

UNIVERSIDADE DO PORTO

FACULDADE DE MEDICINA

Dissertação de Mestrado

***Factores do Hospedeiro na Terapêutica
Antiviral da Hepatite C Crónica***

Cilénia Baldaia Enes da Costa

PORTO 2007

Dissertação do Mestrado de Medicina e Oncologia Molecular
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
Trabalho realizado no Serviço de Gastrenterologia do Hospital
de Santa Maria e no Laboratório de Genética (Centro de Endo-
crinologia e Metabolismo) da Faculdade de Medicina de Lisboa.

Agradecimentos:

Ao Prof. Doutor Miguel Carneiro de Moura

Ao Prof. Doutor Manuel Bicho

À Prof. Doutora Fátima Serejo

À Prof. Doutora Cláudia Marinho

Às Dr.ª Joana Freitas e Irina Alho

À D. Preciosa

À D. Crismélia

E a todos os que de algum modo contribuíram para a concretização deste trabalho os meus agradecimentos pela sua inestimável ajuda.

E aos doentes que possibilitaram a sua realização desejámos que este seja um contributo para o seu tratamento.

ABREVIATURAS USADAS

- 2`5` OAS -oligoadenilato sintetase
- ACP-1- fosfatase ácida ou LMWPTP
- ALT- alanina aminotransferase
- AST- aspartato aminotransferase
- CBP/p300 - *creb binding protein*
- CD44- *leukocyte adhesion molecule*
- CIDE-B -*cell death-inducing DFF45-like effector*
- CTLA-4- *cytotoxic lymphocyte associated- 4*
- CXCL- ligando de receptor de quimiocinas
- Df- graus de liberdade (degree of freedom)
- ELISA- *enzyme linked immuno-absorvent assay*
- HC - hepatite C crónica
- HTA- hipertensão arterial essencial
- GNB3- *guanine nucleotide binding protein-3*
- IκB- inibidor do NFκB
- IKK- cinase I B induzível
- IMC- índice de massa corporal
- iNOS - sintetase do óxido nítrico induzível
- IRAK- cinase associada ao receptor de interleucinas (*interleukin receptor associated kinase*)
- IRE- *IFN stimulated response element*
- IRF- *interferon regulatory factor*
- ISG - *interferon stimulated genes*
- ISGF-3 -*interferon stimulated gene factor 3*
- Jak - cinase janus
- Kb- kilobases (1 Kb= 1000 pares de bases)
- LAF-1- *lymphocyte function associated antigen 1.*
- LcK - proteína tirosina cinase específica de linfócitos (*lymphocyte specific protein tyrosine kinase*)
- LMWPTP- proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular
- MAPK- cinase de proteínas activada por mitogénios (*mitogen activated protein kinase*)

MAVS- (sinónimos: IPS-1, Visa, Cardiff) *mitochondrial antiviral signalling protein*

MDA-5- *melanoma-differentiation- associated gene 5*

Mx- myxovirus

MyD 88- *myeloid differentiation primary response gene 88*

NFKB- *nuclear factor kB*

NK- natural killer

NO - óxido nítrico

NRS- ausência de resposta sustentada

Ns- não significativo

OPN - osteopontina

PAMP- *pathogen associated molecular pattern*

PIAS1 - proteína inibidora de STAT1 ativado

PKR - *protein-kinase R*

PP2A- *protein phosphatase 2A*

PRD- *positive regulator domain*

PRR- *pattern recognition*

PTK - proteína tirosina cinases

PTP1- proteína tirosina fosfatase 1

PTP2- proteína tirosina fosfatase 2

PTPases- proteínas tirosina fosfatase

RdRp- *RNA dependent RNA polymerase*

RIG-I- retinoid -acid-inducible gene I

RIP- *receptor interacting protein*

RNAseL/2`5` OAS- RNAse L/2`5` Oligoadenilatociclase

RR- resposta e recidiva

RS- resposta sustentada

SOCS- *supressor of cytokine signalling*

Src- cinase proteica com homologia src (sarcoma viral)

STAT- *signal transducer and activator of transcription*

STAT1- *signal transducer and activator of transcription 1*

Syk -Syk-Related tyrosine Kinase

TLR 3- *toll like receptor 3*

TLR- *toll like receptor*

TNF- α - factor de necrose tumoral

TRADD- *TNF receptor-associated death domain*

TRAIL- *TNF related apoptosis-inducing domain*

TRIF- *toll-interleukin factor*

UI- Unidades Internacionais

USP18- ubiquitin-specific protease 18

VHB- vírus da hepatite B

VHC- vírus da hepatite C

VIH- vírus da imunodeficiência humana

ZAP70- Zeta-chain-Associated Protein Kinase

X²- Qui - quadrado

Índice

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
A.	O Vírus da Hepatite C	3
B.	Evolução da Hepatite C crónica	7
C.	O Fígado como Órgão Imunológico	13
D.	A Resposta Imunológica na Hepatite C crónica	15
D.1.	Resposta imunológica inata na infecção pelo VHC	16
Indução da produção de IFN de tipo I	17	
D.2.	Os interferões e suas vias de sinalização.....	18
Os vários tipos de interferões	18	
Vias de sinalização do interferão	19	
Efeitos do interferão	20	
D.3.	Relação da imunidade inata e adquirida na Hepatite C crónica	24
D.4.	Mecanismos de Evasão do VHC – Interferência Viral	28
E.	Resposta à terapêutica da hepatite C crónica	31
E.1.	Factores predizentes usados habitualmente	32
E.2.	Factores genéticos do hospedeiro	35
E.3.	Polimorfismos estudados neste trabalho	40
Osteopontina.....	41	
TNF- α	51	
Proteínas Tirosina Fosfatases e Transdução de Mensagens Intracelulares.....	54	
Fosfatase ácida solúvel (ACP-1) ou Proteína Tirosina Fosfatase de baixo peso molecular (LMWTPT).....	59	
III.	CONTRIBUIÇÃO PESSOAL	65
A.	Objectivos	65
Hipótese.....	65	
Objectivos.....	65	
B.	Material e Métodos	66
B.1.	Material.....	66
B.2.	Métodos	67

C. Resultados.....	72
Características Gerais	72
Polimorfismos de Osteopontina, TNF- α e ACP-1 no grupo de controlo e doentes com Hepatite C crónica.....	74
Polimorfismos da OPN na resposta à terapêutica antiviral.....	78
Polimorfismos da TNF- α na resposta à terapêutica antiviral.....	79
Polimorfismos da ACP1 na resposta à terapêutica antiviral.....	79
Níveis plasmáticos de osteopontina e resposta à terapêutica.....	83
IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	85
A. Discussão.....	85
B. Conclusões	90
V. RESUMO.....	93
VI. ABSTRACT.....	95
VII. BIBLIOGRAFIA	97

I. INTRODUÇÃO

Cerca de 3% da população mundial (Bowen & Walker, 2005) e 150.000 portugueses estão infectados pelo vírus da Hepatite C (VHC) (Marinho et al., 2001; Carvalho et al., 1991). Em muitos doentes a hepatite C crónica (HC) conduz à cirrose, doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular.

O tratamento mais eficaz (interferão peguilado e ribavirina) tem efeitos laterais importantes e taxas de resposta variáveis entre 45 e 80%. A duração da terapêutica depende do genótipo e da resposta virológica após as primeiras 12 semanas de terapêutica. Quando não há resposta os indivíduos correm risco de evolução para cirrose e insuficiência hepática terminal. A HC é uma causa comum de transplante hepático ortotópico nos Estados Unidos da América e Europa (Brown, 2005).

Os estudos demonstram que genótipo e carga viral são factores independentes de resposta. Foram associados a menor resposta, para além de genótipo 1 e viremia elevada, a maior diversidade de quasiespecies, as variações na sequência NS5A- *interferon sensitivity determining domain*. Vários estudos têm tentado identificar factores do hospedeiro na resposta à terapêutica como a raça (Cheung et al., 2005), expressão génica, (Chen et al., 2005) (Shackel et al., 2002), (Smith et al., 2003), alelos HLA- DRB (Jiao & Wang, 2005), HLA classe I (Romero-Gomez et al., 2003), polimorfismos de genes de citocinas como interferão- γ (Dai et al., 2005), TNF- α (Yu et al., 2003), (Larrea et al., 1996), (Rosen et al., 2002b), (Schiemann et al., 2003), de genes de resposta ao interferão (Patzwahl et al., 2001). A análise de expressão génica por microarrays permitiu usar 8 genes como discriminadores de resposta (Chen et al., 2005). Os níveis de citocinas e de supressores das suas vias de sinalização (SOCS, IP-10) pré-tratamento também se poderão correlacionar com a resposta.

Contudo desconhece-se porque é que para o mesmo genótipo e carga viral semelhante diferentes hospedeiros têm diferentes respostas ao tratamento.

O trabalho desenvolvido tem como objectivo contribuir para o estudo de factores do hospedeiro na HC.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma estimativa da prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) foi reportada pela OMS em 1999 (1999). Ressalta-se que 134 países relataram as suas estimativas enquanto 57 não o fizeram. Os países africanos reportaram prevalências médias de 5,3%, seguidos dos países do Mediterrâneo Oriental com 4,6%. As estimativas mais baixas foram da Europa (1%) e dos Estados Unidos (1,7 %). A prevalência global é de cerca de 3% (170 milhões de infectados). A transmissão da infecção está intimamente relacionada a exposições parenterais com o vírus.

A hepatite C crónica (HC) é um problema de saúde e económico importante devido ao nº de indivíduos afectados e às complicações potencialmente mortais da hipertensão portal, insuficiência hepática e risco de carcinoma hepatocelular. Foi descrita em 1973 como uma hepatite associada a transfusões e não provocada pelo vírus da hepatite A ou pelo vírus da hepatite B.

O (s) mecanismo (s) de inflamação, necrose e fibrose não estão completamente esclarecidos e são área de intensa investigação. Ciclos contínuos de destruição de hepatócitos podem conduzir a fibrose, e ao seu estadio terminal, a cirrose. Estes acontecimentos secundários envolvem factores dependentes do vírus e do hospedeiro que perturbam as normais funções de reparação, metabolismo lipídico, apoptose e promoção do crescimento. Estas interacções complexas poderão explicar as diferenças observadas na história natural e na resposta à terapêutica.

A. O Vírus da Hepatite C

O vírus da Hepatite C é um vírus hepatotrópico, capsulado, de ARN de cadeia simples positiva com 9,6 kb. Foi identificado em 1989 por Choo et al. É classificado no género *Hepacivirus* e na família dos *Flaviviridae* (Choo et al., 1989). Os únicos hospedeiros susceptíveis conhecidos são os humanos e chimpanzés. As partículas do VHC têm entre 40-60 nm de diâmetro e existem sob forma de uma população heterogénea no sangue, reflectindo a sua associação a imunoglobulinas e lipoproteínas.

O genoma é semelhante ao dos flavivirus e pestivirus, codifica uma única zona codificante (*open-reading frame*) e tem zonas altamente conservadas não traduzidas (UTR) nas extremidades 5' e 3'. A UTR da extremidade 5' participa no início da síntese proteica através de mecanismo de entrada na *internal ribosomal entry site*. A UTR da extremidade 3' tem estrutura secundária extensa que provavelmente desempenha papel na replicação viral.

A zona codificante codifica cerca de 3000 aminoácidos. Os genes do núcleo (*core*) e de duas proteínas do envelope E1 e E2 estão localizados na extremidade N-terminal. Os genes não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, e NS5B estão na extremidade C-terminal. As proteínas estruturais são processadas por peptidases do hospedeiro, enquanto a clivagem das não estruturais é catalisada por proteases codificadas pelo VHC (Choo et al., 1991).

As proteínas estruturais fazem parte dos viriões. O *core* forma a nucleocápside e as proteínas E1 e E2 são componentes do envelope lipídico. As proteínas NS2 e NS3 são proteases codificadas pelo VHC importantes na clivagem de proteínas não estruturais. A NS3 tem ainda função de helicase desempenhando papel na replicação. NS4A e NS4B são provavelmente componentes do complexo replicase. A NS5A é uma fosfoproteína que foi implicada na sensibilidade ao IFN (interferão). A NS5B é a polimerase do ARN dependente do ARN (Lindenbach & Rice, 2005).

Há três candidatos a receptor do VHC: o CD81, o receptor das LDL e um receptor tipo *scavenger* classe B (Andre et al., 2005). Após entrada na célula, as nucleocápsides do VHC vão para o citoplasma onde o ARN viral funciona directamente como ARN mensageiro para a tradução da sua longa poliproteína. A replicação ocorre em complexos de replicação associados a membranas que no citoplasma formam uma rede membranar perinuclear. Os plasmídeos com ARN saem dessas membranas para vesículas citoplasmáticas que se fundem com a membrana plasmática (Rehermann & Nascimbeni, 2005).

O seu genoma funciona como molde para a sua replicação e também como ARN mensageiro viral. A replicação ocorre através de um intermediário (-) num compartimento ligado a membrana

e que contém ARN intermediários de cadeia dupla. Feita a sua tradução surge uma poliproteína com cerca de 3000 amino-ácidos que é processada por proteases celulares e virais em proteínas estruturais (componentes do vírus maduro) e não estruturais.

Apresenta elevada capacidade replicativa associada a falta de capacidade de verificação de erros da sua polimerase tal como acontece noutros vírus de ARN. Produzem-se 10^{12} viriões por dia (100 vezes mais do que o HIV) com uma semi-vida de cerca de 3 horas (Lindenbach & Rice, 2005). A taxa estimada de substituições de nucleotídeos é de 10 substituições/ locus/ ano.

Com base na sequência genómica identificaram-se 6 genótipos e mais de 100 subtipos. O teste padrão para determinação do genótipo é a sequenciação directa de partes das regiões E1 ou NS5B. Os genótipos diferem entre si em 30-35% da sua sequência nucleotídica. Dentro de cada genótipo, identificam-se vários subtipos que diferem na sequência nucleotídica em 20-25%. Todos os genótipos de VHC partilham uma determinada organização do genoma, uma replicação envolvendo complexo de replicase ligada à membrana e citoplasmática. Os estudos de sequenciação de quasiespecies indicam que a pressão do sistema imune do hospedeiro pode levar à selecção de variantes capazes de persistir ou resistir às acções do IFN. Apesar de frequência variável nas populações, uma sequência na região NS5A denominada *interferon sensitivity determining domain* foi associada ao tipo de resposta à terapêutica (Schinkel et al., 2004). Na Europa e Estados Unidos da América predominam os genótipos 1a e 1b seguidos dos genótipos 2 e 3.

Os modelos de estudo do VHC estão indicados na Quadro 1. Até há 2 anos os modelos disponíveis permitiam uma replicação pouco intensa de tal modo que eram necessárias técnicas de RT-PCR em tempo real para detectar a infecção. Os sistemas baseados na auto-replicação de minigenomas em linhas celulares de hepatoma permitem rastrear se novos fármacos têm acção antiviral. Em 2005 vários grupos conseguiram obter o crescimento eficaz do VHC em culturas celulares. Isolaram VHC de doente com hepatite fulminante que se replica em células de hepato-

ma Huh7 sem mutações adaptativas. Foi pela primeira vez possível observar viriões provenientes de culturas celulares usando microscopia electrónica (Zeisel & Baumert, 2006).

Quadro 1

Modelos de estudo do VHC

In vitro

Transcrição- tradução *in vitro*
Sistemas de expressão transitória em células
Transfecção de linhas celulares (expressão constitutiva ou induzível)
Pseudopartículas retrovirais com glicoproteínas funcionais do VHC
Réplicas (sub-genómicas/ totais; estáveis/ transitórias)
Vírus quiméricos (polio-VHC)
Vírus relacionados (ex: BVDV)

In vivo

Ratos transgênicos
Modelos de ratos imunodeficientes/ reconstituição hepatocelular
Chimpanzé (*Pan troglodytes*)
Tupaia belangeri chinensis?
Tamarindos infectados com GBV-B

Adaptado de (Moradpour & Rice, 2007)

O VHC tem um sucesso notável. Tipicamente produz uma infecção persistente que, a não ser que seja interrompida por terapêutica, persiste durante toda a vida do indivíduo ocorrendo muitas oportunidades de transmissão dentro da população humana. Este sucesso está ligado à capacidade do vírus evadir e antagonizar a resposta imune do hospedeiro e resistir às acções antivirais do IFN. (Gale, Jr. & Foy, 2005)

A acção dos interferões em células infectadas por vírus e tecidos circundantes provoca um estado antivírico que é caracterizado pela expressão e actividade antiviral de genes estimulados pelo interferão. Por seu lado os vírus têm mecanismos e diversas estratégias que se contra-põem à resposta do hospedeiro e permitem uma replicação eficiente, minimizando o poder terapêutico antivírico dos interferões.

A compreensão da complexa rede de processos celulares antivíricos e interacções vírus-hospedeiro deverá ajudar na compreensão da história natural e na identificação de novos alvos terapêuticos.

As tecnologias emergentes da genómica funcional, bioinformática e outras participarão neste estudo (Quadro 1 e Figura 1).

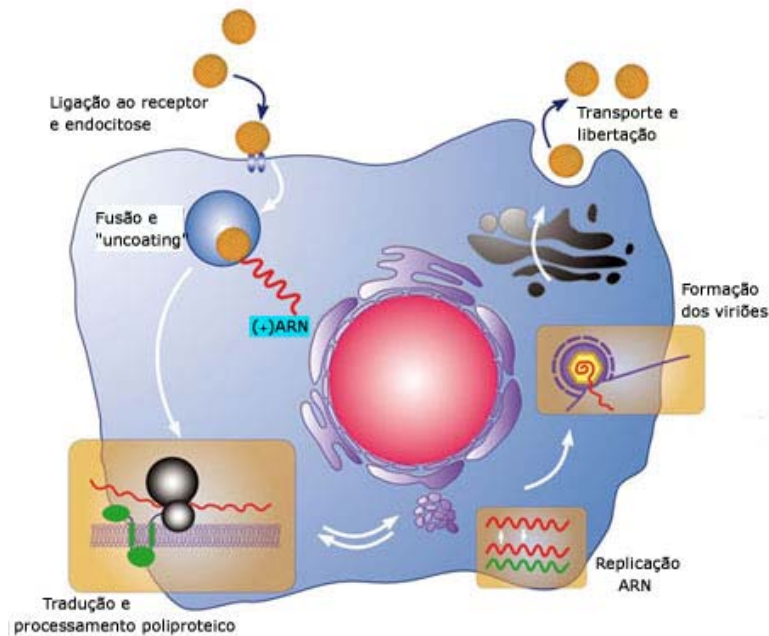


Figura 1: ciclo de vida do VHC. Adaptado de (Lindenbach & Rice, 2005)

B. Evolução da Hepatite C crónica

A infecção pelo VHC é um processo altamente dinâmico em que a semi-vida do vírus é de apenas algumas horas e a produção média diária e depuração é de mais de 10^{12} de viriões (Lindenbach & Rice, 2005).

Para além de factores virais e ambientais comportamentais, pensa-se que a diversidade genética contribui para o espectro da evolução clínica dos doentes cronicamente infectados com o VHC.

As interacções VHC-hospedeiro regulam a resposta do hospedeiro e afectam a evolução da infecção pelo VHC (Gale, Jr. & Foy, 2005). O VHC desencadeia uma resposta mediada imunologicamente que ou rapidamente o depura ou evolui para a cronicidade. Evoluem para a cronicidade 60 a 80% das infecções pelo VHC no adulto.

