Luminex. Foi encontrada associação entre resposta virológica sustentada e o alelo DQB1*03 (62,3% vs 40,6% $P=0,03$; OR=2,4; 95% IC=1,14-5,0). Conclui-se que os antígenos HLA podem influenciar positivamente a resposta ao tratamento com interferon-alfa peguilaado e ribavirina.

INTRODUÇÃO

A combinação de Interferon convencional ou peguilado mais Ribavirina ministrado por 24 ou 48 semanas respectivamente, é o tratamento de escolha para pacientes com hepatite C.^{1,2} O principal objetivo da terapia é a erradicação do vírus, porém, as taxas de resposta ao tratamento variam bastante entre os indivíduos infectados. A eficácia na terapia depende de diversos fatores virais e individuais. Entre os fatores relacionados ao vírus, o genótipo viral parece ser o mais importante, no qual indivíduos infectados com os genótipos 2 e 3 adquirem resposta virológica sustentada (RVS) em 76 a 82% dos casos; já nos indivíduos infectados com genótipo 1, a RVS é alcançada somente em aproximadamente 42-46% dos casos.^{1,3}

Desde que o tratamento com Interferon-alfa e Ribavirina envolve a resposta imune do hospedeiro e as moléculas HLA são proteínas importantes na ativação e apresentação de antígenos aos linfócitos T,^{4,5} parece interessante avaliar se os genes HLA influenciam a resposta ao tratamento. Os alelos HLA têm sido notadamente associados à eliminação viral espontânea e a proteção a progressão da hepatite C.⁶⁻¹¹ Quanto à resposta ao tratamento, alguns estudos têm sido realizados, porém com dados ainda inconsistentes, com amostras heterogêneas, e escassos em populações brasileiras. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência dos alelos HLA de classe I e II na resposta ao tratamento com terapia combinada de Interferon-alfa peguilado e Ribavirina em pacientes infectados cronicamente com o genótipo 1 do VHC.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Seleção dos pacientes

No período de Setembro de 2004 a Janeiro de 2009 (± 5 anos e 4 meses) foram coletadas amostras de 761 pacientes infectados pelo vírus da hepatite C atendidos no Departamento de Medicina Interna -Divisão de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, Botucatu, SP, Brasil (22°53'09" S; 48°26'42" W). Os pacientes foram criteriosamente selecionados, sendo incluídos apenas 144 pacientes no estudo. Os critérios de inclusão foram: presença de infecção crônica por VHC caracterizada pela persistência de VHC-RNA no soro por testes moleculares e por biópsia de fígado, e infecção somente pelo genótipo 1 do vírus da hepatite C. Os outros 616 pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem sorologia positiva para o vírus da hepatite B (HBV) ou para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), presença de outras doenças hepáticas, presença de outros genótipos do vírus e/ou tratamento antiviral prévio. As informações clínicas dos pacientes foram coletadas do prontuário do paciente. O protocolo de estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual Paulista, Botucatu e todos os pacientes selecionados assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Tratamento

O tratamento dos pacientes foi realizado com Interferon-alfa peguilado na dose de 1,5ug/Kg em associação com Ribavirina na dose de 1000mg, se peso menor que 75Kg, e 1250mg, se peso maior que 75Kg. Todos os pacientes realizaram tratamento por 48 semanas e foram acompanhados por mais de 24 semanas após término do tratamento para garantir a resposta virológica sustentada (RVS). Os pacientes que não seguiram corretamente o protocolo de medicação foram excluídos do estudo. Os pacientes foram classificados em 3 grupos de acordo com a resposta ao tratamento. O primeiro grupo (RVS) foi formado por 53 pacientes com resposta virológica sustentada (pacientes com RNA viral indetectável 24 semanas após o término do tratamento); o

segundo grupo foi constituído por 64 pacientes não respondedores (NRS) com RNA viral detectável na 48ª semana de tratamento; e o terceiro grupo foi formado por 27 pacientes denominados recidivantes (REC; pacientes que apresentaram RNA viral indetectável na 48ª semana, porém na 12ª ou 24ª semana pós término do tratamento apresentaram RNA viral no soro).

Genotipagem do VHC

A genotipagem do VHC foi definida pela técnica *reverse line probe assay* (INNOLIPA® v.1.0, Innogenetics, Ghent, Belgium), segundo as instruções do fabricante. Essa genotipagem foi precedida pela extração do RNA viral presente no plasma do paciente, seguida de uma *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), realizadas pelo kit *Amplicor VHC test* version 2.0 (Roche Diagnostic Systems, Branchburg, N.J), também seguindo as instruções do fabricante.

Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 250uL de sangue venoso periférico coletado em tubo contendo EDTA, utilizando o kit NeoIsocolumn (One Lambda Inc., San Diego, CA) de acordo com as instruções do fabricante.

Tipagem HLA

Após o ajuste da concentração, as tipagens dos alelos HLA (HLA-A*, -B*, -C*, -DRB1*, -DQA1* e -DQB1*) foram realizadas pela técnica *polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides* (PCR-SSO, One Lambda®, Canoga Park, CA, USA), na qual o produto amplificado foi hibridizado com microesferas ligadas a sondas específicas para os alelos HLA (One Lambda®, Canoga Park, CA, USA). As leituras das reações foram realizadas em um citômetro de fluxo que utiliza a tecnologia Luminex (One Lambda®), a qual por meio de lasers detecta qual pérola (ligada a uma sonda) se

ligou ao DNA amplificado, e organizadas pelo programa de computador Labscan[®]. As amostras foram analisadas pelo programa (programa HLA Fusion[™], One Lambda).

Estatística

As comparações das frequências alélicas, obtidas por contagem direta, foram analisadas em tabelas de contingência pelo teste do qui-quadrado com correção de Yates e/ou pelo Teste de Fisher quando necessário. Valores de *Odds Ratio* com 95% de intervalo de confiança também foram calculados. Quando necessário os valores de *P* significativos ($P < 0,05$) foram corrigidos para o número de alelos encontrados em cada loco (*P_c*; Correção de Bonferroni). As análises estatísticas foram realizadas pelo programa *SISA statistics* (<http://home.clara.net/sisa/two2hlp.htm>). A fase gamética dos alelos dos diferentes locos analisados não é conhecida, pois não foi feita análise de segregação em famílias. A determinação dos haplótipos e o cálculo de suas frequências foram realizadas pelo teste de verossimilhança, utilizando o Programa estatístico Arlequin¹².

RESULTADOS

Características dos pacientes

As análises demonstraram que as distribuições das proporções das frequências genotípicas na população estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As características da população de estudo referentes a idade, gênero, fatores de risco e tempo de infecção são apresentadas na Tabela 1.

Alelos HLA de classe II

Comparações entre os alelos HLA de classe II nos 3 grupos demonstrou uma frequência estatisticamente mais alta de DRB1*11 no grupo RVS quando comparada ao grupo NRS (39,6% vs 15,6% $P = 0,0065$; $P_c = 0,0845$, OR=3,54; 95% IC= 1,4-8,4) e ao

grupo REC (39,6% vs 11,1% $P=0,0098$; $P_c=0,1274$; OR= 5,2; 95% IC 1,4-19), porém, após correção de Bonferroni, o valor de P perdeu significância. Além de DRB1*11, o alelo DRB1*13 também foi mais freqüente no grupo RVS que no grupo NRS, embora não estatisticamente significante (37,7% vs 20,3% $P=0,06$). Por outro lado, essa tendência não foi observada quando comparados RVS *versus* REC. Em relação ao loco DQB1, indivíduos com RVS apresentaram freqüências maiores de DQB1*03 que indivíduos NRS (62,3% vs 40,6% $P=0,03$; OR=2,4; 95% IC=1,14-5,0). As freqüências dos alelos HLA de classe II estão apresentadas na Tabela 1.

Alelos HLA de classe I

Pacientes NRS apresentaram baixa freqüência do alelo HLA-A*31 quando comparados com o grupo REC (1,5% vs 14,8% $P=0,02$; OR=0,09; 95% IC=0,009-0,85) e com o grupo RVS (1,5% vs 11,3% $P=0,04$; OR=0,12; 95% IC=0,01-1,0). Porém, após correção de Bonferroni o valor de P perdeu a significância ($P_c=0,34$ e $P_c=0,68$, respectivamente). O grupo de RVS, por sua vez, apresentou uma tendência, de menor freqüência do alelo HLA-C*05 quando comparado com o grupo NRS (9,4 vs 23,4%, $P=0,05$). Não foram encontradas associações entre os alelos do locus HLA-B e os diferentes grupos de resposta ao tratamento (dados não mostrados).