Os conhecimentos actuais permitem estabelecer um modelo de interacção e adaptação viral que constitui a base da infecção crónica como está esquematizado na Figura 2. A transmissão do VHC para um novo hospedeiro desencadeia uma enorme pressão para adaptação do vírus ao seu novo hospedeiro e para controlar a resposta deste. Variantes altamente eficazes vão conseguir bloquear sinalização via RIG-I (*retinoid acid-inducible gene 1*) e TLR3 (*toll like receptor 3*) do hospedeiro através da protease NS3/4A. Apenas 15 a 25% das exposições evoluem para a resolução da infecção aguda. A resposta do hospedeiro pressiona para a selecção de quasiespecies que mantêm sucesso na evasão viral, interagindo com as vias de sinalização RIG-I, TLR3, IFN e ISG (*interferon stimulated genes*), atenuando desta forma nos vários níveis a acção do IFN (Gale, Jr. & Foy, 2005).

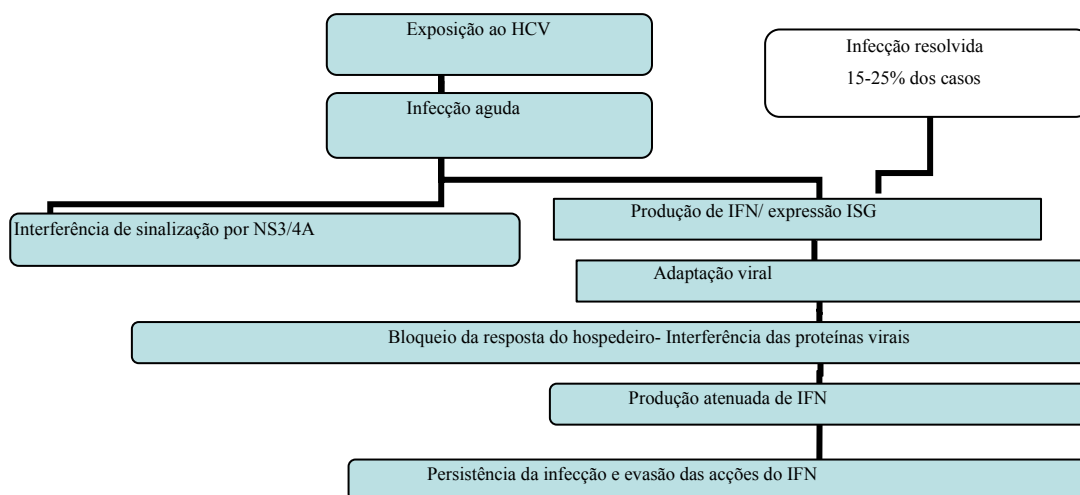
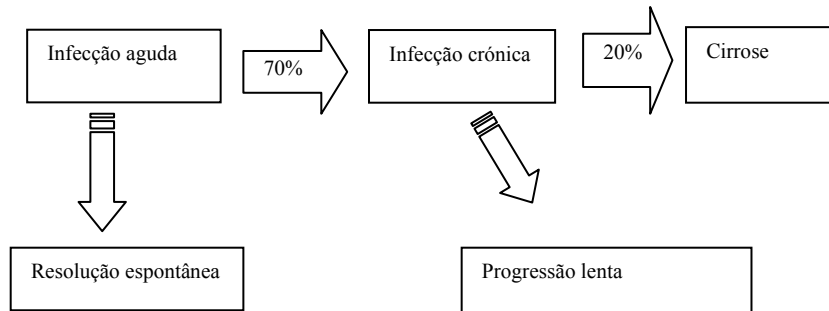


Figura 2: interações VHC-hospedeiro que regulam a resposta do hospedeiro e condicionam a evolução da infecção

A história natural da HC (Hepatite C crónica) é caracterizada por uma progressão da doença muito variável e a cirrose pode desenvolver-se em média após 30 anos em 1/3 dos doentes.

A gravidade da HC varia desde uma fase de infecção crónica assintomática até à cirrose hepática e desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.



FIBROSE E VÍRUS DA HEPATITE C

Independentemente do estímulo inicial o aumento da produção de colagénio tipo I é um marcador comum de doenças fibróticas em vários órgãos.

A fibrose hepática refere-se à formação de um tecido de cicatrização resultando de desequilíbrio entre fibrogénese e fibrólise. A progressão da fibrose é variável e positivamente influenciada pela gravidade e duração da doença hepática, contudo permanece muito difícil avaliar o risco individual.

Os riscos de fibrose e a sua história natural na HC foram avaliados em grandes estudos clínicos que incorporam avaliações padronizadas (Poynard et al., 2001). A progressão da fibrose na HC determina o prognóstico final e a necessidade e a urgência de terapêutica. Os factores relacionados com lesão hepática mais grave são a idade à data da infecção, o sexo masculino, a obesidade, a diabetes mellitus, o álcool, a co-infecção com VHB/VIH. No Quadro 2 descrevem-se os factores associados e os potencialmente associados a progressão rápida de fibrose.

Quadro 2: Factores de progressão mais rápida da fibrose na HC

Associados	Prováveis
Sexo masculino	Esteatose
Duração da infecção	Resistência à insulina
Idade à data de infecção (mais velhos)	Elevada heterogeneidade viral
Consumo excessivo de álcool	VHC genótipo 3
Imunossupressão (portadores de órgão transplantado)	Tabagismo
Co-infecção VIH	
Excesso de peso	
Estadio de fibrose inicial mais avançado	
Estadio inicial de necroinflamação elevado	

A fibrogénese na HC é multifactorial e envolve a lesão imunomediada, a inflamação, a activação de células produtoras de matriz extracelular. Os factores genéticos e epigenéticos poderão influenciar a extensão, a gravidade e a taxa de progressão da fibrose.

Friedman descreveu três fases biológicas na fibrose hepática: de início um estímulo conduz à transdiferenciação de células estreladas quiescentes em células com fenótipo activado; a perpetuação com a proliferação destas células e a acumulação de matriz extracelular, e se ocorrer resolução as células estreladas activadas sofreriam apoptose (Friedman, 2004).

As fontes celulares da fibrose são diferentes tipos de células designados por células estreladas activadas (perícitos) e/ou miofibroblastos hepáticos. Estes dois tipos celulares têm características fenotípicas e funcionais semelhantes. As células estreladas quiescentes armazenam e controlam a libertação de retinoides, controlam o turnover de matriz extracelular e o fluxo sanguíneo, mantêm a homeostasia nos sinusóides hepáticos e podem actuar libertando ou respondendo a neurotransmissores. Acumulam-se e proliferam nas áreas de necrose, respondem à hipoxia, segregam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, proteínas da matriz extracelular e inibidores de colagenases. A imunocitoquímica para actina - a do músculo liso identifica ou células estreladas ou miofibroblastos activados. A sua distinção permanece assunto controverso. A análise proteómica levou à identificação de STAP (*stellate cell activation associated protein*) ou citoglobina que é exclusivamente expressa em células estreladas activadas e que é uma proteína da superfamília das globinas como por exemplo a hemoglobina e a mioglobina (Asahina et al., 2007).

Vários dados apoiam a hipótese de serem sobretudo factores do hospedeiro a condicionarem a progressão da fibrose na HC: (1) ausência de relação entre carga viral ou genótipo com a gravidade da fibrose, embora afectem o resultado da terapêutica antiviral, (2) polimorfismos de promotores de fibrose como TGF- β e do sistema renina angiotensina (enzima conversora, angiotensinogénio e receptores da angiotensina) correlacionam-se com o risco de fibrose, e (3) o fenótipo imune do hospedeiro com evolução mais rápida da fibrose nos imunodeprimidos (Rockey &

Friedman, 2006) (Friedman et al., 2007). A fibrose é um processo que também será orientado pelo sistema imune (Bhagal & Bona, 2005). Em ratos verificou-se que a polarização para Th2 tem correlação com o potencial fibrogénico (Shi et al., 1997). Num modelo de lesão hepática por tetracloreto de carbono, os animais com deficiência de linfócitos B apresentam formas atenuadas de fibrose (Novobrantseva et al., 2005).

As características histológicas fundamentais da HC são: (1) expansão marcada e difusa dos tractos porta por um infiltrado predominantemente linfocítico com mínimo extravasamento (necrose em ponte) para os lóbulos adjacentes, frequentemente com agregados linfoides, (2) vários graus de lesão ductular e perda focal de ductos, (3) graus variáveis de esteatose e (4) hiperplasia das células sinusoidais (Lefkowitz et al., 1993). A designada tríade do VHC, ié folículos linfoides portais, lesão do ducto biliar e esteatose, permitia o diagnóstico histológico de hepatite não-A não-B na era pré-serologia.

Os níveis séricos elevados e a maior expressão hepática de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α e IL-8) demonstram a activação de células pró-inflamatórias contribuindo para hepatite persistente e lesão progressiva. Os linfócitos T citotóxicos desempenham um papel essencial na resposta imunológica contra o VHC bem como na lesão hepática.

Na maioria dos tecidos a produção basal de citocinas é baixa ou ausente. Quando, estímulos fisiológicos ou patológicos activam as células, aumenta a produção de citocinas que no final orquestram a resposta tecidular ao estímulo. As citocinas são mediadores de inflamação, morte celular, colestase, fibrose e regeneração tecidular.

Os efeitos mediados por processos citopáticos e os de mediação imunológica estarão envolvidos na patogénese da HC. Em concordância com estas observações está o facto de nas situações de imunodeficiência como a infecção VIH, deficiência de imunoglobulinas e receptores de órgãos transplantados a taxa de progressão ser mais rápida do que nos imunocompetentes. Há evidência indirecta que produtos do VHC causam lesão citopática. Há evidência indirecta de a

lesão hepática coincidir com desenvolvimento de resposta imunológica do hospedeiro e não com a replicação viral nos indivíduos imunocompetentes (Rosen, 2006).

A produção de TNF- α é um dos eventos mais precoces em muitos tipos de lesão hepática, desencadeando a produção de outras citocinas que recrutam células inflamatórias, matam hepatócitos, e iniciam resposta de cicatrização hepática. Apesar do papel central do fígado normal na metabolização de drogas e xenobióticos, a sua exposição a espécies reactivas de oxigénio e endotoxinas bacterianas não desencadeia a transcrição de TNF- α ou de IL-10 que permanecem quase indetectáveis. A administração de TNF- α a animais ou a incubação de hepatócitos com TNF- α *in vitro* promove a sua proliferação e não a sua morte. Se após hepatectomia parcial for abolido o TNF- α (uso anticorpos neutralizantes ou animais sem receptores do TNF- α tipo I) não ocorre regeneração hepática, indicando que esta é iniciada por activação de receptores do tipo I pelo TNF- α . A hepatite alcoólica severa é o protótipo de doença associada ao TNF- α .

O papel do TNF- α na regulação e na replicação do VHC não é bem conhecido. Relativamente à sua função imune na HC, é para além da perforina e Fas, um mediador chave dos linfócitos T citotóxicos envolvidos na eliminação de células infectadas pelo VHC. Por imunohistoquímica demonstrou-se a presença de TNF- α nos infiltrados mononucleares (Kinnman et al., 2000). Pode contribuir para a fibrose através da activação de células de Kupffer e macrófagos residentes conduzindo à produção de TGF- β , um mediador fundamental da fibrogénese. Foram descritos na literatura vários casos evidenciando que a neutralização do TNF- α não é prejudicial em doentes com HC. Num estudo foi usado etanercept (receptor solúvel do TNF- α , com acção de isco-*decoy*) como adjuvante na terapêutica com IFN e ribavirina. Às 24 semanas a viremia era nula em 63% do grupo IFN + ribavirina + etanercept versus 32% no grupo IFN+ ribavirina ($p=0,04$) (Zein, 2005).

C. O Fígado como Órgão Imunológico

As características anatómicas e imunológicas deste órgão são únicas. O fluxo sanguíneo rico em antígenos provenientes do tubo digestivo passa pela rede de sinusóides hepáticos onde é "rastreado" por células apresentadoras de antígenos e linfócitos. Alguns autores dividem a população de linfócitos hepáticos (residentes) em células T (63%), células B (6%) e células NK (31%). Por sua vez, as células T dividem-se em células T convencionais (CD8+ e CD4+) e população "não convencional". Esta última inclui células com marcadores NK (NKT) ou sem estes marcadores (células T com TCR $\gamma\delta$) (Racanelli & Rehermann, 2006).

Na Figura 3 descrevem-se as especificidades da composição celular hepática (Mackay, 2002). As células NKT (pit cells), as T com expressão TCR e as T CD8 $\alpha + \beta$ - presentes no fígado são raras no sangue periférico.

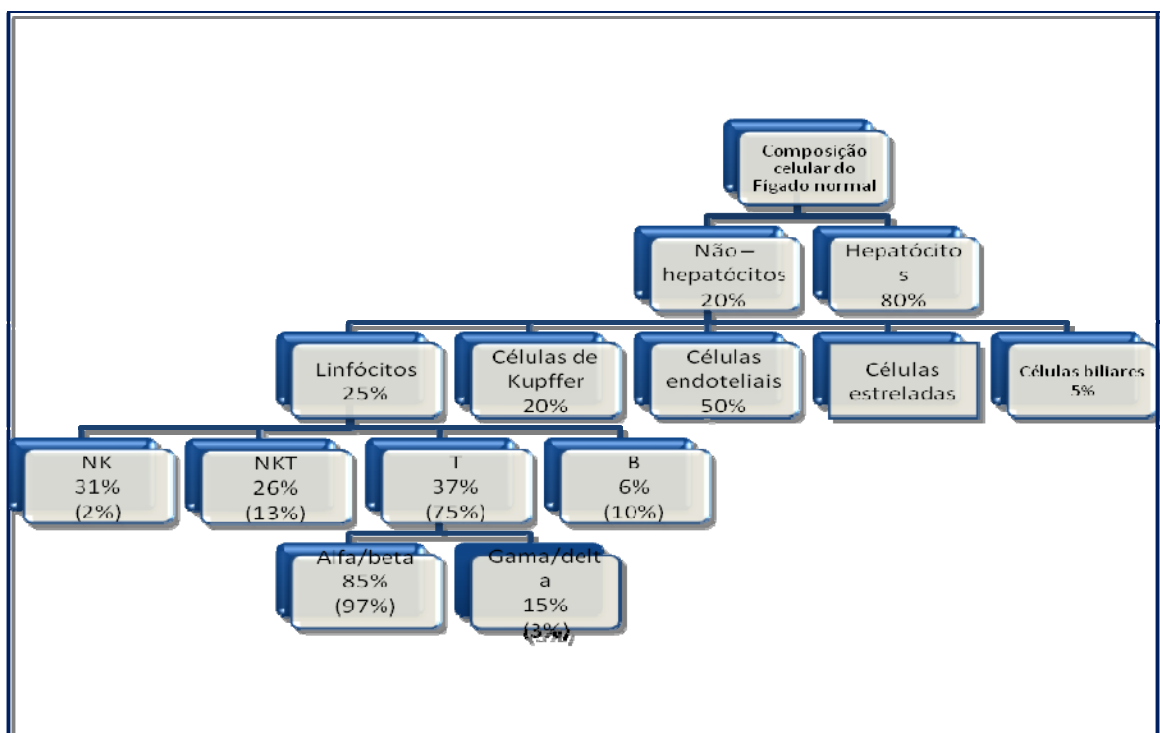


Figura 3: composição relativa de cada componente celular no fígado normal. (x)% do mesmo componente no sangue periférico

Os linfócitos hepáticos estão dispersos no parênquima e também nos espaços porta. A população de linfócitos hepáticos é mais rica em células efectoras da imunidade inata, células natural Killer (NK) e células NKT que são cerca de 30% desta população. As células NK têm actividade citolítica potente contra células infectadas por vírus ou células tumorais. A sua activação é regulada por receptores activadores ou inibidores, mas a inibição é o sinal dominante. As células T $\gamma\delta$ podem constituir 15-25% de todos os linfócitos T intra-hepáticos, possuem receptores (TCR) oligoclonais que reconhecem um número limitado de antígenos como proteínas de stress e antígenos não proteicos.

A população de células apresentadoras de antígenos residente inclui as células de Kupffer, as células endoteliais dos sinusóides (cerca de 50% da massa não parenquimatosa) e células dendríticas residentes. Estas últimas tipicamente estão localizadas à volta das veias centrais e nos tractos portais. Num fígado saudável as células dendríticas são predominantemente imaturas. As células de Kupffer e as células endoteliais sinusoidais exprimem constitutivamente IL-10 e TGF- β , mas a sua produção destes também é induzível nas células estreladas. As células dendríticas imaturas inibem a proliferação e a produção de citocinas pelos linfócitos através de CTLA-4 e PD-1. Assim existe um microambiente "tolerante" (Racanelli & Rehermann, 2006).

As células NK hepáticas contribuem para a modulação do balanço da produção de citocinas pró-inflamatórias (Th1) e anti-inflamatórias (Th2). Como por defeito estas células estão inibidas, o seu limiar para a activação é menor na ausência de ligandos como MHC classe I que se ligam aos receptores inibitórios. Na ausência de sinais inibitórios e na presença de IFN tipo I há activação destas células com consequente lise de células-alvo. A activação das células NK compreende também a produção rápida de IFN- γ , que estimula hepatócitos e células endoteliais a produzirem a quimiocina CXCL9 promovendo o recrutamento de mais células T para o fígado (Racanelli & Rehermann, 2006).

Os linfócitos circulantes entram facilmente em contacto com antígenos que lhes são apresentados por células de Kupffer, células endoteliais e células dendríticas residentes, porque os sinusóides hepáticos são fenestrados e não possuem membrana basal (Racanelli & Rehermann, 2006). Como o diâmetro dos sinusóides é pequeno, elevações mínimas da pressão no sistema porta e perturbações no fluxo sinusoidal causam estase, aumentam o contacto entre linfócitos e células apresentadoras de antígenos e promovem a extravasão de linfócitos.

A protecção mediada por células T contra vírus hepatotrópicos e bactérias depende da existência de células T efectoras CD8+, permitindo manter uma resposta que controle a emergência e disseminação de um vírus. As células T CD8 "naive" e em repouso estão localizadas em compartimentos linfoides secundários e necessitam de 2 sinais independentes para a sua total activação. O primeiro sinal é um peptídeo MHC de classe I e o TCR (receptor de células T). O segundo sinal, de co-estimulação, é independente do receptor de antígeno e é crítico para permitir a total activação e diferenciação da célula T CD8+ (Racanelli & Rehermann, 2006)

D. A Resposta Imunológica na Hepatite C crónica

O organismo é inicialmente defendido por respostas imunes inatas, que conseguem controlar agentes patogénicos com certos padrões moleculares (PAMP) ou que induzem a produção de IFN. Operando através de receptores codificados no genoma, não permitem a formação de memória. Por outro lado, a característica mais importante da imunidade adaptativa é a memória duradoura relativamente a um patógeno específico.

Após infecção pelo VHC, a replicação continua e partículas virais são constantemente libertadas para a circulação. A expressão de IFN e de genes induzidos pelo IFN é detectável pouco tempo após a infecção aguda (Chisari, 2005).

A resposta inicial envolve células de imunidade inata como NK, NKT, macrófagos residentes e células dendríticas que produzem IFN. Os macrófagos residentes e células dendríticas imaturas de fígados infectados são capazes de processar antígenos do VHC (Szabo & Dolganiuc,

2006) e apresentá-los a outras células do sistema imune. Na presença de antígenos víricos as células dendríticas imaturas são induzidas a migrar para gânglios linfáticos regionais transformando-se em células maduras com capacidade de activar linfócitos T e influenciar a polarização da resposta de linfócitos T CD4 em tipo Th1 (linfócito T citotóxico, secreção de IL-2, IFN, TNF- α) ou Th2 (activação de linfócitos B, produção de anticorpos e citocinas: IL-4, IL-5, IL-10, IL-13).

O papel de células T CD4 específicas na erradicação do VHC foi descrito na HC e na hepatite C aguda. Estas células não são mediadoras de lesão mas são críticas na facilitação de outros mecanismos imunológicos como a acção de linfócitos CD8. As células T citotóxicas induzidas por antígenos recrutadas para o fígado são críticas para a erradicação de células infectadas por vírus (Bowen & Walker, 2005).

D.1. Resposta imunológica inata na infecção pelo VHC

Para que o sistema imune inato responda apropriadamente à presença de um agente patogénico, receptores de reconhecimento de padrão do hospedeiro (PRR) têm de detectar padrões moleculares associados ao agente (PAMPs).

Os elementos da família TLR (*toll like receptors*) são componentes fundamentais da imunidade dos mamíferos, constituindo parte do sistema de vigilância mais precoce na resposta à infecção. A sua activação desencadeia a imunidade inata e é crucial na indução de imunidade adaptativa Th1/Th2 (Parker et al., 2007), (Bowie, 2007). As vias de sinalização activadas pelos TLR levam à indução da produção de citocinas e de IFN tipo I (Szabo & Dolganiuc, 2006).

O TLR3 reconhece ARN de cadeia dupla, TLR 7 e 8 reconhecem ARN de cadeia simples, o TLR9 reconhece ADN CpG e ADN viral. Outros TLR (2 e 4) interagem com proteínas virais específicas e também desencadeiam a produção de IFN.

Várias helicases de ARN citoplasmáticas pertencem a este sistema de detecção de intrusão, como RIG-I (*retinoid acid-inducible gene I*) e MDA-5 (*melanoma-differentiation-associated gene 5*).

O PKR (*protein-kinase R*) é outro detector intracelular de ARN ds e de poli(I:C) (um ARN ds sintético usado para mimetizar infecção viral). A sua função principal é inibir a tradução do ARNm do hospedeiro através da fosforilação de factor de iniciação da tradução eIF2 α .

Indução da produção de IFN de tipo I

O reconhecimento do VHC, neste caso ARN ds (+), intermediário na replicação do ARN de cadeia simples do VHC, é feito por 2 vias: uma dependente de TLR3 e outra independente deste.

O TLR3 está presente nos hepatócitos e várias células epiteliais como as células dos ductos biliares, e pode localizar-se em endossomas ou na superfície celular. O TLR8 existe em endossomas e reconhece ARN de cadeia simples. Ao contrário de outros TLR, a via de sinalização do TLR3 é independente do adaptador Myd88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) e usa TRIF (*toll-interleukin factor*) para a transdução de sinal. Na via independente do TLR3, o reconhecimento do VHC é feito por helicases citoplasmáticas, RIG-I, MDA5. Estas duas vias conduzem à produção de IFN tipo I e de citocinas pró-inflamatórias. (Szabo & Dolganiuc, 2006)

As vias que envolvem o RIG-I ou a TLR-3 conduzem à fosforilação e activação de IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) por cinases TBK1 ou IKK- ϵ (cinase de IB induzível- ϵ). Também há libertação do NF κ B do seu inibidor (I κ B). O dímero de IRF-3 fosforilado transloca-se para o núcleo onde interage com factores de transcrição como CBP/p300 (*creb binding protein*) e liga-se ao domínio positivo regulador (PRD) no promotor dos genes alvo do IRF-3.

A activação do IRF-3 conduz à produção e secreção de IFN- β pela célula infectada.

A ligação do IFN- β aos receptores de IFN α/β leva à activação das cinases proteicas associadas a estes receptores, Tyk 2 e Jak1 que conduzem à fosforilação em tirosinas e à formação de heterodímeros STAT1 - STAT2 e formação de complexo com IRF-9 designado por ISGF3. Este complexo ISGF3 migra para o núcleo onde se liga a elementos de resposta dos genes alvo (ISRE) conduzindo à expressão de ISG (*interferon sensitive genes*), os efectores genéticos da resposta do hospedeiro. (Gale, Jr. & Foy, 2005)

O IRF-7 é simultaneamente um factor de transcrição e um ISG. É activado através de via de sinalização como PAMP viral. A sua fosforilação, dimerização e heterodimerização com IRF-3 permitem a sua ligação a elementos de resposta VRE (*virus response element*) na região promotora de genes do IFN- α ampliando o sinal para expressão de ISG. Há também aumento da quantidade de RIG-I e outros componentes das vias de reconhecimento de PAMP amplificando a produção de IFN e a resposta do hospedeiro. (Gale, Jr. & Foy, 2005)

Após a infecção, o 1º IFN expresso é o IFN- β em resposta à activação do factor de resposta ao interferão IRF-3 (*Interferon response factor-3*). Depois o IFN- β estimula as células vizinhas, activando a transcrição de IRF-7 e IRF-8, levando à expressão de IFN- α e amplificando a resposta de IFN do hospedeiro. (Gale, Jr. & Foy, 2005).

As proteínas do núcleo e NS3 do VHC activam monócitos de modo dependente de TLR2, activando IRAK1 com consequente activação de p38 MAPK e translocação para o núcleo do NF κ B. A proteína do core também induz, através monócitos e TLR2, o aumento da proliferação dos linfócitos B, o que pode favorecer o desenvolvimento de crioglobulinemia mista essencial associada ao VHC. Os portadores desta associação têm polarização Th1 (Loffreda et al., 2003).

D.2. Os interferões e suas vias de sinalização

Os vários tipos de interferões

Os interferões conhecidos pelas propriedades antiviricas são também potentes moduladores do crescimento celular e imunomoduladores, regulando respostas inatas e adaptativas. Foi demonstrada a importante relação cruzada entre as vias reguladoras celulares e apoptose, inflamação e resposta ao stresse (Billiau, 2006).

Há 3 tipos principais de interferões - I, II e III. Os do tipo I (α , β , ϵ , κ , ω , τ) interagem com receptor formado por 2 cadeias (IFNR-1, IFNR-2). O tipo III inclui o IFN- λ , IL-28, IL-29, interagem com o receptor 1 do IFN λ e com a cadeia IL-10R2.

A maioria das células é capaz de produzir IFN α e β que são os mais bem caracterizados do tipo I, sendo a sua principal fonte as células plasmocitoides dendríticas. O IFN- γ (tipo II) só é produzido por determinadas células do sistema imune onde se incluem células NK, células Th1, células CD8+ citotóxicas. Há 14 genes diferentes de IFN α , mas apenas um gene do IFN- β e um gene do IFN- γ (Young, 2007).

Os interferões tipo I e II medeiam os seus efeitos através da interacção com receptores específicos e não redundantes. Os ratos *knockout* para receptores α/β ou para receptores do IFN- γ não conseguem estabelecer resposta imune eficaz.

A existência destas famílias de genes leva-nos a considerar que o hospedeiro desenvolveu mecanismos para limitar a extensão da resposta ao IFN. Os do tipo III induzem perfil semelhante de genes aos do tipo I, mas a resposta ao IFN tipo III é mais limitada pois os seus receptores só se exprimem num número limitado de tipos celulares. (Ank et al., 2006)

Os IFN tipo I combatem os vírus directamente através da inibição da sua replicação e indirectamente estimulando a resposta imunológica inata ou adaptativa. Por exemplo induzem a citotoxicidade directa das células NK.

O IFN- γ tem efeitos antivíricos potentes contra a replicação do VHC nos sistemas de cultura (Frese et al., 2002).

Vias de sinalização do interferão

A via activada após interacção de IFN tipo I com o seu receptor é considerada um modelo de sinalização das citocinas. Os receptores dos interferões não têm actividade enzimática, mas desencadeiam uma via de sinalização complexa que culmina na transcrição de centenas de genes denominados de genes estimulados pelo interferão (sinónimo de genes de resposta).

As vias de sinalização e genes de resposta são importantes no desfecho da infecção viral e não apenas a elevação dos níveis de IFN.

A ligação dos IFN aos receptores despoleta a actividade de 2 cinases associadas a estes receptores, Jak1 e Tyk2. Estas cinases fosforilam as proteínas Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), que formam complexo com outra proteína IRF-9. Este complexo designado por ISGF3 entra no núcleo e liga-se a sequências específicas (Interferon Stimulated Response Element, ISRE) na região promotora de múltiplos genes. Centenas de genes são expressas em resposta a activação de STAT por IFN tipo I. Outros membros da família STAT são activados pelos IFN, incluindo STAT3, STAT 4 e STAT5 desencadeando um reportório mais vasto de activação de genes.

O IFN também induz a expressão de proteínas que inibem a actividade do IFN. Os *Suppressor of Cytokine Signalling (SOCS)* inibem a activação de STAT e a *Protein Inhibitor of Activate STAT (PIAS)* bloqueia a actividade transcricional de STAT (Gale, Jr. & Foy, 2005).

A análise de expressão de genes estimulados pelo IFN por RT-PCR quantitativa em chimpanzés mostra que durante a infecção para além de produção endógena de ISG há também uma indução exagerada de SOCS-3 (supressor of cytokine signalling-3), directamente por mecanismo viral ou através de factor solúvel como IL-6.

Efeitos do interferão

O efeito principal do IFN é a indução de genes com actividade antiviral. Genes como PKR (proteína cinase R), MxA, ARNse L/2-5OAS e helicases de ARN foram caracterizados. De forma surpreendente os IFN tipo I não têm a mesma potência quanto à sua capacidade antiviral apesar de interagirem com os mesmos receptores.

Os IFN tipo I possuem efeitos antiproliferativos e apoptóticos. Também aqui existem diferenças entra as várias subespécies, embora a relativa potência neste efeito não se correlacione com o efeito antivírico.

Os IFN tipo I diferem também na capacidade de indução de produção de IFN- γ e de indução actividade lítica pelas células NK. Desconhecem-se os motivos porque isto acontece (Takaoka & Yanai, 2006).

Reflectindo uma íntima relação entre vírus e hospedeiro, as células deste desenvolveram mecanismos de sinalização para detectar e responder às infecções víricas, envolvendo o diálogo entre diferentes vias celulares para modular a expressão e o efeito antiviral dos interferões e produtos de genes induzidos pelos interferões.

Após infecção vírica, os genes do IFN- α e β não têm o mesmo nível de expressão ou a mesma cinética. Parece existir retrocontrolo positivo que é crucial e dependente de quantos IRF controlam a expressão. Mas poderá ser mais complexo do que uma mera ansa de retrocontrolo positivo. Os IFN α_4 e β são induzidos precocemente através da acção do IRF3. Mas os outros interferões necessitam que a IRF seja sintetizada e activada, pois ao contrário da IRF3 não está constitutivamente activada e necessita de activação transcricional pela JAK/STAT. O IFN α_4 e β dão o sinal inicial que permite a produção de IRF7, desencadeando deste modo a expressão de toda a gama de interferões e ISG.

Os efectores dos interferões tipo I são os vários ISG (*interferon stimulated genes*). Até ao advento dos microarrays pensava-se que existiam 30-40 ISG, uma fracção dos quais com propriedades antivirais. Mas há centenas de genes regulados pelo IFN o que fez repensar como o interferão interfere com os vírus e vice-versa e que os factores do hospedeiro envolvidos na defesa serão mais extensos do que o previamente pensado.

O gene induzido pelo IFN tipo I mais estudado é proteína cinase de serina treonina activada por ARN ds (PKR). O PKR activado pode inibir vias reguladoras celulares, primariamente a tradução do ARNm e acontecimentos de transcrição. Como o próprio IFN, ARN específicos dos vírus também activam a PKR, que inibe a replicação e a produção de progenia viral. Quase todos os

vírus desenvolveram estratégias de redução da actividade do PKR de forma a que a sua replicação não esteja comprometida. Há vários reguladores celulares, activadores ou inibidores do PKR.

Outra via crucial envolve a resposta mediada pelo IFN que causa degradação do ARNm, e que compreende 2 enzimas a 2`5` OAS (*oligoadenilato sintetase*) e a RNase L. É activada pelo ARN ds. Pensava-se que esta via só estaria relacionada com degradação do ARN viral, mas os ARN celulares são também seus alvos, podendo assim condicionar a regulação celular.

As proteínas de resistência ao mixovirus (MxA) são GTPases induzíveis pelo IFN. A sua actividade antiviral requer função enzimática. A sua função foi inicialmente determinada nos vírus de influenza Togoto. A proteína MxA liga-se a proteínas da nucleocápside de *bunyavirus*, causando redistribuição das proteínas desta como mecanismo de inibição da replicação. As diferenças entre proteínas MxA de rato e homem, entre formas nucleares e citoplasmáticas, e o espectro de vírus negativamente afectados por estas proteínas, tornam tudo isto mais complexo.

Outro gene induzido pelo IFN é a adenosina deaminase específica do ARN- ADAR. O seu potencial antiviral ainda necessita de caracterização. A ADAR está envolvida na edição do ARN dada a sua capacidade de desaminação da adenina em inosina, o que permitirá alteração da actividade funcional de ARN. O processo de edição ocorre em ARN víricos, particularmente nos genomas com cadeia ARN negativa. Estas modificações podem estar relacionadas com a persistência de infecção e/ou ser o mecanismo de inactivação do ARNm em fases tardias de infecção.

Os interferões têm potentes acções imunomoduladoras. É provável que envolvam não só a imunidade adaptativa mas também a inata. As moléculas do MHC classe I e II apresentam, péptidos antigénicos derivados da degradação de proteínas virais, às células T CD8 e CD4 respectivamente. Durante uma infecção viral são activadas células T CD8 restritas de classe I, e T CD4 restritas de classe II. O IFN aumenta a expressão de MHC classe I e II, aumentando a resposta celular *in vivo*. Esta acção poderá ser um evento tardio no reportório do hospedeiro, contribuindo

primariamente para a recuperação da infecção e não apenas para a resposta inicial de defesa do hospedeiro (Billiau, 2006).

Conhecem-se 10 factores reguladores do IFN (Interferon regulating Factors). IRF1 e IRF2 foram as primeiras a serem identificadas pela sua capacidade de activação e repressão da transcrição, respectivamente. São extremamente importantes durante a infecção e são alvos de regulação pelos vírus. Alguns vírus com o herpes humano 8, vírus herpes relacionado com sarcoma de kaposi codificam homólogos de IRF que actuam como iscos, evadindo-se das defesas do hospedeiro.

IRF1, IRF3, IRF5, IRF7 actuam na transdução de vias de sinalização viral. Em resposta à infecção estes factores de transcrição são fosforilados, migram para o núcleo, onde activam ou reprimem a transcrição de IFN ou dos genes regulados pelo IFN.

A análise de expressão genómica em chimpanzés inoculados com VHC mostra que há uma forte resposta de IFN tipo I (α/β), mas com resistência dos alvos a montante deste (Chisari, 2005).

O perfil de expressão de genes estimulados pelo interferão em células com replicação subgenómica do VHC (Huh7/Rep) e a capacidade de supressão da replicação viral foi estudado. A análise por real-time PCR em tempo real mostrou níveis de expressão de 23 genes significativamente menores em células Huh7 com replicação do que nas células Huh7 naive devido a supressão da transcrição de *interferon-stimulated response element* (ISRE). A expressão de ISG também diminuía em células Huh7 curadas nas quais a réplica era eliminada (cHuh7), indicando a adaptação das células à replicação através de subregulação de ISGs. Por outro lado a expressão de réplicas do VHC era significativamente suprimida pela maior expressão de várias ISGs como PKR, MxA, IRF-9, GBP-1, IFI-6-16, IFI-27, 2,5-OAS e IRF-1. A abolição de GBP-1, IFI-6-16 e IFI-27 por ARN de interferência conduzia a maior replicação do VHC. Assim parece que a subregulação da expressão de ISG é necessária para que a célula suporte a replicação do VHC e que vários ISG

directamente suprimem a replicação do VHC. A procura de ISG que regulem a replicação do VHC poderá ajudar a elucidar os mecanismos celulares de defesa antiviral. (Itsui et al., 2006).

D.3. Relação da imunidade inata e adquirida na Hepatite C crónica

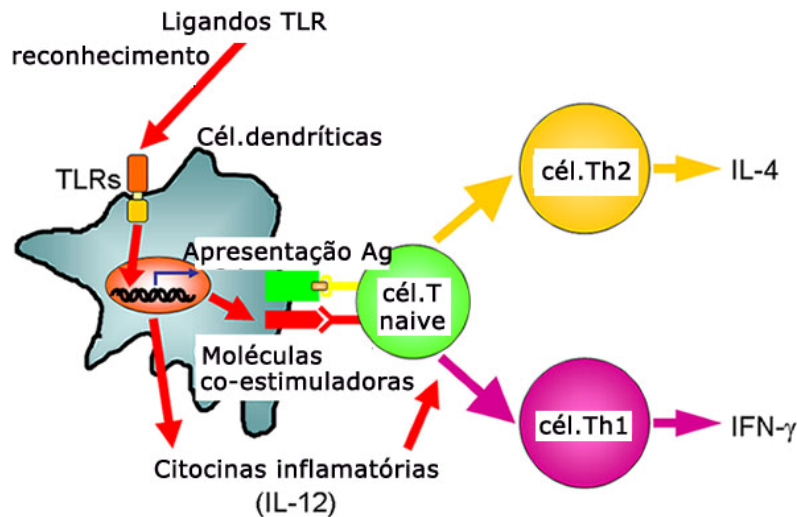


Figura 4: a ligação entre imunidade inata e adquirida através dos TLR (*toll-like receptors*). Adaptado de Akira S.

A persistência do VHC está associada a alterações nas respostas imunes inata e adaptativa que contribuem para a falência do hospedeiro na eliminação do vírus. Estas alterações foram demonstradas em vários níveis como se resume no Quadro 4 e Quadro 6. Os monócitos e macrófagos, células do sistema imune inato que exprimem TLR, eliminam agentes patogénicos e produzem IFN tipo I, citocinas pró -inflamatórias, enquanto as células dendríticas são fundamentais na activação de células T específicas e na apresentação de antígenos. As células dendríticas activadas fornecem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa e no final surgem linfócitos T específicos de antígeno.

Nos modelos de processamento antigénico e de sua apresentação com moléculas de MHC classe I, via TAP (*transporters associated antigen processing*) ou independente de TAP, as células infectadas pelos vírus não são apenas uma fonte passiva de antígenos mas influenciam a qualidade e especificidade da activação das células T através da apresentação de epítomos pré-

processados. (Racanelli & Rehmann, 2006). Um efeito adjuvante foi associado à morte da célula infectada, contribuindo para a quebra de tolerância e induzindo resposta imune. (Shi et al., 2003).

A resolução da infecção pelo VHC está associada a respostas celulares T abrangentes e intensas com produção de IFN- γ . Estas respostas estão diminuídas em doentes com HC (Dustin & Rice, 2007). As células dendríticas desempenham um papel crítico na produção de IL-12 e na diferenciação Th1. *In vitro*, a supressão de produção de IL-12 pelas células dendríticas correlaciona-se com menor produção de IFN- γ pelas células T, mas a adição de IL-12 permite restaurar diferenciação Th1 (Waggoner et al., 2005).

As células dendríticas, plasmocitoides e mielóides têm defeitos funcionais nos infectados com VHC. As proteínas do core e NS3 inibem a diferenciação das células dendríticas mielóides conduzindo a fenótipo que produz mais IL-10 e menos IL-12 e com menor capacidade de activação de células T. O número de células dendríticas plasmocitoides, o tipo celular que produz as maiores quantidades de INF- α no sistema imune, está reduzido nos infectados com VHC. Por outro lado respondem a ligandos TLR8/9 com produção reduzida de INF α e aumento da apoptose. A inibição da produção de INF α pelas células dendríticas plasmocitoides pela proteína do core é mediada por IL-10 e TNF- α (Dolganiuc et al., 2003), (Dolganiuc et al., 2006) (Dolganiuc et al., 2004).