Haplótipos

Em relação aos haplótipos, o haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 foi significativamente mais freqüente em pacientes RVS (37,7%) quando comparados aos NRS (12,5%) ($P=0,003$; $P_c=0,066$; OR=4,24; 95% IC=1,6-10,7). (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Em diversos países da Europa, nos Estados Unidos, na China e na Índia estudos avaliando a distribuição dos genótipos em amostras VHC positivas demonstrou que o genótipo 1 foi responsável pela maioria das infecções.¹³⁻¹⁹ No Brasil, o genótipo 1 do VHC aparece com predominância sobre os genótipos não-1 em algumas regiões.²⁰⁻²² O tratamento com interferon-alfa peguilado mais ribavirina é eficaz nos indivíduos infectados com os genótipos 2 e 3 do vírus da hepatite C, porém a resposta virológica em indivíduos infectados com o genótipo 1 é peculiar, apresentando baixas taxas de RVS.^{1,2} Está claro que fatores virais, como o genótipo, influenciam diretamente a resposta terapêutica. Entretanto, em pacientes que iniciam o tratamento pela primeira vez, os fatores relacionados ao hospedeiro parecem ter papel principal em determinar os resultados da resposta terapêutica.²³ Os Interferons e a Ribavirina, além das propriedades antivirais diretas, possuem também propriedades imunomodulatórias, que contribuem para o efeito antiviral por envolver outras células que não as infectadas.²⁴ Uma das propriedades imunomodulatórias dos interferons tipo I (que incluem o interferon alfa) é a ativação e maturação das células dendríticas, levando a um aumento na expressão de moléculas HLA. Também podem regular várias quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas co-estimulatórias que estimulam a resposta de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e modulam a resposta de linfócitos T por promover a diferenciação em Th1. Assim, a resposta imunológica induzida pela terapia com interferon-alfa peguilado mais ribavirina pode ter influência na eliminação imunológica do vírus.⁴

No presente trabalho, o alelo DRB1*11 foi associado a melhor resposta ao tratamento, sendo mais freqüente no grupo de respondedores quando comparados aos não respondedores e também aos recidivantes porém, após correção de Bonferroni perdeu significância. Diversos estudos têm demonstrado que o alelo HLA-DRB1*11 parece ter influência no curso da hepatite C.²⁶⁻²⁸ Esse alelo tem sido fortemente

associado à eliminação viral espontânea e a maior resistência a desenvolver infecção crônica pelo VHC em diversos países²⁹⁻³⁰. Em relação à influência na resposta ao tratamento, porém, não há muitos relatos. Em um estudo realizado com descendentes de italianos, foram encontradas frequências maiores de DRB1*11 em pacientes com resposta sustentada a monoterapia com interferon-alfa, porém, sem significância estatística.³¹

O alelo DQB1*03 também foi associado positivamente à resposta ao tratamento, sendo mais freqüente no grupo RVS quando comparado ao grupo de NRS. Em um estudo realizado no Reino Unido foi observada associação de DQB1*03 com melhor defesa antiviral em pacientes infectados com VHC e tratados com interferon-alfa mais ribavirina.³² Em outro estudo também foram encontradas altas frequências de DQB1*03 em pacientes com resposta ao tratamento com interferon, porém, sem significância estatística.³³ O alelo DQB1*03 está em forte desequilíbrio de ligação com DRB1*11 e tem sido descrito conjuntamente com DRB1*11 como alelo de associação a eliminação viral espontânea.^{34,35} É interessante ressaltar que o alelo DQB1*03 só se apresentou mais freqüente no grupo de respondedores quando comparado ao grupo de não respondedores, não havendo diferença nas frequências de DQB1*03 entre respondedores (62,2%) e recidivantes (48,1%).

O envolvimento dos alelos HLA nos resultados da infecção pelo VHC na ausência de terapia antiviral é, na maioria das vezes, relacionado à habilidade das moléculas HLA em modular a ativação dos linfócitos T. Desde que a terapia com Interferon também age por estimular linfócitos T, o fato de DRB1*11 e DQB1*03 estarem associados à eliminação viral espontânea e também a melhor resposta ao tratamento é plausível, pois é possível que o perfil genético dos pacientes que

respondem ao tratamento seja provavelmente semelhante ao daqueles pacientes com infecção auto-limitada ou que evoluem para formas mais brandas da doença.