As células T CD4⁺ são divididas em grupos com funções efectoras distintas. As células Th1 segregam predominantemente IL-12, IL-3, TNF- α e IFN- γ controlando funções mediadas por células como por exemplo a activação de macrófagos. A secreção de IL-4, IL-5, IL-13 pelas células Th2 leva à estimulação da imunidade humoral ajudando a activação das células B e o *switch* de classe. (Gutcher & Becher, 2007). As células Th1 induzem uma resposta pró-inflamatória como por exemplo de tipo hipersensibilidade retardada, enquanto as Th2 mediam reacções alérgicas e respostas contra helmintas.

O(s) mecanismo(s) pelo(s) qual(ais) as células apresentadoras de antígenos influenciam a polarização de células Th começou recentemente a ser elucidado. Um factor secretado pelas células T, denominado Eta1/ osteopontina promove a diferenciação Th1. Simultaneamente, induz a secreção de IL-12 e inibe a secreção de IL-10 pelas células apresentadoras de antígenos. Os ratos deficientes em Eta-1 não têm respostas de hipersensibilidade de tipo retardado Th1 quando infectados por agentes patogénicos como *Herpes simplex* e *Listeria monocytogenes*.

Na Figura 5 estão descritos os ligandos, receptores, e factores de transcrição envolvidos na diferenciação Th1 e na produção de IFN- γ .

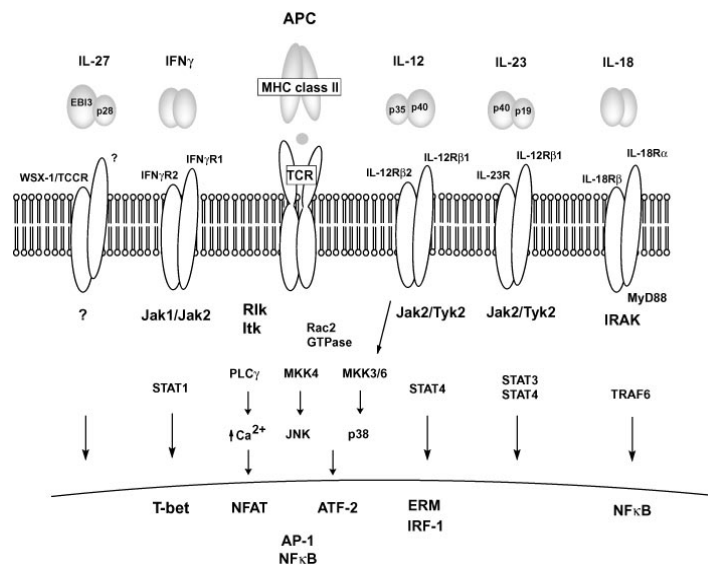


Figura 5: Vias de sinalização implicadas na tradução de sinal Th1. Os ligandos, receptores e factores de transcrição envolvidos na diferenciação Th1 e na produção de IFN- γ (Szabo et al., 2003).

As citocinas IL-12 e IL-18, induzidas por acção de agente patogénico invasor, actuam nas células do sistema imune inato que em resposta produzem e secretam níveis significativos de IFN- γ , mesmo antes do desenvolvimento de resposta imune adaptativa. Esta fonte inicial de IFN- γ serve dois propósitos: a activação autócrina, permitindo amplificação precoce da resposta

inflamatória local, e influenciar a resposta adaptativa fornecendo uma fonte de IFN- γ para início de uma resposta Th1 apropriada.

As células Th *naïve* em repouso têm receptores de IFN- γ e IL-4. O IFN- γ (produzido pelas células NK, dendríticas, ou macrófagos) sinaliza no contexto da activação dos TCR, um regulador específico de Th1, o T-bet. Este induz a remodelação da cromatina na área do *locus* do gene do IFN- γ , transactiva o gene IFN- γ , e induz a expressão da cadeia $\beta 2$ do receptor da IL-12 (Figura 6). A IL-12 das células dendríticas/macrófagos actua no desenvolvimento das células Th1 através da activação de STAT4, aumentando os níveis de IFN- γ e induzindo a expressão da cadeia α do receptor de IL-8. A sinalização através de receptores de IL-12 e IL-8 das células Th1 efectoras induz níveis elevados de IFN- γ independentemente da activação via TCR (Szabo et al., 2003).

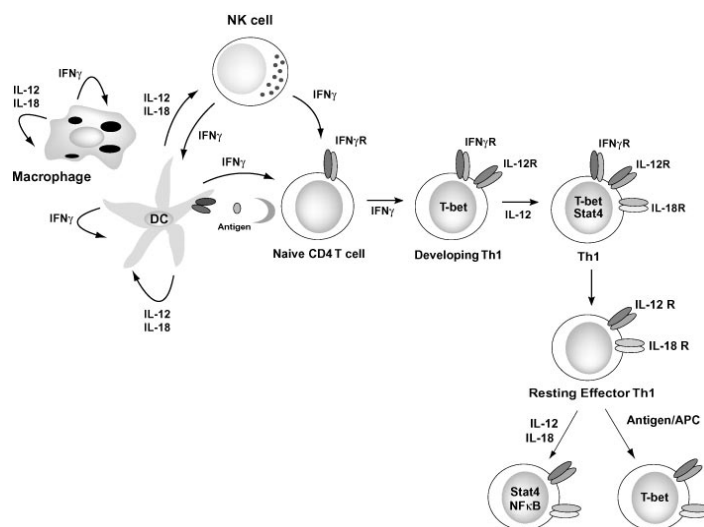


Figura 6: Influências do sistema imune inato na indução e progressão do desenvolvimento Th1. (Szabo et al., 2003).

Um terço dos doentes com HC, têm resposta T CD4 específica para o VHC detectável no sangue periférico, mais frequentemente dirigida contra o antígeno do core. Esta preferência pelo core também existe nos linfócitos T CD4 hepáticos. A resposta dos T CD4 específicos do VHC é predominantemente de tipo 1 (isto é mais IFN- γ) independentemente da evolução da vire-

mia. Contudo, a magnitude da resposta de IFN- γ , isto é nº de células correlaciona-se significativamente com recuperação ou persistência do vírus (Chang, 2003).

Na HC há uma má resposta T CD8 mas que parece ser apenas relativamente ao VHC, pois os mesmos doentes respondem bem a outros vírus como os da influenza, EBV, HIV. No fígado há menor número de T CD8 (1-2 log menor) possuindo também um fenótipo mais activo.

Na HC as citocinas Th1 são estimuladas por proteínas do VHC (core, E1 e E2). A expressão intra-hepática de resposta Th1 foi mostrada por (Napoli et al., 1996) enquanto na periferia predomina uma resposta Th2 que pode estar associada a manifestações extra-hepáticas.

No estudo de uma amostra de doentes portugueses com HC observou-se uma tendência para a polarização Th1 naqueles com resposta terapêutica mantida ou com ALT normal (Marinho et al., 2004b). Numa avaliação prospectiva durante a terapêutica antiviral observou-se naqueles com resposta mantida o aumento de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- γ) específicas para core e NS3, o que aponta para forte indução da diferenciação Th1 (Marinho et al., 2004a). Nos não respondedores houve predomínio de IL-10 durante o primeiro mês de terapêutica.

Os anticorpos contra uma variedade de antígenos do vírus são detectados por ELISA são na prática usados na detecção da infecção. A maioria dos doentes seropositivos tem viremia positiva, mas tal não se correlaciona com a evolução clínica. Há dados que mostram existirem anticorpos neutralizantes (ex contra região HVR E2) que serão ultrapassados por rápida selecção de variantes de escape.

D.4. Mecanismos de Evasão do VHC – Interferência Viral

Os vírus conseguem bloquear as quatro partes do sistema do IFN (bloqueio da síntese, receptores de IFN que actuam como iscos (*decoy*), bloqueio da sinalização e bloqueio das funções das proteínas induzidas pelo IFN) como se descreve na Figura 7.

É concebível que o HCV se aproveite de defeitos na imunidade inata para atrasar a organização de uma resposta adaptativa eficaz. (Dustin & Rice, 2007). O ambiente toleragénico hepá-

tico e a grande diversidade do vírus contribuem para tal. A presença de níveis elevados de anti-génios pode contribuir para exaustão imune.

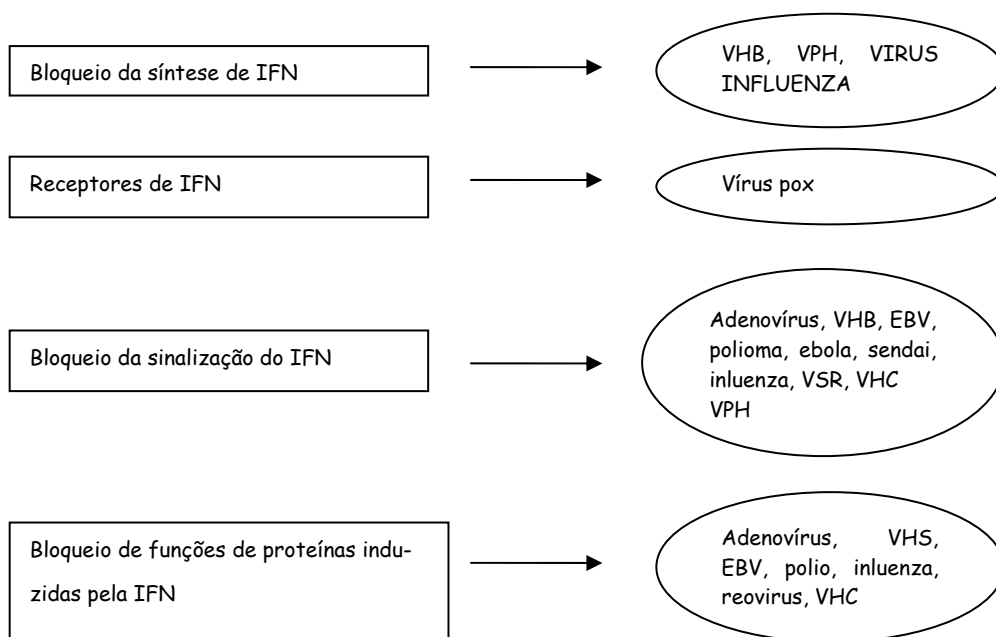


Figura 7: *interferência viral com o sistema do IFN. Adaptado de (Sen, 2001)*

Uma das características fundamentais do VHC é a sua capacidade de modificar o meio intracelular de forma a favorecer a replicação e promover a sua persistência a longo prazo. A sua capacidade de evasão imune é multifactorial e envolve disrupção das vias de sinalização que induzem respostas inatas antivirais, evasão de respostas efectoras mediadas pelo interferão, e mecanismos pouco conhecidos que atrasam as respostas células T adaptativas e as tornam insuficientes para a eliminação do vírus (ver Figura 7) (Sen, 2001).

A produção local de IFN no tecido hepático influenciará a replicação do VHC. A taxa global de resposta à terapêutica com IFN (sobretudo no genótipo 1 de apenas 50%) indica que o vírus consegue evadir-se ou resistir às acções do IFN. O estudo da via de sinalização a partir dos receptores de IFN- α/β tem revelado os mecanismos através dos quais as proteínas do vírus conseguem antagonizar esta via de sinalização.

A evasão da resposta do hospedeiro envolve várias estratégias dirigidas pelas proteínas virais para controlar a expressão e função de ISG como se descreve sucintamente Quadro 3.

Por exemplo as sequências do VHC genotipo 1 têm menor numero de locais para a ligação de RNaseL (2,5 OAS/RNaseL) do que genótipos 2 e 3. Este facto poderia explicar a menor taxa de resposta de genótipo com menos locais de ligação. (Han et al., 2004)

Quadro 3: Regulação de ISG pelo VHC

<i>Estratégia do VHC</i>	<i>Proteína do VHC</i>	<i>Implicações</i>
Indução de IL-8	NS5A	Atenuar expressão de ISG
Indução de SOCS 1 e 3	core	Bloqueio sinalização Jak-STAT
Inibição de PKR	NS5A e E2	Disrupção do controlo efectuado pelo PKR
Regulação de IRF-1	NS5A	Alívio da supressão da replicação viral pelo IRF-1
Evasão da via sinalização 2,5 OAS/RNase L	Genoma do VHC	Genoma tem poucos locais de ligação para 2,5 OAS/RNase L, protegendo-se do processamento nucleolítico
Alteração da função de STAT1	várias	Indução de PP2A e hipometilação de STAT1
Supressão da expressão de ISG56	não estruturais	Remoção do bloqueio da ISG 56 na tradução do ARN viral
Regulação da sinalização RIG-I	NS3/4 A	Bloqueio de loop de amplificação do IFN
Regulação de sinalização TLR3	NS3/4 A	Clivagem de TRIF, e inibição da via de amplificação de IFN dependente de TLR3

Adaptado (Gale, Jr. & Foy, 2005)

Na Quadro 4 resumem-se defeitos de imunidade inata e adaptativa durante a infecção pelo VHC baseados em dados *in vivo* e *in vitro*.

Quadro 4: Mecanismos de subversão do sistema imune usados pelo VHCImunidade inata

- Proteínas estruturais e não estruturais inibem funções das células dendríticas derivadas dos monócitos
- Redução da capacidade de apresentação de antígenos pelas células dendríticas derivadas dos monócitos
- Produção excessiva de IL-10 e diminuída de IL-12 pelas células dendríticas derivadas dos monócitos
- Perda de células dendríticas plasmocitoides circulantes
- Aumento relativo das células dendríticas no fígado
- Supressão das células NK pelas células dendríticas
- Baixa produção de IFN- γ pelas células NKT

Imunidade adaptativa

- Proteínas estruturais e não estruturais do VHC suprimem funções das células T
- Defeito funcional das células T CD4
- Diminuição da produção de IL-12
- Alterações do tráfego das células T
- Expansão das células T reguladoras CD4+CD25+
- Anergia das células T CD8+
- Delecção de células T CD8+ específicas do VHC
- Expansão de células T CD8+ produtoras de IL-10
- TCR das células T CD8+ com clonotipo restrito

Adaptado de (Szabo & Dolganiuc, 2006)

E. Resposta à terapêutica da hepatite C crónica

O objectivo da terapêutica da HC é inibir e erradicar a replicação viral e reduzir a actividade da doença hepática. Pensa-se que esta última conduz à redução do risco de cirrose e consequentemente do risco de carcinoma hepatocelular. Os estudos de seguimento a longo prazo mostram que a resposta virológica sustentada se associa a melhoria clínica e histológica e a erradicação da infecção pelo VHC. Apesar de avanços significativos no tratamento, quase 50% dos doentes falham a terapêutica e permanecem cronicamente infectados (Dienstag & McHutchison, 2006).

E.1. Factores predizentes usados habitualmente

Como um número significativo de indivíduos não responde à terapêutica, tem recidiva virológica ou suspende a terapêutica na sequência de efeitos adversos torna-se relevante definir o mais precocemente possível e idealmente antes do seu início quais não irão responder, evitando não só custos económicos mas também de efeitos laterais deletérios. As análises baseadas em índices de qualidade de vida demonstram que esta é pior durante o período de terapêutica.

Factores predizentes pré-tratamento

A probabilidade de resposta virológica sustentada depende do genótipo. Nos portadores de genótipo 2 e 3 a resposta sustentada atinge 80% enquanto no genótipo 1 é de apenas 50% quando tratados com interferão peguilado e ribavirina durante 24 ou 48 semanas de terapêutica respectivamente. Os genótipos 2 e 3 têm taxas de resposta maiores com doses menores de ribavirina. A idade jovem, o sexo feminino e viremia baixa também se associam a maior taxa de resposta.

Outras variáveis pré-tratamento têm também impacto na resposta incluindo a raça (Afro-americanos e latinos com pior resposta (Cheung et al., 2005)), a não-resposta a tratamentos anteriores, a imunodeficiência (HIV, portador de órgão sólido transplantado), a obesidade (IMC > 30 Kg/m²) (Bressler et al., 2003), a esteatose hepática (Westin et al., 2007), o abuso de álcool (Anand et al., 2006) e o consumo de canabinoides (Hezode et al., 2005).

Cada vez mais a monitorização dos doentes durante a terapêutica tem permitido a individualização dos esquemas terapêuticos (Stauber & Stadlbauer, 2006). Nesta abordagem são importantes os modelos de cinética do VHC sob terapêutica e que condicionam decisões de manter ou não sob terapêutica (Herrmann & Zeuzem, 2006) (Perelson et al., 2005).

Cinética viral e regras de suspensão da terapêutica

Os estudos mais antigos definiam como objectivo terapêutico a normalização da enzimologia hepática. Os parâmetros habitualmente examinados nos estudos de resposta à terapêutica são parâmetros de cinética do VHC:

- Resposta virológica sustentada - ARN-VHC indetectável no soro 6 meses após descontinuação da terapêutica.
- Resposta virológica precoce - declínio de pelo menos 2 log₁₀ da viremia basal (UI) pré-tratamento à 12^a semana
- Resposta virológica rápida - viremia indetectável 4 semanas após o início de terapêutica.
- Não respondedores - viremia detectável às 12 semanas

A resposta virológica precoce é o melhor factor predizente de resposta viral sustentada. A sua ausência, isto é redução menor que 2 log₁₀ na viremia à 12^a semana após início da terapêutica associa-se a probabilidade quase nula de resposta virológica sustentada. Nessa fase o tratamento é descontinuado pois as hipóteses de resposta sustentada são no máximo de 3%. Contudo o valor predizente positivo é baixo e esta informação só está disponível após 12 semanas de terapêutica.

Mais recentemente há estudos e indicações aprovadas para tratamentos mais curtos se há resposta virológica rápida. Esta é avaliada após 4 semanas de terapêutica e é positiva se não existem cópias de ARN em circulação usando métodos sensíveis.

Nos últimos anos têm surgido estratégias de individualização da terapêutica, existindo evidência de ser possível reduzir a sua duração de 24 para 12 ou 14 semanas no genotipo 2 e 3, e de 48 para 24 semanas no genotipo 1.

Com base em dados clínicos e de cinética viral desenvolveram-se dois modelos predizentes de resposta em infectados com genotipo 1: modelo pré-tratamento e modelo 4 semanas. Valores menores eram associados a resposta sustentada. A área sob a curva ROC foi 0,847 e 0,907, respectivamente. Os melhores pontos de corte (pré-tratamento <7 e <2,2 à 4^a semana) têm o valor predizente positivo de cerca de 90% (Martinez-Bauer et al., 2006).

Modelo pré-tratamento:

4,07+ 2,284(lnAST/ALT) - 0,027 (colesterol) + 1,353 (log₁₀ ARN)+ 0,493 (índice previsão de fibrose)

Modelo às 4 semanas: -8,158+0,839 (modelo pré-tratamento) + 3,019 (clearance ARN)

Os estudos demonstram que genótipo e carga viral são factores independentes de resposta, mas desconhece-se porque é que para o mesmo genótipo e carga viral semelhante diferentes hospedeiros têm diferentes respostas ao tratamento. Factores do vírus e do hospedeiro têm sido avaliados quanto ao seu potencial papel nesta fase e que estão descritos no Quadro 5.

Quadro 5: Factores que influenciam a terapêutica

Factores do VHC	Factores do Hospedeiro
Genótipo	Sexo
Carga viral	Idade
Alterações dinâmicas quantitativas (decréscimo da carga viral)	Fibrose
Alterações dinâmicas qualitativas (evolução das quasiespecies)	IMC
Mutações em NS5A	Raça
Mutações em E2	Comorbilidades
Interferência com vias de sinalização	

adaptado de (Capobianchi et al., 2003)

Foram associados a menor resposta para além de genótipo 1 e viremia elevada, a maior diversidade de quasiespecies, as variações na sequência NS5A- *interferon sensitivity determining domain*.

O mecanismo preciso pelo qual o VHC é frequentemente não respondedor às acções antivirais do IFN ainda não está completamente esclarecido. Os dados apontam para que proteínas virais são capazes não só de bloquear os passos a montante na síntese de genes do IFN como IRF-3, Cardif/MAVS, mas também afectar alvos a jusante. Estes incluem proteínas de transdução de sinal bem como genes estimulados pelo IFN como PKR e eIF-2 α .

STAT (signal transducers and activators of transcription) são activados a nível do receptor por membros da família Jak cinase através da fosforilação de um único resíduo de tirosina. As STAT fosforiladas formam dímeros, translocam-se para o núcleo, e activam genes alvos do IFN através da ligação a elementos de resposta nos seus promotores. Os membros da família de supressão do sinal das citocinas (SOCS) e proteína inibidora de STAT1 activado (PIAS1) são reguladores negativos importantes da via jak-STAT. Os membros da SOCS actuam ao nível do

complexo da cinase do receptor por ligação quer ao receptor quer à Jak cinases inibindo a fosforilação (tirosina) de STAT1. PIAS1 liga-se a STAT1 activada (fosforilada em tirosina) e inibe a ligação do dímero a ISRE. A ligação de STAT1 a PIAS1 é regulada por outra modificação pós-traducional de STAT1, que é a metilação de arginina, processo que é catalisado pela arginina metiltransferase (PRMT1) (Christen et al., 2007).

Vários estudos demonstraram que proteínas do VHC expressas individualmente ou como parte da poliproteína são capazes de limitar a via de transdução de sinal IFN do tipo I a vários níveis (ver Quadro 3). Dependendo do modelo em análise, a expressão de proteína do core está associada a diminuição de STAT-1 e de acumulação de P-STAT-1 bem como diminuição de ligação de ISGF3 a ISRE. A proteína do core liga-se directamente ao domínio SH2 da STAT1 sendo provavelmente este o modo de impedir a sua fosforilação. Outra evidência de subversão das vias de sinalização do IFN é o facto de a poliproteína do VHC aumentar a proteína tirosina fosfatase 2 A (PP2A), que hipometila STAT1 e promove a sua ligação ao inibidor PIAS1 (proteína inibidora de STAT1 activado). Colectivamente as perturbações de STAT1 mediadas pelo VHC resultam na perda de compromisso do complexo ISGF3 com ISRE e da transcrição de ISG.

Se a variação genética na expressão destas moléculas de sinalização também contribui para menor resposta ao IFN é um aspecto que aguarda mais investigação, mas os primeiros estudos sugerem que a activação de STAT1 pode estar diminuída nas células mononucleares periféricas de afro-americanos quando comparados com caucasianos também infectados pelo VHC.

E.2. Factores genéticos do hospedeiro

Níveis séricos de citocinas

Foi possível correlacionar níveis séricos pré-tratamento de citocinas e supressores das suas vias de sinalização como SOCS (Walsh et al., 2006) (Walsh et al., 2005) e IP-10 (Lagging et al., 2006) (Lagging et al., 2006; Romero et al., 2006), (Diago et al., 2006) com o tipo de resposta à terapêutica. Os níveis de quimiocinas que se ligam a CXCR3 (os ligandos CXCL10 e CXCL9) dimi-

nuem após terapêutica com sucesso. O nível basal de CXCL10 era mais elevado nos não respondedores (Butera et al., 2005). Os níveis de PKR pré-terapêutica são mais elevados nos não respondedores (Asahina et al., 2007).

Os níveis séricos de TGF- β não se correlacionam com a resposta à terapêutica, embora tenham relação directa com propeptídeo amino-terminal do procologénio (PIIPI) e inversa com a IL-10 (Conde et al., 2007).

Factores genéticos do hospedeiro

Vários estudos têm tentado identificar factores do hospedeiro na resposta à terapêutica como a raça (Cheung et al., 2005), análise de expressão génica (Chen et al., 2005), (Shackel et al., 2002), (Smith et al., 2003), alelos HLA-DRB (Jiao & Wang, 2005) (Yee, 2004), HLA classe I (Romero-Gomez et al., 2003), polimorfismos de genes de citocinas como IFN γ (T por A na posição +874) (Dai et al., 2005), TNF- α (Yu et al., 2003), (Larrea et al., 1996), (Rosen et al., 2002b), (Schiemann et al., 2003), de genes de resposta ao interferão (Patzwahl et al., 2001). A análise de expressão génica por microarrays permitiu usar 8 genes como discriminantes de resposta (Chen et al., 2005).

Alguns polimorfismos genéticos estão associados a resposta no genótipo 1: o polimorfismo G/G no nt-88 e C/C no nt-123 da região promotora de MxA é mais frequente nos não respondedores. Noutro estudo o polimorfismo no nt -88 da região promotora de gene MxA (G/T) era factor independente de resposta e naqueles com viremias menores a presença de T estava associada a maior probabilidade de resposta (Suzuki et al., 2004).

No polimorfismo de GNB3 (subunidade beta3 da proteína G) na posição 825, o genótipo CC está associado a não resposta (Sarrazin et al., 2005).

Um estudo japonês (Naito et al., 2005) que avaliou polimorfismos de vários genes (osteopontina, MxA, MBL e LMP7) mostrou resposta virológica sustentada mais elevada em portadores de alelos G/G e G/A na posição -1748 do gene da Osteopontina que nos A/A (85% vs 45%). Estas

diferenças eram particularmente evidentes nos genótipos 1b com carga viral pré-tratamento superior a 100 KIU/mL. Todos os doentes com G/G ou G/A no nucleotídeo - 1748 e T/T no -443 tiveram resposta virológica sustentada. Não se observou relação com polimorfismos de MxA, MBL ou LMP7.

Os resultados de vários estudos são conflituosos. Uma das explicações possíveis é terem sido efectuados em populações diferentes com frequências génicas diferentes para os genes estudados. Foram constatadas diferenças na prevalência de polimorfismos de promotor do TNF- α , IL 10, TGF- β em populações caucasianas e egípcias (Zein et al., 2004). Há variações geográficas na distribuição dos genótipos virais, e é possível que estas mascarem associações de factores genéticos do hospedeiro. Um exemplo de associações contraditórias é o de um estudo avaliando a resposta a monoterapia com interferão que encontrou associação entre alelos do promotor de IL10 (-592A e -819T) com a resposta inicial (Knapp et al., 2003).

Quadro 6

Gene candidato	Função proteína	Tipo de doença	Associação	Nº de estudos
TNF- α	Pró-inflamatória	DHA	Positiva	2
			Ausente	3
		HC	Positiva	4
			Ausente	11
		NAFLD	Positiva	1
		HH	Positiva	1
			Negativa	1
		CBP	Ausente	2
			Positiva	1
			Oposta	1
Ausente	2			
TNF- β		HC	Positiva	1

DHA- Doença Hepática alcoólica, NAFLD- esteatose hepática não alcoólica, CBP- cirrose biliar primária, HH- hemocromatose hereditária, HC- hepatite C crónica. Adaptado de(Osterreicher et al., 2007)

Já em doentes tratados com interferão e ribavirina (Yee et al., 2000) constataram que a presença de um destes alelos conferia vantagem na resposta sustentada (OR de 16,6 para homozigotia e OR 13,7 para o haplotipo).

Os 2 estudos para investigar papel do TNF- α não encontraram relação com a resposta à terapêutica. (*Osterreicher et al., 2007*)

Na Quadro 6 faz-se um resumo de Correlação Genótipo do TNF- α -Fenótipo nas doenças Hepáticas crónicas.

Vários outros polimorfismos genéticos foram já avaliados na HC como descrevemos sumariamente Quadro 7.

Quadro 7

Gene candidato	Função proteína	Associação	Nº de estudos
TNF- α	Pró-inflamatória	Positiva	4
		Ausente	11
TNF- β		Positiva	1
GSTP1	Stresse oxidativo	Ausente	1
MnSOD	Stresse oxidativo	Ausente	1
IL10	Anti-inflamatória	Positiva	2
		Oposta	1
		Ausente	4
Receptor de IL10	Anti-inflamatória	Positiva	1
IL12	Pró-inflamatória	Positiva	1
IL1 beta	Pró-inflamatória	Positiva	1
IL1 Ra	Pró-inflamatória	Positiva	1
IFN- γ	Pró-inflamatória	Positiva	1
		Ausente	3
CTLA-4	Resposta imune	Positiva	1
TGF β	Profibrogénica	Positiva	2
		Ausente	2
angiotensinogénio	Profibrogénica	Positiva	1
		Ausente	1
HFE	Metabolismo do ferro	Positiva	7
		Ausente	2
MMP-1,-3,-9	Turnover da matriz	Positiva	1
PDGF	Profibrogénica	Positiva	1
MCP-1			(pós-transplante)

Adaptado de (Osterreicher et al., 2007)

As tecnologias de alto débito têm também sido usadas na abordagem dos problemas associados à infecção pelo VHC nas suas várias formas, quer no Homem, quer nos modelos experimentais. O *gene expression profiling* (microarrays e/ou RT-PCR em tempo real e em larga escala) tem sido usado na abordagem das vias celulares alteradas na génese de doenças. A RT-PCR quantitativa

va em tempo real é uma metodologia complementar dos microarrays, porque será mais precisa, sensível, reprodutível, quantitativa, e que requer quantidades menores de ARN.

Após infecção aguda com VHC os chimpanzés podem evoluir para infecção persistente, depuração viral transitória ou persistente. A análise de expressão génica durante este processo identifica respostas comuns e outras específicas de evolução. Todos apresentavam padrões consistentes com activação de resposta de IFN- α . A depuração estava associada a genes induzidos pelo IFN γ e outros genes relacionados com o processamento e apresentação de antígenos e a resposta imune adaptativa. Nas fases precoces de infecção os genes do hospedeiro envolvidos no metabolismo lipídico também eram diferencialmente regulados (Su et al., 2002).

Ao nível da expressão de genes a HC é caracterizada por maior expressão de genes associados a inflamação e resposta imunológica, particularmente de genes sensíveis ao IFN (ISG). Um subgrupo de ISG está particularmente aumentado nos fígados de não respondedores.

No estudo de Chen I et al (Chen et al., 2005) a análise de expressão génica foi efectuada em fragmentos de biópsia hepática colhidos antes da terapêutica. Compararam-se 15 não respondedores, 16 respondedores e 20 biópsias hepáticas normais. A expressão génica diferencial foi confirmada por RT-PCR. Identificaram-se 18 genes, muitos deles genes sensíveis ao IFN e 3 (ISG15, USP18/UBP43 e CEB1) ligados à mesma via, sugerindo um racional possível para resistência à terapêutica. A USP18/UBP43 é uma protease que remove a ISG 15 (tipo-ubiquitina) das proteínas - alvos. CEB1 é uma ligase E3 que transfere ISG 15 activas para as suas proteínas -alvo. Em culturas celulares, a redução de USP18/UBP43 potencia os efeitos anti-VHC do IFN- α (Randall et al., 2006). A expressão de ISG15 (UCRP), uma proteína tipo ubiquitina e a ligação de proteínas a ISG está muito aumentada após uma infecção viral. (Ritchie et al., 2004)

Um grupo analisou 69 biópsias pré- terapêutica com interferão em monoterapia; 31 das quais usadas para determinar algoritmo de predição da eficácia do IFN e 38 para validação. Posteriormente aplicaram este mesmo algoritmo para predizer da eficácia tratamento com interfe-

ção e ribavirina em 56 biópsias adicionais. No grupo tratado com IFN os genes eram associados ao IFN, metabolismo lipídico, complemento, e genes relacionados com oxi-reductases. Na combinação IFN e ribavirina foi identificado um grupo diferente que incluía ciclofilina A e MDR (Hayashida et al., 2005).

Muitos dos genes diferencialmente expressos em respondedores e não respondedores codificam citocinas e podem constituir uma abordagem lógica no desenvolvimento de marcadores de predição de resposta ao tratamento.

Um estudo que avaliou a expressão génica em células mononucleadas do sangue periférico durante a terapêutica com IFN confirmou a maior expressão de genes estimulados pelo IFN ou envolvidos no processamento e apresentação antigénica. (Taylor et al., 2007) usando microarrays affimetrix e como fonte células mononucleadas periféricas. A expressão de OAS1 e 2, Mx 1 e 2 tem correlação com resposta virológica às 4 semanas.

A diversidade de plataformas de microarrays usadas na análise de expressão génica e a variabilidade dos dados obtidos enfatizam a necessidade de precaução na sua interpretação. É necessária melhorar processos analíticos e validação em grandes grupos de doentes (Yeung & Chung, 2005).

E.3. Polimorfismos estudados neste trabalho

Neste capítulo apresentámos alguns dados sobre o potencial papel dos genes candidatos que seleccionámos para o estudo que efectuámos com o objectivo de determinar se estes factores do hospedeiro condicionam a resposta à terapêutica ou poderão ser factores de susceptibilidade para a HC. Descrevem-se dados prévios sobre o efeito destes genes na fisiologia e patogénese de doenças humanas, incluindo doenças hepáticas.

Osteopontina

A osteopontina (OPN) foi independentemente identificada e estudada por investigadores de várias áreas quanto ao seu papel na resposta imune, na vascularização, na osteogénese e pelas suas interacções com células mononucleadas, endoteliais e ósseas, respectivamente. Compreender a regulação da transcrição do gene da OPN pode ajudar a clarificar vários processos onde foi implicada como a evolução fibrótica após a lesão de órgãos, tumorigénese, metastização, e resposta imune.

A OPN é codificada por um único gene, localizado em 4q21-25, que é altamente conservado nos vertebrados. O promotor responde a diferentes factores de transcrição. Foram descritos polimorfismos no seu promotor que modificam a afinidade para os factores de transcrição SP1/SP3 (posição -66) e outros relacionados com ligação a RUNX2 (posição -156). Este facto poderá contribuir para futuras associações entre haplotipos e não de variantes isoladas nas doenças em que a OPN é considerada candidato a gene de susceptibilidade. (Giacopelli et al., 2004). Na posição +245 (1º intrão) possui um local de reconhecimento para o factor de transcrição C/EBP-beta sem efeito funcional significativo (Giacopelli et al., 2003). A substituição de T por G na posição -66 do promotor aumenta a transcrição nos haplotipos que contêm outros 2 marcadores -443 C e -156 G. (Hummelshoj et al., 2006)

O gene codificador está localizado junto com outros membros da família de proteínas designada por SIBLING, que inclui a sialoproteína óssea e matriz proteica da dentina-1 com as quais partilha características estruturais. Origina diferentes ARN mensageiros por *splicing* alternativo. Outras isoformas surgem após processamento pós-traducional como a fosforilação, a glicosilação e as proteólises pela trombina e metaloproteinases da matriz (MMPs).

O primeiro relato de inactivação dirigida da OPN descrevia atraso da cicatrização de feridas (Liaw et al., 1998). Depois descreveu-se a redução da infiltração por macrófagos e da fibrose intersticial renal em modelos de fibrose renal, a redução da perda de minerais ósseos em

roedoras *null* oofrectomizadas, a resistência à progressão num modelo animal de esclerose múltipla, a deficiente imunidade tipo 1 contra infecções virais e bacterianas e deficiente resposta granulomatosa. Em modelo animal de lesão medular, KO (*knock-out*) e tipo selvagem (wt) para a OPN, verificou-se que tem papel neuroprotector na recuperação de lesão medular. (Hashimoto et al., 2007)

A OPN é uma proteína acídica que é multifosforilada em resíduos de serina e que não tem estrutura secundária extensa. As 2 formas principais diferem em 5 Kda e parecem diferir nas modificações pós-traducionais, glicosilação ou fosforilação. Os pesos moleculares deduzidos de mobilidade em SDS-PAGE variam entre 55 a 80 Kda dependendo das condições de electroforese. É secretada em formas não fosforilada e fosforilada. A fosforilação poderá permitir a associação à superfície celular e não à matriz extra-celular. Consegue interagir com múltiplos receptores estimulando múltiplas vias de sinalização. Assim a natureza do sinal que a OPN transmite para a célula é complexa e dependente do contexto celular.

Encontra-se em todos os tecidos corporais e na matriz de tecidos mineralizados. Intervém em diferentes processos fisiológicos e patológicos, incluindo remodelação óssea, imunidade celular, manutenção ou reconfiguração da integridade tecidual durante processos inflamatórios, reestenose coronária e metastização de células tumorais. Encontra-se imobilizada na matriz extra-celular nos tecidos mineralizados e é mediador importante de interacções matriz-célula e célula-célula mas também actua como citocina nos fluidos corporais. Interage com uma variedade de receptores da superfície celular como $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 9\beta 1$ e CD44. A ligação a estes receptores estimula a adesão celular, a migração, a invasão da matriz extra-celular e a proliferação celular. (Gravallese, 2003). Os eventos de sinalização após a ligação da OPN a receptores de integrinas foram descritos em vários tipos celulares incluindo fibroblastos, osteoclastos, osteoblastos, células endoteliais e de melanoma. Na matriz extra-celular hepática liga-se covalentemente à fibronectina através de formação de ligações cruzadas catalisada pela transgluta-

minase. Integra os sinais da matriz extra-celular e controla quantitativa e qualitativamente as proteínas da matriz, através da sua interacção com receptores como integrinas, CD44 e outros. Deste modo, acelera o processo de remodelação cardiovascular, promove a aterosclerose e também está intimamente ligada à angiogénese. Nos animais sem OPN a remodelação celular é inibida, especialmente a fibrose após enfarte do miocárdio com inibição da deposição de colagénio através de metaloproteinases de matriz (Okamoto, 2006).

Contém um motivo RGD (Arg-Gly-Asp) que é o local de ligação de integrinas permitindo a ligação da OPN a vários tipos celulares. Mas outras sequências podem mediar a adesão como a sequência amino-acídica SVVYGLR. A exposição desta última é consequência da acção da trombina sobre a OPN. Em modelo animal de artrite reumatóide, o anticorpo contra SVVYGLR da OPN previne a formação de infiltrado inflamatório nas articulações. Animais deficientes em OPN têm menor lesão articular do que *wild-type*. Mas este efeito também poderá resultar de deleção de genes polimórficos ligados à OPN (Yamamoto et al., 2003).

A sinalização através da integrina $\alpha v \beta 3$ nas células tipo-osteoclasto foi muito investigada pois esta interacção é potente estímulo de adesão de osteoclastos e de reabsorção óssea.

A interacção dependente de fosforilação entre a porção amino-terminal da osteopontina e seu receptor de tipo integrina estimula a expressão de IL-12, enquanto a interacção com o CD44 independente de fosforilação inibe a expressão de IL-10. Assim a OPN regula a constituição de estado de resposta imune eficiente de tipo 1, através da regulação da expressão de IL-10 e IL-12 pelos macrófagos.

Também é designada por ETA-1 (early T activation-1), um componente precoce da imunidade celular tipo Th1. A sua expressão em células Th1 é 19 vezes maior que nas Th2 (Naito et al). Promove a resposta Th1 induzindo macrófagos a produzir IL-12 e IFN- γ e inibindo a expressão de IL-10 (Ashkar et al., 2000). Ratos deficientes em OPN têm fenótipo caracterizado por grave deficiência da imunidade tipo 1 contra infecções virais (virus herpes simples 1) e bacterianas

(*Listeria monocytogenes*), não desenvolvem granulomas tipo sarcóide e são resistentes ao desenvolvimento de queratite auto-imune (Panoutsakopoulou et al., 2001). Neles a produção de IL-12 e IFN γ está diminuída e a produção de IL-10 aumentada (Ashkar et al., 2000).