Além destas associações, foi encontrada maior frequência do alelo DRB1*13 nos indivíduos respondedores que nos não respondedores, porém sem significância estatística ($P=0,06$). Contrastante com esse resultado, em um estudo realizado na Turquia com pacientes infectados cronicamente, foi observada associação entre DRB1*13 e não resposta ao tratamento com interferon-alfa-2b.³⁶

Em relação aos alelos HLA de classe I, os indivíduos NRS apresentaram menor frequência do alelo A*31 quando comparado aos indivíduos com RVS e aos recidivantes; porém, após correção de Bonferroni, o valor de P perdeu a significância.

Apesar de terem sido realizados alguns estudos avaliando a influência do HLA na resposta ao tratamento, os resultados são conflitantes. Em um estudo realizado com pacientes japoneses foi observada associação entre o grupo HLA-DR4 e não resposta ao tratamento com interferon-alfa.³⁷ Similarmente, na China encontraram associação de DRB1*04 com não resposta em pacientes infectados com o genótipo 1b do VHC e tratados com Interferon-alfa e ribavirina.³⁸ Em contraste, no Canadá, o alelo DRB1*0404, foi relacionado a melhor resposta ao tratamento com interferon-alfa.³⁹

Quanto aos alelos HLA de classe I, na Croácia foi observada associação de C*07 com RVS a terapia com interferon-alfa.⁴⁰ Em um estudo com pacientes japoneses foi encontrada associação de HLA-B55, B62, Cw3 e Cw4 com melhor resposta ao tratamento com interferon-alfa.⁴¹ Em Taiwan os alelos A*11, B*51, C*15 e DRB1*15 foram relacionados a resposta sustentada ao tratamento com interferon-alfa e, o alelo A*24, a não resposta.⁴² Quanto a haplótipos, o haplótipo DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1-02 foi associado com resposta a interferon-alfa na Polônia.⁴³

Essa ausência de consenso talvez possa ser explicada por variações na metodologia de cada estudo, tais como mistura de genótipos virais nas análises, diferentes critérios ou diagnósticos de resposta ao tratamento, diferenças étnicas, bem como pequeno número de amostras. Além disso, alguns estudos avaliaram pacientes tratados somente com interferon-alfa (monoterapia) enquanto outros avaliaram pacientes tratados com terapia combinada com Ribavirina, e quase não há estudos com o interferon-alfa peguilado mais ribavirina. Por intermédio da literatura consultada, o único trabalho avaliando a influência do HLA em pacientes infectados com vários genótipos do VHC tratados com interferon-alfa peguilado e ribavirina foi realizado em Taiwan recentemente, e encontrou associação de HLA-A*24 e B*40 e os haplótipos B*40-DRB1*03, B*46- DRB1*09, C*01- DQB1*03 e C*01- DRB1*09 com resposta virológica sustentada.⁴⁴

Conclusão

Apesar de nossa investigação também possuir limitações, este trabalho difere dos outros por apresentar indivíduos selecionados de forma restrita, com relação a características virais e individuais e, os quais foram acompanhados cuidadosamente durante e após o tratamento, permitindo avaliar com clareza a influência dos alelos HLA na resposta ao tratamento e inferir que os alelos HLA-DRB1*11 e DQB1*03 e o haplótipo HLA-DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 podem ser fator genético, relacionado a resposta imunológica, importante no desenvolvimento de uma melhor resposta virológica sustentada em pacientes cronicamente infectados pelo genótipo 1 do VHC e tratados com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina por 48 semanas.

REFERÊNCIAS

1. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB, American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C. *Hepatol* 2004;39:1147–1171.
2. Gotto J, Dusheiko GM. Hepatitis C and treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1874–1877
3. Alberti A, Benvegnù, L. Management of hepatitis C. *J Hepatol* 2003;38(S1):104-118.
4. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Interferon-based therapy of hepatitis c advanced drug delivery. *Reviews* 2007; 59:1222–124.
5. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response, *Annu Rev Immunol* 2001;19:65–91.
6. Alric L, Fort M, Izopet J, Vinel JP, Charlet JP, Selves J, et al. Genes of The Major Histocompatibility Complex Class II Influence The Outcome Of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterol* 1997;113:1675–1681.
7. Mckiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald JSA, Nolan N, Crowley J, et al. The MHC Is A Major Determinant Of Viral Status, But Not Fibrotic Stage, In Individuals Infected With Hepatitis C. *Gastroenterol* 2000;118:1124–1130.
8. Fanning LJ, Levis J, Kenny-Walsh E, Wynne F, Whelton M, Shanahan F. Viral Clearance In Hepatitis C (1b) Infection: Relationship With Human Leukocyte Antigen Class II In a Homogeneous Population. *Hepatol* 2000;31:1334–1337.
9. Harris RA, Sugimoto K, Kaplan DE, Ikeda F, Kamoun F, Chang KM. Human Leukocyte Antigen Class II Associations With Hepatitis C Virus Clearance And Virus-Specific CD4 T Cell Response Among Caucasians And African Americans *Hepatol* 2008;48(1):70-79.
10. Kuzushita N, Hayashi N, Moribe T, Katayama K, Kanto T, Nakatani S et al. Influence of HLA Haplotypes On The Clinical Courses Of Individuals Infected With Hepatitis C Virus. *Hepatol* 1998;27:240–244
11. Yasunami R, Miyamoto T, Kanda T. 1997. HLA-DRB1 Is Related To The Pathological Changes Of The Liver In Chronic Hepatitis C. *Hepatol Res* 7: 3–12.
12. Excoffier LG, Laval G, Schneider S. Arlequin Ver. 3.0: An Integrated Software Package For Population Genetics Data Analysis. *Evol Bioinform Online* 2005;1:47-50.
13. Mondelli MU, Silini E. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *J Hepatol* 1999;31:65-70.

14. Naoumov NV. Hepatitis C virus infection in Eastern Europe. *J Hepatol.* 1999;31 Suppl 1:84-7.
15. Mazzeo C, Azzaroli F, Giovanelli S, Dormi A, Festi D, Colecchia A et al Ten year incidence of HCV infection in northern Italy and frequency of spontaneous viral clearance. *Gut* 2003;52;1030-1034
16. World Health Organization Hepatitis C: Disponível Em: http://Www.Who.Int/Csr/Disease/Hepatitis/Hepatitisc_Whocdscsrlyo2002_2.Pdf Acesso 15 de agosto de 2008.
17. NIH Consensus Statement on management of Hepatitis C, NIH Consensus State Sci Statements 2002;19:1–46.
18. Chen Y-D, Liu M-Y, Yu W-L, Li J-Q, Peng M, Dai Q et al. Hepatitis C virus infection and genotypes in China. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2002;2(1)194-201
19. Khaja MN, Madhavi C, Thippavazzula R, Nafeesa F, Habib AM, Habibullah CM et al High prevalence of hepatitis C virus infection and genotype distribution among general population, blood donors and risk groups. *Infect Genet Evol* 2006; 6:198–204
20. Novais ACM, Lopes CLR, Reis NRS, Silva AMC, Martins RMB, Souto FJD Prevalence of hepatitis C virus infection and associated factors among male illicit drug users in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2009;104(6): 892-896.
21. Martins RMB, Vanderborght BOM, Yoshida CFT. Hepatitis C Virus Genotypes among Blood Donors from Different Regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(3): 299-300.
22. Sato EMN, Bertolini DA Hepatite C na região de Maringá, Estado do Paraná, Brasil: diagnóstico sorológico, molecular e genotipagem *Acta Sci Health Sci* 2006;28(1):57-63.
23. Foster GR, Fried MW, Hadziyannis SJ, Messinger D, Freivogel K, Weiland O. prediction of sustained virological response in chronic hepatitis c patients treated with peginterferon alfa-2a (40kd) and ribavirin. *Scand J Gastroenterol* 2007;42 (2): 247-55.
24. Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Annu Rev Biochem Allied Res* 56 (1987) 727–777.
25. Cursino-Santos JR, Donadi EA, Martinelli ALC, Louzada-Junior P, Martinez-Rossi NM. 2007. Evolution of hepatitis C virus infection under host factor influence in an ethnically complex population. *Liver Int* 27:1371-1378.