A capacidade de um antígeno induzir produção de osteopontina através da ligação ao receptor célula T poderá determinar a duração e intensidade de respostas imunes de tipo 1.

Tanto a forma intracelular como a secretada da OPN afectam as funções das células dendríticas que são cruciais na imunidade adaptativa. Activa as células dendríticas e promove a diferenciação para fenótipo com polarização Th1 (Renkl et al., 2005). A forma intracelular é essencial para a produção de IFN- α por células plasmocitoides dendríticas após infecção viral ou administração de oligonucleotídeos. (Shinohara et al., 2006).

A forma intracelular de OPN é essencial para a produção de IFN pelas células plasmocitoides dendríticas após infecção viral ou administração de oligonucleotídeos CpG. A deficiência de OPN reduz a produção de IFN α , mas mantém-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias dependentes de NF κ B. Após estimulação do TLR9, a Opi (OPN intracelular) e a molécula adaptadora MyD88 associam-se à indução de produção de IFN α . A menor expressão de Opi associa-se a deficient translocação nuclear do IRF7 nas células dendríticas plasmocitoides (Xanthou et al., 2007; Shinohara et al., 2006).

A OPN secretada exerce efeitos opostos sobre respostas Th2, sendo pró-inflamatória na sensibilização sistémica primária, e anti-inflamatória no desafio antigénico secundário. Estes efeitos são mediados pela regulação de células plasmocitoides dendríticas supressoras de Th2 e por células dendríticas convencionais promotoras de Th2, respectivamente. (Xanthou et al., 2007). A administração de OPN recombinante durante a estimulação antigénica secundária diminui as respostas Th2 já existentes e protege contra doenças alérgicas pulmonares. (Xanthou et al., 2007)

In vitro, a OPN recombinante induz maturação de células dendríticas humanas com polarização Th1. Mas a OPN recombinante sem grupos fosfato não é capaz de induzir IL-12, mas mantém a resposta IL-10. O bloqueio de OPN secretada reduz a expressão de moléculas coestimuladoras e de moléculas de MHC classe II em células dendríticas derivadas de monócitos humanas. (Xanthou et al., 2007).

A OPN é quimiotáctica para as células dendríticas. A expressão de OPN em macrófagos e células dendríticas derivadas de monócitos é induzida pela IL-10, de um modo dependente da dose e tempo, mas inibida por IL-4 ou IL-13. Assim a IL-10 e citocinas Th2 poderão regular a função das células dendríticas através de efeitos opostos na expressão de OPN. (Lorena et al., 2006)

O gene da osteopontina é expresso nas células T precocemente no decurso de infecções bacterianas (dentro de 48 horas) e o seu produto proteico leva os macrófagos à indução de respostas inflamatórias. A resistência a certas estirpes de *Rickettsia* pode resultar de atracção de monócitos dependente da OPN para os locais de infecção. As respostas granulomatosas características de sarcoidose e tuberculose estão associadas a níveis elevados de expressão de OPN. A sua expressão é essencial para a formação de granulomas (Th1 dependente) e para a evolução clínica positiva dos doentes com infecções por micobactérias (Nau et al., 2000). A expressão ectópica foi implicada nas lesões granulomatosas da Doença de Crohn (Sato et al., 2005).

A base genética da expressão de OPN por subtipos de células T não é ainda bem compreendida. (Chabas et al., 2001). A indução rápida e específica de polarização Th1 é controlada por sinais do receptor das células T e das vias IFN- γ /STAT-1.

Os factores que contribuem para o desenvolvimento de resposta Th1 podem ser divididos em dependentes de T-bet (incluem IFN- γ , receptor beta 2 da IL-12) ou independentes IL-7, IL-15, IL-21, IL-18).

O T-bet, um membro da família de factores de transcrição T box, é o principal coordenador da expressão de genes da célula T que inicia imunidade tipo 1 e é essencial para a polarização em células Th1 (Szabo et al., 2000a). A expressão de OPN nos linfócitos, mas não nos macrófagos, é regulada por T-bet. A expressão de OPN dependente de T-bet é essencial para a eficiente definição das T CD4+ e T CD8+ para via Th1 e Tc1 respectivamente. (Shinohara et al., 2005). A deficiência em T-bet reduz a produção de IFN- γ por CD4 + e por células OT-1 (CD8+ com TCR transgénico).

O gene da OPN é constitutivamente exposto nos macrófagos na ausência de imunização deliberada, regulando a activação celular e a síntese de óxido nítrico. Pelo contrário a expressão deste gene nas células T é altamente induzível após estímulo do TCR. Será importante o eixo T-bet-osteopontina nos eventos que conduzem a polarização Th1 e Tc1.

Demonstrou-se que nos nucleotídeos entre -777 a +79 da região promotora da OPN há locais de transactivação de T-bet (Szabo et al., 2000b; Szabo et al., 2003; Szabo et al., 2002), (Hayashi et al., 2005).

A OPN causa quimiotaxia de macrófagos e redução da síntese de óxido nítrico (NO). Durante inflamação sistémica, os macrófagos são a principal fonte de NO, que inibe retrogradamente a sua própria síntese através do aumento da transcrição de OPN pelos macrófagos. A OPN aumenta a ubiquinação de STAT1 aumentando a sua degradação proteossómica e deste modo inibe a actividade promotora, de transcrição e expressão de iNOS (sintetase do óxido nítrico induzível) dependente de STAT1 (Gao et al., 2007).

O aumento da expressão pancreática de OPN em modelo animal de diabetes mellitus (administração de estreptozocina intraperitoneal) é protector. Os animais KO para OPN tinham aumento ligeiro de citocinas Th1 e redução importante de IL-4, enquanto os wt tinham aumento de Th1 e Th2. Neste modelo, a OPN tem controlo regulador sobre a resposta Th2 (Arafat et al., 2006). Mas , a expressão de OPN é aumentada por vários tóxicos, especialmente aqueles que

activam a proteína cinase C. Na sua função como molécula sinalizadora, a OPN modifica a expressão génica e promove a migração de monócitos/macrófagos através de um gradiente de OPN. Algumas experiências sugerem que pode inibir a apoptose, possivelmente contribuindo para a sobrevivência de células em resposta a lesão tóxica.

A expressão aumentada foi correlacionada com polarização Th1 excessiva das células CD4+ nas doenças em que foi implicada (Renkl et al., 2005) como esclerose múltipla, artrite reumatóide, aterosclerose, remodelação miocárdica após enfarte, fibrose intersticial renal após uropatia obstrutiva, fibrose pulmonar, cicatrização de feridas e doença de Crohn (Serlin et al., 2006), (Kramer et al., 2005).

Também foram descritas associações de polimorfismos do gene da OPN ao desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistémico, esclerose múltipla (Xanthou et al., 2007), urolitíase, cirrose biliar primária, síndrome linfoproliferativa (Panoutsakopoulou et al., 2001) e na resposta à terapêutica da HC (Naito et al., 2005)

Os níveis plasmáticos de OPN são mais elevados na doença de Crohn activa do que na quiescente, e diminuem após tratamento com infliximab ocorrendo correlação inversa com os níveis IL-10. Culturas de células T activadas foram estabelecidas a partir de biopsias do cólon na presença de IL-2 e IL-4. A produção de IL-10 estimulada pela OPN é menor nas culturas de células T de doentes do que dos controlos saudáveis, indicando um défice de IL-10 na doença de Crohn mesmo após estimulação pela OPN (Agnholt et al., 2007).

A sobre-expressão de OPN foi identificada em vários tipos de neoplasias malignas como as da mama, pulmão, cólon e recto, estômago, ovário e melanoma. A sua presença em níveis elevados no plasma foi associada a metastização. O soro de animais sem OPN suprime a migração de células de melanoma B16. A adição de OPN recombinante aumenta a migração.

A invasão celular tumoral é um evento inicial do processo de progressão metastática do carcinoma hepatocelular. A expressão aumentada da OPN correlaciona-se com a malignidade e

demonstrou-se que promove o fenótipo tumorigénico/metastático das células neoplásicas. Há concordância entre a expressão elevada da OPN e metaloproteinase da matriz-9 (MMP-9) no Carcinoma Hepatocelular metastático. *In vitro*, a MMP-9 cliva a OPN em fragmentos específicos. Foram identificados três fragmentos por sequenciação de aminoácidos. O fragmento de 5KDa (resíduos 167-210) via receptores CD44 induz menor invasão metastática (Takafuji et al., 2007). Este efeito é antagonizado pela adição de péptidos dessa região.

A OPN-c resultante de splicing alternativo promove a clivagem extra-celular por MMP-9, libertando OPN-5 KDa que se correlaciona com o potencial metastático.

A perda de ARN m da E-caderina e ganho de ARN m da OPN foi associada a maior probabilidade de recorrência precoce pós- cirurgia de carcinoma hepatocelular no contexto de HC. (Iso et al., 2005)

Os níveis plasmáticos elevados foram associados a uma menor sobrevida no cancro gástrico, especialmente nos doentes com fenótipo invasivo. É um factor independente de menor sobrevida em doentes de Taiwan (Wu et al., 2007). Está associada a maior densidade de microvasos e a sua inibição por siARN reduz a angiogénese do cancro gástrico (Tang et al., 2007). Foi associada a defeitos da transição epitélio-mesenquimatosa de cristalinos lesados de ratos (Saika et al., 2007).

O doseamento de OPN em doentes com cancro poderá ter valor prognóstico e a sua supressão poderá ser integrada em abordagens terapêuticas (Rodrigues et al., 2007).

O seu papel nas doenças hepáticas ainda não está definido. Os dados experimentais sugerem que poderá desempenhar um papel importante no recrutamento de células inflamatórias para o fígado. A OPN é expressa por células estreladas e por macrófagos activados, incluindo células de Kupffer em áreas de necrose hepática de ratos submetidos a intoxicação por tetracloreto de carbono, tendo sido proposto que contribui para manter infiltração destas células nas áreas necróticas (Kawashima et al., 1999).

Em modelo de hepatite induzida pela concavalina (modelo de lesão hepática mediada por células T) demonstrou-se que as células NKT segregam OPN que por sua vez aumenta a activação daquelas células e desencadeia a infiltração por neutrófilos bem com a activação destes. A inactivação do epitopo exposto pela trombina melhora o quadro de hepatite (Diao et al., 2004). A lesão pela concavalina caracteriza-se por acumulação maciça de granulócitos, infiltração por células CD4, e um número relativamente pequeno de CD8. Neste modelo as citocinas Th1 promovem a lesão enquanto a IL-10 suprime a lesão.

Um modelo de rato transgénico cujos hepatócitos exprimem OPN pode ser usado como modelo de hepatite auto-imune. Estes animais têm elevadas concentrações hepáticas e plasmáticas de OPN, 50% têm anticorpos antinucleares no soro e após as 12 semanas há infiltrado mononuclear de células CD8 e HLA-DR positivas (Mochida et al., 2004b). O mesmo grupo descreve a presença de infiltrado linfocitário noutros órgãos como pulmão e rim que consideraram serem semelhantes às manifestações extra-hepáticas de HC (Saitoh et al., 2005).

Nos ratos obesos e diabéticos db/db, modelo animal de NASH (esteatohepatite não alcoólica), a OPN é expressa em hepatócitos e observa-se aumento marcado nas fases precoces de esteatohepatite. A lesão hepática e a fibrose estão diminuídas no modelo de esteatohepatite knockout para OPN (Sahai et al., 2004).

Em modelo animal de hepatite alcoólica (ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta contendo álcool) observou-se um aumento moderado na esteatose hepática. Quando a estes animais é administrado LPS surge esteatohepatite alcoólica. Esta associa-se a infiltração do fígado por neutrófilos, e ocorre aumento significativo da OPN e da sua forma clivada pela trombina. A injeção intraperitoneal de OPN aumenta a infiltração de neutrófilos no peritoneu (Apte et al., 2005).

Os ratos deficientes em IL10 e IL4 (IL-10/4^{-/-}) são muito sensíveis a doses tóxicas de acetaminofeno (120 mg/kg) falecendo por lesão hepática maciça. Estes animais apresentam níveis

reduzidos de glutatião e muito elevados de IL-6 e de vários factores pró-inflamatórios incluindo TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α , MCP-1, MIP-2, OPN e NO. (Bourdi et al., 2007).

No fígado normal a expressão de ARNm de OPN é muito baixa, aumentando após ligação do colédoco. A OPN é expressa em células do epitélio biliar no fígado normal e fibrótico. Uma das patologias em que a OPN está muito elevada é a atresia biliar (Whittington et al., 2005). Comparativamente a outras doenças colestáticas correlaciona-se com a proliferação biliar e fibrose portal.

Num estudo com base em autópsias demonstrou-se maior expressão de OPN (imunohistoquímica) nos ductos biliares em proliferação nas formas de hepatite fulminante aguda do que na cirrose ou nos normais (Tajiri et al., 2005). Os níveis séricos de OPN estão aumentados na falência hepática fulminante comparativamente a indivíduos com hepatite aguda autolimitada (Arai et al., 2006). Também está aumentada nos modelos animais de células ovas (progenitoras de células estaminais).

Nos perfis de expressão génica durante a activação de células estreladas in vivo (injecção intraperitoneal de tetracloreto de carbono ou ligação do colédoco) ou em cultura, a OPN encontra-se entre os genes diferencialmente expressos (De et al., 2007).

Não há muitos dados sobre o papel da osteopontina na HC. Dados apontam para que polimorfismos na região promotora, no nucleotídeo -443 podem reflectir a actividade histológica na HC (Mochida et al., 2004a).

Um estudo correlaciona polimorfismos da OPN com a resposta à terapêutica (Naito et al., 2005) mas avaliou doentes tratados com regimes terapêuticos diferentes (monoterapia com IFN, combinação IFN e ribavirina) embora no global com taxas semelhantes às que se obtêm actualmente (resposta sustentada em 58%). As taxas de resposta eram maiores na presença de alelos G/G ou G/A no nt-1748 e T/T no nt -443 (85% vs 45%). As diferenças eram mais evidentes nos

portadores de genotipo 1 e viremias elevadas. SNPs de MxA, MBL e LMP7 não se relacionaram com a resposta.

TNF- α

O TNF- α foi originalmente definido como um factor produzido pelos animais sensibilizados por BCG e em resposta a endotoxina sendo responsável pela necrose de vários tumores.

O gene do TNF- α possui 3 intrões, ~3.6 kbp. Localiza-se em 6p23-6q12, na região do MHC classe III, a 250 kilobases centromérico em relação ao *locus* HLA-B e a 850 kb telomérico em relação a HLA-DR. Altamente regulado quer a nível transcricional e pós-transcricional. Em resposta à estimulação dos macrófagos com lipopolissacarídeos, a transcrição aumenta 3 vezes, o ARNm aumenta 50 a 100 vezes e a secreção da proteína aumenta cerca de 10.000 vezes.

É uma citocina imunomoduladora, pró-inflamatória e pleiotrópica produzida sobretudo por macrófagos activados e em menores quantidades por outros tipos celulares como linfócitos T e B. Exerce uma variedade de efeitos mediados por dois tipos de receptores (TNFR-I e TNFR-II).

Os linfócitos T citotóxicos estão envolvidos na depuração de hepatócitos infectados por VHB ou VHC e na patogénese das hepatites crónicas virais. Os hepatócitos normais são sensíveis aos efectores dos linfócitos citotóxicos Fas/ ligando do Fas, perforina e granzima, mas resistentes ao TRAIL/ *death receptor 5*. Os hepatócitos infectados por vírus são sensíveis ao TRAIL/ *death receptor 5* mas resistentes a perforina e granzima, talvez por existirem inibidores (Thiele D, 2006).

O TNFR-I inicia a maioria dos efeitos sobre os hepatócitos. A apoptose hepatocelular induzida pelo TNF- α é iniciada pela sua ligação deste ao TNFR-I, despoletando a agregação de várias moléculas de TNFR-I, o que permite a recruta de moléculas adaptadoras para a cauda citoplasmática deste receptor. O TNFR-I tem 3 domínios funcionais que transmitem sinais para diferentes proteínas adaptadoras intracelulares. Estes domínios funcionais são: C-terminal death,

activador A-SMase (esfingomielinase acídica), activador N-terminal N-SMase (esfingomielinase neutra) (Ghavami et al., 2005).

Em contraste com o receptor do Fas, a resposta por defeito da ligação ao TNFR-I é a activação do NF- κ B, o que se explica pelo recrutamento preferencial da molécula adaptadora TRADD (*TNF- receptor associated death domain*). O TRADD em conjunto com outras moléculas forma o complexo I, desencadeia o recrutamento e activação de IKK. O complexo I não contém FAAD ou caspase 8, mas desencadeia a recruta e activação de IKK (*inhibitor of NF- κ B Kinase*). O complexo IKK é responsável pela fosforilação de I κ B- α , o que conduz à degradação de heterodímero p65/50 do NF- κ B. O NF- κ B activo migra para o núcleo e induz a transcrição de genes de proteínas pró-inflamatórias e antiapoptóticas. Logo que o complexo I se forma ocorrem modificações pos-traducionais de proteínas adaptadoras como TRADD e RIP1 (*TNF receptor interacting protein*) podendo ser responsáveis pela desacoplação do receptor. O complexo (complexo II) dissociado tem o domínio death do TRADD disponível para interacção com outras proteínas com domínios death como FADD (*Fas associated death domain*), que vão recrutar caspase 8 ou 10. A razão pela qual a estimulação do TNFR-I não causa geralmente apoptose é porque os genes antiapoptóticos dependentes do NF- κ B estão sobre-regulados. Estas proteínas que incluem c-FLIP, IAPs, A20, A1, Bcl-Xl, Inos entre outras são inibidoras da sinalização da apoptose. Assim o TNF- α induz apoptose quando a formação destas proteínas antiapoptóticas está diminuída. Se o complexo II desencadeia activação de caspases 8 ou 10, a via de sinalização subsequente é semelhante à do Fas, que inclui activação de Bid e sua translocação para a mitocôndria e libertação a partir desta de citocromo c, formação de apoptossoma, e activação de caspases 3 e 9. (Jaeschke, 2006)

A lesão hepática mediada imunologicamente é o principal determinante de lesão hepática inicial quer nas hepatites virais agudas quer nas crónicas. (Bertoletti & Ferrari, 2003) Os linfócitos T citotóxicos destroem as células alvo através de 2 mecanismos. Um é uma via rápida que depende de grânulos com moléculas efectoras pré-formadas como a perforina (induz disrupção da

membrana) e granzima (induz a apoptose) (Shton-Rickardt, 2005). O outro mais tardio é dependente da ligação a receptores de morte na célula alvo, como Fas, TNFR1, DR4, DR5 pelo ligando do Fas, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) e TNF ligado à membrana ou secretado.

Os IFN (γ e α) são inibidores potentes do VHC em células Huh-7; mas o TNF- α não afecta a síntese de ARN ou de poliproteína, nem tem efeito sinérgico com o IFN- γ , sendo pouco provável que contribua para a depuração do VHC por indução de mecanismos de defesa dos hepatócitos infectados. (Frese et al., 2003)

O TNF- α foi implicado na patogénia de doenças auto-imunes e infecciosas. Por exemplo os seus níveis plasmáticos são positivamente correlacionados com a mortalidade por malária e leishmaniose.

Foi descrito um polimorfismo bialélico na posição 308 do promotor: substituição de G (alelo TNF 1) por A (alelo TNF2). O alelo TNF2 tem um activador transcricional mais potente do que o alelo comum (TNF1) em linhas celulares de linfócitos, localiza-se no haplotipo HLA-A1-B8-DR3-DQ2 (Wilson et al., 1997). Está associado a auto-imunidade e a produção elevada de TNF- α .

As condições que foram associadas ao alelo TNF 2 são: lupus eritematoso sistémico, diabetes mellitus insulino-dependente, doença celíaca, hepatite auto-imune, colangite esclerosante primária, lepra e tuberculose. A homozigotia para TNF2 está associada a um risco sete vezes superior de morte por malária cerebral (Mitchell et al., 2001) (McManus et al., 1996),.

Os vírus têm como alvo partes fundamentais das vias de sinalização pró-apoptóticas e da maquinaria de execução de apoptose. Exemplos de proteínas virais subversoras são aquelas que bloqueiam as vias de sinalização do TNF, que inibem PKR (Hay & Kannourakis, 2002). Por exemplo, a proteína do VHC-NS2 (23-kDa hidrofóbica, transmembranar, localizada no retículo endoplasmático) tem a capacidade de proteger da apoptose induzida por CIDE-B (*cell death-inducing DFF45-like effector*). Interage com CIDE-B, bloqueando a libertação de citocromo c (Nguyen et al., 2006).

Como foi originalmente descrito como agente indutor de necrose celular em sarcomas foi tentado o uso como agente de quimioterapia que falhou devido a vários efeitos laterais. Um destes efeitos laterais é a hepatotoxicidade devido à indução massiva de apoptose de hepatócitos. Desempenha papel na hepatite viral, hepatite alcoólica, lesão hepática de isquemia/reperfusão e falência hepática fulminante. Os níveis séricos de TNF- α estão significativamente aumentados na hepatite fulminante. Nas hepatites virais são frequentemente observados níveis plasmáticos elevados de TNF- α e dos seus receptores sobretudo, TNF-R75 solúvel. (Zylberberg et al., 1999). Correlacionam-se com o índice de actividade histológica mas não com a viremia ou genótipo do VHC (Zylberberg et al., 1999).

Os polimorfismos do promotor (-238 e -308) foram associados a doença hepática avançada (Yee et al., 2000) (Romero-Gomez et al., 2004) e com níveis elevados de colagénio tipo IV, um marcador de fibrose (Kusumoto et al., 2006) e com a presença de resistência à insulina (Valenti et al., 2005). Também foi associado a complicações após transplante hepático (Freeman, Jr. et al., 1999), (Fernandes et al., 2002) e doença hepática terminal (Bathgate et al., 2000).

Proteínas Tirosina Fosfatases e Transdução de Mensagens Intracelulares

A fosforilação de proteínas é um dos mecanismos fundamentais de numerosas vias importantes da fisiologia dos eucariotas. Estima-se que pelo menos um terço das proteínas intracelulares contenham fosfato ligado de modo covalente. Dentro dos vários aminoácidos aceitadores de fosfato, a fosforilação de serina é a mais prevalente. A fosforilação da tirosina surge como característica de eucariotas superiores, onde é usada como mecanismo regulador de comunicação célula-a-célula contribuindo para a coordenação do comportamento de populações celulares dentro destes organismos multicelulares. Mais recentemente, a fosforilação de tirosinas foi também encontrada em bactérias e *Archaea*. Os genomas bacterianos também contêm fosfatase serina/treonina, mas geralmente não contêm as cinases proteicas do tipo das dos eucariotas. Mesmo

assim, a fosforilação de proteínas é um mecanismo regulador que será menos importante nos procariontes do que nos eucariontes.

A fosforilação de proteínas é uma modificação pós-traducional reversível catalisada por cinases proteicas e revertida por fosfatases. Num dado momento, o estado de fosforilação de uma proteína é o resultado de actividades opostas de cinase (s) e fosfatase (s) relevantes. Uma alteração do estado de fosforilação de uma proteína pode resultar de uma alteração da actividade (ou acesso) a estas enzimas. No caso da fosforilação das tirosinas, em regra este balanço é desviado de forma significativa para o estado de desfosforilação. A maioria das proteínas fosforiladas em tirosina estão fosforiladas para estequiometria de algumas unidades por cento mesmo em condições "extremas" de indução e não estão de todo fosforiladas em condições de "repouso". Assim pode-se especular que as fosfatases poderão ser mais relevantes do que as cinases. As fosfatases desempenham frequentemente papéis muito específicos, não redundantes, muito bem regulados e muito activos em muitos processos celulares. Frequentemente, as fosfatases são também componentes "positivos" de vias de sinalização e ratos *knockout* têm fenótipos complexos. No estudo do genoma Humano encontraram-se mais genes codificadores de fosfatases do que cinases de tirosina. A classificação que se apresenta no Quadro 8 tem por base características estruturais, ao contrário da classificação anterior que se baseava na especificidade de substrato (específicas de serina/treonina, específicas de tirosina e de especificidade dupla).

As PTPases (proteínas tirosina fosfatases) são distintas de outras fosfatases devido à sua especificidade de substrato, pH ótimo na zona neutra, resistência ao EDTA, e inibição por pequenas concentrações de zinco e vanadato. Os estudos bioquímicos demonstraram que se distribuem ubiquamente no citoplasma e em outras fracções celulares em mamíferos, invertebrados, fungos, vírus e bactérias. São uma superfamília de proteínas que exercem influência positiva e negativa em várias vias de sinalização celular e metabolismo.

Quadro 8: Famílias de Fosfatases

Famílias de fosfatases	Exemplo
1. PPM (dependentes de Mg)	PP2C
2. FCP (independente de Mg)	FCP
3. PPP	PP1, PP2A, calcineurin, PP5, PP2B (calcineurina)
4. Família HAD (baseada em Asp)	Eya, CTD, cronophin
5. PTPs de Classe I baseada em Cys	
5.1. PTPs Clássicas	
5.1.1. PTPs Transmembranares	PTP, CD45, CD148, IA-2, GLEPP1
5.1.2. PTPs Não-Receptor	PTP1B, TCPTP, SHP1, LYP, MEG2
5.2. PTPs tipo-VH1 ou de Dupla Especificidade	
5.2.1. MKPs	MKP1–5, MKP7, PAC1
5.2.2. DSPs Atípicas	VHR, PIR, Laforin, VHZ, STYX
5.2.3. Slingshots	SSH1, SSH2, SSH3
5.2.4. PRLs	PRL-1, PRL-2, PRL-3
5.2.5. CDC14s	CDC14A, KAP, PTP9Q22
5.2.6. PTENS	PTEN, TPIP, tensin, C1ten
5.2.7. Miotubularinas	MTM1, MTMR1—15
6. PTPs Class II baseada em Cys	CDC25A, CDC25B, CDC25C
7. PTPs Class III baseada em Cys	LMPTP

Adaptado de (Mustelin, 2007)

Podem dividir-se em 2 grandes categorias: tipo não-receptor com um único domínio PTPase e segmentos adicionais funcionais, e tipo receptor com estrutura geral semelhante a receptor de membrana com domínio extra-celular, um único domínio transmembranar e um ou dois domínios catalíticos conservados com cerca de 250 resíduos. Foram propostos pelo menos dois sistemas de classificação das PTPases de acordo com várias características estruturais. As características essenciais na classificação incluem a localização membranar e transmembranar previsível (baseado na identificação de péptido sinalizador e domínio transmembranar), a presença de um domínio de homologia PTPase único ou repetitivo, as características do segmento extra-celular (incluindo tamanho relativo e presença de domínios identificáveis com potenciais funções como tipo- Ig, repetições tipo III de fibronectina), e domínios funcionais adicionais de PTPases não transmembranares.

Dentro das múltiplas PTPases clonadas, a análise de homologia de sequências demonstrou uma série de aminoácidos altamente conservados no resíduo 250 do domínio catalítico desde a *Drosophila* aos mamíferos, bem como elevado nível de identidade dentro da região discreta que incorpora o motivo de assinatura PTPase. O motivo (I/V HCXAGXGR(S/T)G está envolvido no mecanismo catalítico.

A inclusão de fosfatases citoplasmáticas designadas *por low molecular weight PTPases* nesta superfamília (Quadro 8) é validada por vários estudos da sua estrutura. Inicialmente foram identificadas como fosfatases ácidas citoplasmáticas, e posteriormente descobriu-se terem acção PTPase em pH diversos, bem como sensibilidade a reagentes sulfidrílo e a baixas concentrações de vanadato como outras PTPases. Apesar de, na globalidade não terem sequências homólogas ao domínio PTPase ~250, demonstrou-se que têm homologia mínima na ansa P que inclui motivo CXXXXXXXXR.

Outra categoria inclui as PTPases com homologia com a PTPase VH1 do vírus vaccinia e que inclui CDC 25 e PAC-1. Estas enzimas como as PTPases de baixo peso molecular têm ausência de homologia do resíduo ~250 do domínio catalítico. Têm capacidade de desfosforilação não apenas de resíduos fosfotirosina de proteínas mas também substratos fosforilados em serina e treonina, daí que sejam designadas por PTPases com dupla-especificidade.

Um desequilíbrio entre fosforilação de tirosinas de proteínas reguladoras chave pode induzir proliferação celular e oncogénese. Antagonizando os efeitos de cinases em tirosina, as PTPases podem actuar como potenciais anti-oncogenes.

As PTPases foram mapeadas no genoma humano e dos roedores, e pesquisado se os seus genes se localizam em locais de potenciais genes supressores tumorais. O splicing alternativo frequentemente afecta vários domínios funcionais dentro e fora do domínio catalítico fornecendo uma heterogeneidade adicional (2007).

A PP2A, uma importante fosfatase serina/treonina envolvida num grande nº de processos celulares como controlo da transição G2 para M do ciclo celular, morfologia celular, desenvolvimento, transdução de sinal, tradução, apoptose, resposta ao stresse e regulação da maioria das vias metabólicas. Poderá funcionar como promotor ou supressor tumoral dependendo do tipo celular ou do agente transformador. É uma fosfatase serina-treonina heterodimérica formada por uma subunidade catalítica de 36 KD (PP2Ac), complexada com subunidade estrutural A de 65 KD e com outra subunidade reguladora (B) de massa molecular variável. Nos mamíferos há 2 isoformas da subunidade catalítica da PP2A, α e β . É uma proteína abundante que se estima represente 0,3 a 1% das proteínas celulares totais.

Os fígados infectados com VHC possuem níveis elevados PP2A (Christen et al., 2007).

A sobre-expressão da PP2A conduz à inibição da via de sinalização do IFN ao nível da ligação de STAT ao ADN deixando intacta a activação de STAT por fosforilação da tirosina.

Nos extractos hepáticos de ratos transgénicos com expressão de proteínas do VHC nos hepatócitos e nas biópsias hepáticas de doentes HC há uma expressão normal de componentes importantes da via de sinalização do IFN bem como da fosforilação de STAT1 e STAT2. Os estudos de desvios de mobilidade na electroforese em extractos nucleares de doentes mostraram anomalias da ligação de STAT aos seus elementos de resposta no ADN. O VHC aumenta a PP2A, que hipometila STAT1 e promove a sua ligação ao inibidor PIAS1 (Christen et al., 2007) (Duong et al., 2005)

As fosfatases baseadas em cisteína de classe III existem em todos os seres vivos e a maioria das bactérias tem genes para uma ou duas destas enzimas. Na *Escherichia coli* uma destas fosfatases regula a autocinase transmembranar que regula a síntese de polissacarídeos da sua cápsula. O genoma humano contém um único gene de fosfatase de classe III, a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (LMWPTP).

Fosfatase ácida solúvel (ACP-1) ou Proteína Tirosina Fosfatase de baixo peso molecular (LMWTPT)

O polimorfismo da fosfatase ácida eritrocitária foi descrito em 1963 por Hopkins et al observando em gel de poliacrilamida variações quanto ao nível de migração e intensidade das bandas. Swallow et al em 1973 demonstrou que a actividade ACP1 não se restringia aos glóbulos vermelhos. Em 1979 Junien et al mapearam o gene no *locus* 2p25. Num doente com duplicação deste locus a actividade da ACP 1 era 1,4 vezes superior ao normal.

Bryson et al em 1995 demonstraram que o gene contém 7 exões e 6 intrões que se estende por 18kB, com um promotor rico em GC. O splicing alternativo dos exões 3 e 4 é responsável pelas 2 isoenzimas, *fast* e *slow*. A isoenzima A ou fast migra mais rapidamente em focagem isoelectrica.

Ambas isoformas são pequenas enzimas com apenas 157 aminoácidos e 18 KDa. Existem com alto grau de conservação na sua estrutura primária nos eucariotas sugerindo um papel em funções comuns a todas as células. Os 3 alelos comuns, *A, *B, *C, são caracterizados por 3 substituições nucleotídicas: transição C>T no nt +15 no exão 3F no alelo *C, transição C>T no nt +12 no exão 3S no alelo *B e uma transição A>G no nt +24 do exão 5 (codão 105) no alelo *A. As duas substituições nos exões 3F e 3S são tradicionalmente silenciosas, mas condicionam o splicing alternativo e consequentemente a razão f/s. A substituição A>G no codão 105 permite substituição de glicina por arginina o que distingue a isoenzima A da B e C. As 2 isoenzimas resultam de razões alélicas específicas associados aos 3 principais alelos (Quadro 9).

Quadro 9: alelos e razão de isoenzimas *fast/slow*

Alelo	Codão 43	Codão 44	Codão 105	Ratio f/s
*A	GAT (Asp)	AGC (Ser)	CGA (Arg)	2:1
*B	GAC (Asp)	AGC (Ser)	CAA (Gln)	4:1
*C	GAC (Asp)	AGT (Ser)	CAA (Gln)	!:4

Por ordem crescente de actividade enzimática (usando p-nitrofenilfosfato como substrato) podemos ordenar os genotipos da seguinte forma: AA < AB < BB ≈ AC < BC < CC.

Foi demonstrado que a genotipagem com *primers* flanqueando a região E3F- E3S é um procedimento adequado. Na técnica de PCR-RFLP, o genótipo não depende da intensidade das bandas como na focagem isoeléctrica mas sim do tamanho dos fragmentos (Dissing et al., 2003).

Uma variante de baixa actividade foi descrita nos Índios Guaymi da América Central. O fenótipo GUA-1 caracteriza-se por glóbulos vermelhos com níveis elevados de reductase do glutatião. Também foi descrito alelo nulo.

A frequência alélica varia nas várias populações. O alelo mais frequente na Europa é o A (0,26-0,37), o alelo R só aparece na população africana. Na Europa a frequência do alelo C está sempre abaixo de 0,10. O fenótipo CC é raro (1 em cada 600 indivíduos). Os 3 alelos (A, B, C) têm frequências estimadas de 0,35, 0,60 e 0,05 respectivamente. Originam 6 fenótipos (Golden & Sensabaugh, 1986).

População	Nº de indivíduos	Frequências génicas			
		p ^a	p ^b	p ^c	Outro
Inglaterra (Londres)	367	0,36	0,60	0,04	
Austrália (Sydney)	260	0,33	0,64	0,03	
Alemanha (Berlin)	1188	0,37	0,57	0,06	
Alemanha (Heidelberg)	401	0,33	0,63	0,04	
Alemanha (Freiburg)	171	0,27	0,72	0,01	
Áustria (Viena)	410	0,37	0,57	0,06	
Noruega	65	0,26	0,74	0	
Itália (Roma & Sardenha)	782	0,27	0,65	0,08	
Tristão da Cunha (Islandia)	140	0,09	0,91	0	
USA (Seattle)	193	0,39	0,55	0,06	

Na figura seguinte apresenta-se a curva de distribuição da actividade enzimática de acordo com os vários fenótipos.

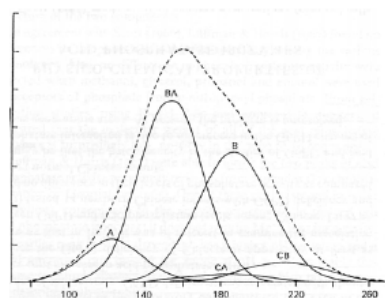


Figura 3: Curva de distribuição unimodal da actividade da fosfatase ácida numa população aleatória constituída por indivíduos de diferentes fenótipos. No eixo das abcissas encontra-se representada a actividade da fosfatase ácida enquanto no eixo das ordenadas se encontra representada a frequência relativa (Giblett, 1969).

O gene *ACP1* codifica uma fosfatase fosfotirosina (e não de fosfoserina ou fosfotreonina) de baixo peso molecular com papel na regulação de vias de transdução de sinal que envolvem a fosforilação de resíduos tirosil (Bottini et al). A *ACP1* pode também ela ser fosforilada em tirosina, sendo esta modificação necessária para a sua activação.

Também tem função de fosfotirosina fosfotransferase e de fosfatase de mononucleotídeo da flavina, podendo esta última regular a própria concentração intracelular de coenzimas da flavina, e por último de flavoenzimas, e justificar a associação entre *ACP-1* e várias doenças. Pertence à classe III das proteínas tirosina fosfatases. Possui domínio PTPase não transmembranar único (2007).

É inibida pelo ácido fólico e esta inibição é dependente do fenótipo: *C* mais do que *A*. Isto explica o aumento de *ACP* nos eritrócitos de doentes com anemia megaloblástica e a variação da incidência e gravidade do favismo nas deficiências de *G6PD*.

Está envolvida na mitogénese induzida por *PDGF* e no rearranjo do citoesqueleto. Liga-se ao receptor do *PDGF* e desfosforila-o inibindo a proliferação celular. Inibe o *Ras*.

Os polimorfismos da *ACP1* foram usados no arsenal de identificação humana, estudos de paternidade e de genética populacional e foram associados a várias doenças como obesidade mórbida e susceptibilidade à malária.

A menor actividade enzimática de *ACP1* associa-se aos indivíduos *AA*, que têm níveis de glicemia superiores (Da Silva et al., 2002). Constatou-se uma correlação negativa entre *ACP1* e o *IMC* bem como actividade aumentada na *HTA* (Da Silva et al., 2006).

Não se conhecem dados sobre o papel desta proteína em doenças hepáticas incluindo a *HC*.

ACP1 E VIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DAS CÉLULAS T

Os processos de desenvolvimento das células *T* e sua activação incluem receptores e vias de transdução de sinal semelhantes para atingir desfechos diferentes. Muitas moléculas de sina-

lização são partilhadas por receptores das vias de sinalização, incluindo 2 famílias de proteínas citoplasmáticas proteína tirosina cinases (PTK), família Src e família Syk .

Os 2 membros da família Syk expressos nas células T, Syk e ZAP-70 são estruturalmente semelhantes mas são expressos em fases diferentes durante o desenvolvimento tímico e durante a activação de células T.

As tirosinas cinases ligam o receptor de células T a cascatas de sinalização, cada qual capaz de induzir desfechos funcionais diferentes. O modo preciso como os sinais são canalizados para alvos específicos é ainda uma área de investigação. A estimulação de TCR (receptor das células T) despoleta activação da MAPK p38 "alternativa" através de proteína de ancoragem Dlg1 e MAGUK, enquanto as tirosinas cinases Lck e ZAP 70 activam directamente o p38. (Round et al., 2007). Em 1992 Chan et al isolaram uma fosfoproteína ZAP 70 (Zeta-chain-Associated Protein Kinase ou SRK (Syk-Related tyrosine Kinase) que se associa à cadeia zeta e sofre fosforilação após estimulação do TCR. O gene de ZAP 70 é expresso em células T e células NK. Os seus locais de fosforilação são diferentes dos locais de fosforilação de outras PTKs. Os seres humanos com mutações de ZAP 70 têm imunodeficiência de células T por defeito selectivo de células T. Nesta patologia não há expressão de células CD8 na periferia o que se deve a bloqueio selectivo intratímico de CD8 e as células CD4 não são capazes de proliferar em resposta a mitogénios. O tipo de hereditariedade é autossómico recessivo.