26. Yenigun A, Belma Durupinar. 2002. Decreased Frequency of The *HLA-DRB1*11* Allele In Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 76(4):1787–1789.
27. Tillmann HL, Chen D-F, Trautwein C, Kliem V, Grundey A, Berning-Haag A, et al Low frequency of HLA-DRB1*11 in hepatitis C virus induced end stage liver disease. *Gut* 2001;48:714–718
28. Yee LJ. 2004. Host Genetic Determinants In Hepatitis C Virus Infection. *Genes Immun* 5: 237–245
29. Asti M, Martinetti M, Zavaglia C, Cuccia MC, Gusberti L, Tinelli C, et al. 1999. Human Leukocyte Antigen Class II and III Alleles And Severity Of Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. *Hepatology* 29: 1272–1279.
30. Mangia A, Gentile R, Cascavilla I, Margaglione M, Villani MR, Stella F, et al. 1999. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatology* 30: 984–989
31. Airolidi A, C. Zavaglia, E. Silini, C. Tinelli, M. Martinetti, M. Asti, A. Rossini, M. Vangeli, L. Salvaneschi & G. Pinzello Lack of a strong association between HLA class II, tumour necrosis factor and transporter associated with antigen processing gene polymorphisms and virological response to α -interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Immunogenet* 2004 31, 259–265
32. Harcourt G, Hellier S, Bunce M, Satsangi, J Collier J, Chapman R, Phillips R, Klenerman P. Effect of HLA Class II Genotype On T Helper Lymphocyte Responses and Viral Control In Hepatitis C Virus Infection. *J Viral Hepatitis* 2001;8:174-179
33. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence Of MHC Class II Genotype On Outcome Of Infection With Hepatitis C Virus. *Lancet* 1999;354:2119–2124
34. Hong X, Yu RB, Sun NX, Wang B, Xu YC, Wu GL. 2005. Human Leukocyte Antigen Class II DQB1*0301, DRB1*1101 Alleles And Spontaneous Clearance Of Hepatitis C Virus Infection: A Meta-Analysis. *World J Gastroenterol* 11(46):7302-7307
35. Thio CL, Thomas DL, Goedert JL, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MH et al. Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* 2001;184:16-21.
36. Dinçer D, Besisik F, Oğuz F, Sever MS, Kaymakoglu S, Cakaloglu Y. Genes of major histocompatibility complex class II influence chronic C hepatitis treatment with interferon in hemodialysis patients. [*Int J Artif Organs*](#). 2001;24(4):212-4.

37. Kikuchi I, Ueda A, Mihara K, Miyanaga O, Machidori H, Ishikawa E, Tamura K. The effect of HLA alleles on response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(10):859-63.
38. Jiao J, Wang JB. Hepatitis C virus genotypes, HLA-DRB alleles and their response to interferon-alfa and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005;4(1):80-83.
39. Sim H, Wójcik J, Margulies M, Wade JA, Heathcote J. Response to interferon therapy: influence of human leucocyte antigen alleles in patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat*. 1998;5(4):249-53.
40. Ivić, Bradarić N, Puizina-Ivić N, Ledina D, Lukšić B, Martinić R. Hla-Cw7 Allele as Predictor of Favorable Therapeutic Response to Interferon- α in Patients with Chronic Hepatitis C. *Croat Med J* 2007;48:807-13
41. Miyaguchi S, Saito H, Ebinuma H, Morizane T, Ishii H. Possible association between HLA antigens and the response to interferon in Japanese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens* 1997;49: 605-611.
42. Yu ML, Dai CY, Chen SC, Chiu CC, Lee LP, Lin ZY et al. Human leukocyte antigen class I and II alleles and response to interferon-alpha treatment, in Taiwanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003;188(1):62-5.
43. Wawrzynowicz-Syczewska M, Underhill JA, Clare MA, Boron-Kaczmarek A, McFarlane IG, Donaldson PT. HLA class II genotypes associated with chronic hepatitis C virus infection and response to alpha-interferon treatment in Poland. *Liver* 2000;20(3):234-9.
44. Dai C-Y, Chuang W-L, Hsieh M-Y, Huang JF, Lin Y-Y, Chu P-Y et al., Human leukocyte antigen alleles and the response to pegylated interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res* 2009, doi:10.1016/j.antiviral.2009.11.006

TABELAS

Tabela 1 Características dos pacientes com hepatite C crônica atendidos no Departamento de Medicina Interna – Divisão de Gastroenterologia clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de setembro de 2004 a janeiro de 2009. N=144.

PARAMETROS CLÍNICOS	Pacientes N=144	RVS N=53	NRS N=64	REC N=27
Idade (média ± SD)	43,3±10,4	39,79±10,2	46,4±10,1	43,4±9,71
Sexo n (%)				
Masculino	111 (77,1)	40 (75,5)	49 (76,5)	22 (81,5)
Feminino	33 (22,9)	13 (24,5)	15 (23,5)	5 (18,5)
Fatores de Risco n (%)				
Transusão	35 (24,3)	12 (22,6)	14 (21,9)	9 (33,3)
Uso de drogas injetáveis	24 (16,6)	12 (22,6)	6 (9,4)	6 (22,2)
Uso de gluconergan	22 (15,3)	7 (13,2)	10 (15,6)	5 (18,5)
Uso de cocaína inalada	5 (3,5)	3 (5,7)	2 (3,1)	0 (0)
*Outros	58 (40,3)	19 (35,8)	32 (50,0)	7 (25,9)
**Tempo de infecção (média ± SD)	21,8±8,3	18,9±7,86	24,3±9,2	22,2±5,6

*Tatuagens, cirurgias, homossexualidade, promiscuidade e fator de risco desconhecido.

** O tempo de infecção foi calculado para 90 pacientes (RVS=35, NRS=36 e REC=19)
o tempo de infecção de 54 pacientes é desconhecido.

Tabela 2 Distribuição dos alelos HLA de classe II em 144 pacientes portadores crônicos da hepatite C com resposta virológica sustentada, sem resposta e recidivantes ao tratamento com Interferon-alfa peguilado mais Ribavirina.

Alelos	RVS n(%)=53	NRS n(%)=64	REC n(%)=27
DRB1			
DRB1*01	7(13,2)	16(25,0)	4(14,8)
DRB1*03	8(15,0)	16(25,0)	7(25,9)
DRB1*04	9(16,9)	13(20,3)	9(33,3)
DRB1*07	11(20,7)	18(28,1)	7(25,9)
DRB1*08	4(7,5)	8(12,5)	4(14,8)
DRB1*09	2(3,7)	1(1,6)	1(3,7)
DRB1*10	0	1(1,6)	3(11,1)
DRB1*11	21(39,6) ^a	10(15,6)	3(11,1)
DRB1*12	3(5,7)	2(3,1)	0
DRB1*13	20(37,7) ^b	13(20,3)	8(29,6)
DRB1*14	2(3,8)	5(7,8)	2(7,4)
DRB1*15	6(11,3)	11(17,2)	4(14,8)
DRB1*16	8(15,1)	6(9,4)	1(3,7)
DQB1			
DQB1*02	18(33,9)	32(50,0)	13(48,1)
DQB1*03	33(62,3) ^c	26(40,6)	13(48,1)
DQB1*04	2(3,7)	7(10,9)	4(14,8)
DQB1*05	16(30,2)	24(37,5)	10(37,0)
DQB1*06	21(39,6)	23(35,9)	11(40,7)

^a $P=0,0065$; OR=3,54; 95% IC= 1,4-8,4 para RVS vs NRS; $P=0,0098$; OR= 5,2; 95% IC 1,4-19 para RVS vs REC.

^b $P=0,06$ (tendência) para RVS vs NRS.

^c $P=0,03$; (P não corrigido devido a associação anteriormente descrita) OR=2,4; 95% IC=1,14-5,0 para RVS vs NRS.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

O estudo realizado com pacientes cronicamente infectados com o genótipo 1 do VHC mostrou que:

- 1) O alelo HLA-DRB1*11 constitui um fator genético importante não só na proteção contra o desenvolvimento de infecção crônica, mas também em proteger contra dano hepático severo em pacientes cronicamente infectados pelo VHC.
- 2) Além disso, o alelo HLA-DQB1*03 pode estar envolvido na melhor resposta ao tratamento com Interferon-alfa peguilado e Ribavirina, sendo que, pacientes DQB1*03 têm maiores chances de atingir resposta virológica sustentada.
- 3) Em relação aos genes *KIR* não foram encontrados dados significativos, quando comparados os genes *KIR* e os pacientes com fibrose hepática, sugerindo que esses genes talvez não estejam envolvidos no desenvolvimento de dano no fígado, porém ainda devem ser mais bem estudados.
- 4) Os resultados encontrados para os alelos HLA podem ser utilizados na clínica, ajudando na escolha da medicação para o tratamento, e auxiliando no prognóstico dos pacientes.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras tem-se a confecção de um quarto artigo avaliando a influência dos genes KIR e dos ligantes HLA na resposta ao tratamento com interferon peguulado mais ribavirina.

Além disso, frente aos resultados encontrados, torna-se interessante avaliar os genes HLA na resposta ao tratamento em um grupo maior de pacientes, o qual permita avaliar a resposta ao tratamento e os diferentes graus de fibrose no mesmo estudo.