Esta proteína está incluída na avaliação de Leucemia linfoide crónica porque reflecte mutações da região variável das cadeias pesadas de imunoglobulinas. A sua presença está associada a formas indolentes (D' Arena et al., 2007).

Apesar da presença de numerosas PTK, os linfócitos T em repouso contêm muito pouca tirosina fosforilada, apenas 0,01% das proteínas ligadas a fosfato comparando com serina fosforilada (95%) e treonina fosforilada (5%). Após tratamento breve de linfócitos T com inibidores de PTPases há aumento dramático da fosforilação de tirosinas. Estes inibidores também causam

muitos eventos funcionais típicos da activação T e previnem a reversão de T activado para T em repouso. Assim as PTPases desempenham papel crucial na manutenção de T em repouso e limitando a resposta a antigénios. (Mustelin et al., 2003).

Como a fosforilação de tirosinas de várias proteínas chave e enzimas controla o desfecho da activação do receptor de células T (TCR), o balanço entre cinases e fosfatases é importante. As células T com excesso de fosforilação de tirosinas, por actividades cinase desregulada ou fosfatase deficitária, causarão respostas imunes excessivas ou prolongadas. A perda de uma PTPase poderá conduzir à baixa do limiar de sinal para iniciar uma resposta imune. No Lupus Eritematoso Sistémico, as células T têm aumento da fosforilação de tirosinas.

Conhecem-se 30 PTPases nos linfócitos T, de tamanho variável (18-275 kDa). As fosfatases são, elas próprias, frequentemente substratos de cinases proteicas (serina/ treonina) e de fosfatases. Foi demonstrada a importância reguladora da sua fosforilação em tirosina da PTPase no caso da ACP1, entre outras.

As PTPases podem desempenhar papel positivo ou negativo na activação das células T, na maioria das vezes negativo. São exemplos de papel negativo: PEP, PTP-PEST, SHP1, PTEN e de positivo CD45, SHP2, LMWPTP.

Para além de factores ambientais e de desenvolvimento, os factores genéticos também desempenharão papel na orientação da polarização Th1/Th2 e na susceptibilidade a doenças relacionadas com esta orientação. Este tipo de observação foi encontrado também para a haptoglobina, uma proteína de fase aguda. (Bottini et al., 2005).

A ACP1 (LMWPTP) tal como o CD45 desfosforila preferencialmente um regulador negativo de uma PTK importante, no caso a Tyr-292 da ZAP70. Este é o local de ligação da ligase de ubiquitina c-Cbl que regula negativamente a sinalização do TCR por acelerar a sua internalização e degradação. A própria ACP1 é activada por fosforilação mediada por Lck.

A ACP1 desempenha papel positivo na sinalização a partir do TCR, desfosforilando o regulador negativo de ZAP70, Tyr-292, aumentando a actividade cinase de ZAP 70. Níveis baixos de actividade de ACP1 poderão explicar menor activação de ZAP70 podendo contribuir para defeitos de células T nos portadores de HC (ver Quadro 4).

Numa amostra de população italiana, os fenótipos de ACP1 com baixa actividade (A+AB) são mais frequentes em doenças com polarização Th2. A frequência destes fenótipos na asma é de 50%, nos controlos normais de 40% e apenas 32,4% na doença de Crohn (tipo Th1). Na base de observações prévias, demonstrando associações entre actividades enzimáticas, os génotipos foram divididos em 2 classes: baixa actividade (A+BA) e actividade média-elevada (B+CA+CB) (Bottini et al., 2002).

Após ligação a integrinas, a ACP1 move-se para o citoesqueleto onde desfosforila FAK levando a disfunção do contacto célula-a-célula e maior mobilidade celular (Giannoni et al., 2003).

O reconhecimento pelas células T de células apresentadoras de antígeno é acompanhado por redistribuição de vários receptores da sua superfície que permitem interacções celulares designadas por sinapses imunológicas. O citoesqueleto de actina e os motores de miosina contribuem para a redistribuição dos receptores concentrando-se na interface célula-célula. A fosforilação de tirosinas é um dos eventos mais precoces detectados durante a adesão de linfócitos. A sobre-expressão de ACP1 em células jurkat conduz a diminuição de adesão célula-célula após activação do TCR. Nestas condições a ACP1 causa desfosforilação de FAK prevenindo a activação de vias a jusante de FAK. A inibição de FAK pela ACP1 causa alterações da actividade do TCR e na distribuição celular dos receptores TCR e LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1) (Giannoni et al., 2003).

III. CONTRIBUIÇÃO PESSOAL

A. Objectivos

Hipótese

Os estudos demonstram que genótipo e carga viral são factores independentes de resposta ao tratamento, mas desconhece-se porque é que para o mesmo genótipo e carga viral semelhante diferentes hospedeiros têm diferentes respostas.

A persistência de infecção pelo VHC e as diferenças de resposta ao seu tratamento podem dever-se a factores do hospedeiro e em particular aos polimorfismos dos genes de proteínas envolvidas na resposta imune como proteínas associadas à polarização da resposta imune (Th1/Th2) como a osteopontina (OPN), TNF- α ou à transdução de sinais extra-celulares como a ACP-1 (fosfatase ácida ou proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular).

Objectivos

O objectivo geral deste trabalho foi contribuir para a caracterização de diferenças individuais do hospedeiro com HC e se estas podem explicar também diferenças na resposta à terapêutica. Assim seleccionamos doentes com HC genotipo 1 ou 4 já que estes estão associados a menor taxa de resposta.

Foram seleccionados em consequência genes candidatos com algum potencial interferência na patogénese da HC e com polimorfismos descritos:

- Osteopontina (OPN) - indução da diferenciação Th1
- TNF- α - mecanismos de lesão hepática
- ACP-1 - interferência na via de sinalização do IFN e nas vias de sinalização do TCR

Os objectivos específicos do presente trabalho podem ser sintetizados do seguinte modo:

Avaliar se a amostra de doentes com HC genótipo 1 ou 4 apresenta estes polimorfismos estavam associados a susceptibilidade genética e se correlacionam com o tipo de resposta à terapêutica..

Avaliar numa amostra de doentes portugueses portadores de HC genótipo 1 ou 4 determinantes de resposta à terapêutica como sexo, carga viral, estadio de fibrose e determinar se polimorfismos nos genes da osteopontina, TNF- α , ACP-1 se correlacionam com a resposta à terapêutica.

Avaliar a correlação entre o genótipo da osteopontina e os níveis plasmáticos de osteopontina e se estes se correlacionam com a resposta à terapêutica.

B. Material e Métodos

B.1. Material

Para este estudo tipo caso-controlo, seleccionaram-se doentes portadores de HC seguidos na Consulta de Hepatologia Hospital de Santa Maria de acordo com os critérios descritos na Quadro 10:

Quadro 10: critérios de inclusão/ exclusão

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Consentimento informado Portadores de hepatite C crónica (ARN-VHC e anti-VHC positivos) tratados com IFN peguilado e ribavirina, de acordo com a <i>legis artis</i> Genótipos 1 ou 4 do VHC	Recusa de participação Antigénio HBs positivo no soro Anticorpos anti-VIH1 e VIH2 positivos

A inclusão não condicionou o manuseamento destes doentes, não tendo sido efectuados desvios em relação às normas de orientação clínica.

B.2. Métodos

Todos os doentes incluídos foram submetidos a:

1. Avaliação Clínica
2. Colheita de sangue periférico para:
 - Carga viral - Cobas amplificador VHC Monitor 2.0, Roche Diagnosis
 - Genotipagem do VHC - INNO-LIPA
 - Extração de ADN genómico a partir de sangue total
 - Obtenção de plasma
 - Por PCR-RFLP foram determinados os seguintes polimorfismos genéticos:

Variante polimórfica na posição 8090 do gene da osteopontina (C/T)

Variante polimórfica na posição -308 da região promotora do gene do

TNF- α (A/G)

Variantes polimórficas do gene ACP-1 (A/B/C)

- Inicialmente foi necessário proceder a desenho dos primers e optimização destas técnicas, particularmente na fase de digestão do produto de amplificação da osteopontina e da fase de amplificação da ACP1.
- O protocolo de PCR-RFLP da ACP1 tinha sido previamente optimizado no Laboratório de Genética do Centro de Endocrinologia e Metabolismo da Faculdade de Medicina de Lisboa). O protocolo da OPN baseou-se na descrição de (Niino et al., 2003) e o do TNF- α na de (Wilson et al., 1992).
- Determinação dos níveis plasmáticos de osteopontina por Kit de ELISA comercial.

O método PCR - RFLP baseia-se no facto de a presença de uma mutação pontual originar a criação ou abolição de um local de restrição permitindo o diagnóstico de uma mutação. Consiste na amplificação por PCR da região de ADN a analisar usando para isso oligonucleotídeos específicos (*primers*) que flanqueiam a região de interesse. O produto de amplificação é digerido com endonuclease de restrição e os diferentes fragmentos resultantes da digestão (RFLP) são separados por electroforese em gel de agarose de acordo com o seu tamanho e visualizados por coloração com brometo de etídio. Este método é usado para diagnóstico de muitas doenças genéticas em

particular quando envolvem mutações pontuais (ex: Polineuropatia Amiloidótica Familiar - Val 30 Met, NsiI).

A separação electroforética é o método mais usado para estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos. As amostras são colocadas nos poços de gel e com a aplicação de um campo eléctrico, vão migrar para o polo positivo (ânodo), uma vez que os ácidos nucleicos têm carga negativa a pH neutro. A agarose actua como uma peneira deixando passar mais facilmente as moléculas menores que assim migram mais do que as maiores. As moléculas do mesmo tamanho migram conjuntamente e formam bandas que podem ser visualizadas com auxílio de luz ultravioleta. Para isso inclui-se no gel brometo de etídio, uma substância mutagénica que se intercala nas cadeias de ADN e que após exposição a raios UV, emite uma fluorescência alaranjada. A relação entre o logaritmo do peso molecular e a distância percorrida no gel é aproximadamente linear.

Os *primers* usados neste trabalho estão descritos na Quadro 11. Foram fornecidos pela Invitrogen.

Quadro 11: *Primers* usados nos diversos polimorfismos estudados

	<i>Primers</i>
Osteopontina	forward 5` CCC GGC CAT CTT AAT TTT CAG ACC CTTC 3` reverse 5` GAG TCC TGG CTG TCC ACA TGG TG 3`
Tnf- α	forward 5` AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC3` reverse 5` ATC CTC CCT GCT CCG ATT CC 3`
ACP-1	forward 5` CGA TCA CCC ATT GCA GAA 3` reverse 5` CCA TGA TTT CTT AGG CAG CTC 3`

BREVE DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO USADO:

1. Cálculo da concentração de ADN por espectrofotometria. Relação da absorvência a 260 e 280 nm.
2. Adição de 200 ng de ADN genómico em volume variável de água bidestilada e desionizada para perfazer volume total de 10 ul.
3. Desnaturação inicial das amostras ("Hot Start") - submetidas a 94°C durante 2 minutos no termociclador (Gene Amp PCR System 2700 da Applied Biosystems).
4. A partir do passo 3, a mistura reaccional prepara-se em gelo conforme descrito na Quadro 12. O volume final de mistura reaccional é de 50uL.

Quadro 12

Componente	Concentração final	Osteopontina Volume final	TNF- α Volume final	ACP-1 Volume final
ADN	200ng	variável	variável	variável
primer F >> diluição de 1/10	0,1 mM (100 pmol)	1 ul	1 ul	1 ul
primer R >> diluição de 1/10	0,1 mM (100 pmol)	1 ul	1 ul	1 ul
tampão com (NH ₄) ₂ SO ₄ 10x		5 ul	5 ul	5 ul
PCR nucleotide mix	200 uM de cada nucleotideo	1 ul	1 ul	1 ul
MgCl ₂ - 25 mM	1,5 mM	3ul	3ul	3ul
Taq polimerase (5U/uL)	2 U	0,4 ul	0,4 ul	0,4 ul
DMSO 5%		2,5ul	0	2,5ul
H ₂ O a adicionar		26,1 ul	28,6ul	26,1 ul

Primers fornecidos pela Invitrogen e restantes produtos da Fermentas

5. Cada mistura reaccional é submetida a 35 ciclos no termociclador de acordo com as temperaturas específicas de cada *primer* como descrito na Quadro 13:

Quadro 13

<i>Ciclos</i>	<i>Osteopontina</i>	<i>Tnf-a</i>	<i>ACP-1</i>
Desnaturação	94°C , 30 seg	94°C, 30 seg	94°C, 30 seg
Emparelhamento	61°C, 30 seg	58°C, 30 seg	51°C, 30 seg
Extensão	72°C, 30 seg	72°C, 45 seg	72°C, 45 seg
Extensão final	72°C , 5 minutos	72°C , 5 minutos	72°C, 5 minutos

6. Após cada reacção de PCR foi sempre confirmada a presença de produto de amplificação do fragmento de interesse para posterior digestão através de Gel de agarose Nusieve® 3:1 a 4%, com 1ug/mL de brometo de etidio a 0,5 mg/ml.
7. No gel, os produtos de amplificação apresentam surgem como bandas únicas de 110 pb nas reacções de amplificação da osteopontina e TNF- α e de 400 pb nas reacções de amplificação da ACP-1.
8. Nos Quadro 14 e Quadro 15 estão descritas as misturas reaccionais dos produtos de amplificação para a digestão. A digestão decorreu durante 16 horas de acordo com protocolo dos fabricantes e a inactivação das enzimas era efectuada a 65°C.

Quadro 14

osteopontina		TNF- α	
produto digestão	20 uL	produto digestão	20 uL
tampão R	2 uL	tampão	2 uL
enzima MboI- 10U	1 uL	enzima NcoI- 10U	1 uL
água até 30uL	7 uL	água até 30uL	7 uL

ACP1 - a digestão faz-se paralelamente com 2 enzimas de restrição distintas Hin6I e MspAI.

Quadro 15

ACP 1			
tubos A		tubos B	
produto digestão	20 uL	produto digestão	20 uL
tampão Y	2,5 uL	tampão NE	2,5 uL
enzima Hin6I- 2U	0,2 uL	enzima MspaA1- 3U	0,2 uL
água até 25 uL	2,3 uL	água até 25 uL	2,3 uL

9. interpretação de resultados após a digestão:

a. OPN

A enzima MboI reconhece sequência *GATG (alelo T) e corta o fragmento de 84 e 26 pb. Quando a sequência é GACG (alelo C) não é reconhecido local de restrição pela enzima.

Alelo C -110 pb	
26 pb	Alelo T -84 pb

b. TNF- α

A enzima NCoI reconhece a sequência C*CATGG (alelo G) cortando o fragmento em 80 e 20 pb. No caso do alelo A (sequência GA) não há local de restrição e no gel o fragmento migra mais lentamente porque tem 107 pb.

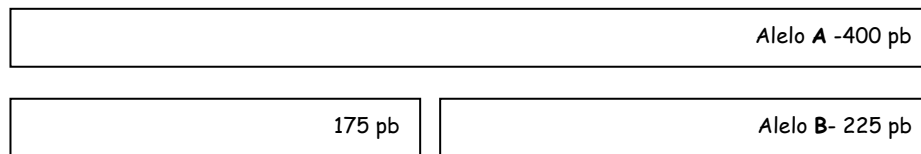
Alelo A -107 pb	
20pb	Alelo G-80 pb

c. ACP-1

A digestão foi feita paralelamente porque se fosse feita uma digestão dupla com as enzimas escolhidas não era possível distinguir indivíduos AB de indivíduos AC e de indivíduos BC. A enzima Hin6I reconhece o alelo B e corta sequência 5`GC↓CG3` (alelo B). A enzima Mspa1 I

reconhece a sequência 5'CMGCKG 3' em que M tanto pode ser A (adenina) como G (guanina) e K tanto pode ser G como T (timina). Todas estas as enzimas digerem o fragmento de 400pb quando a sequência é a do alelo B. Quando ocorrem alterações nesta sequência originando-se outros alelos, as enzimas não cortam o fragmento. A enzima Hin6I gera um fragmento de 175pb e outro de 225pb enquanto a enzima MspA1 gera um fragmento de 328pb e outro de 72pb. Deste modo, o genótipo dos indivíduos dependeu do tamanho de fragmentos formados como se exemplifica nas figuras seguintes. No primeiro poço colocaram-se as amostras resultantes de digestão com Hin 6I e no segundo com MspA1.

Hin6I- nt 665



MspA1- nt 817

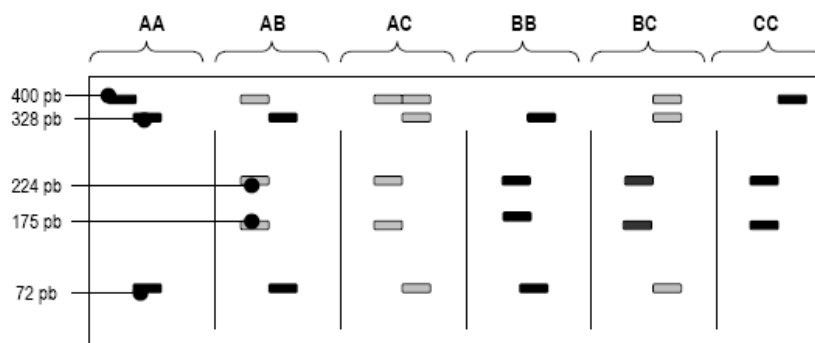
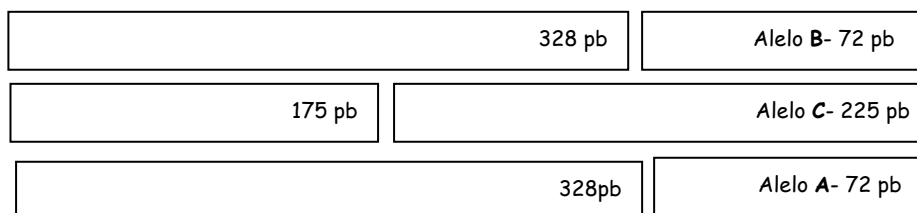
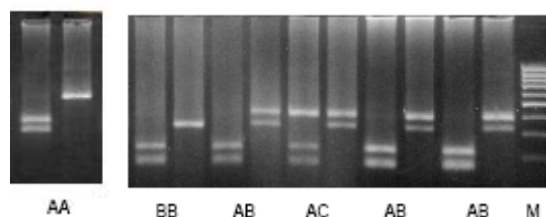


Figura 12: Representação esquemática das bandas observadas num gel de agarose 3% para cada um dos genótipos.



Medição da concentração de OPN plasmática:

Usando o Human Osteopontin immunoassay Quantikine® da R&D Systems, de acordo com as indicações do fabricante. Leitura em leitor de microplacas. O Kit usado tem um anticorpo monoclonal específico na microplaca que se liga à OPN das amostras. O limiar de sensibilidade é de 0.011 ng/mL. As amostras estavam preservadas em tubos heparinizados. As amostras foram diluídas e o ensaio foi efectuado de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em duplicado. A concentração (ng/ml) foi calculada a partir das curvas de calibração de cada ensaio e 5 amostras foram analisadas nas duas placas para controlo de qualidade, constatando-se variabilidade entre ensaios de 4,5%.

Análise estatística:

O nível de significância é definido para $p < 0,05$. Software usado na análise estatística SPSS versão 13.0.

Os valores de p para variáveis contínuas foram calculados usando t de Student e ANOVA, e nas variáveis categóricas por teste do Qui-quadrado. Nas situações em que este não pode ser usado com rigor efectuou-se o teste do Qui-quadrado por simulação de Monte Carlo com nível de confiança de 99%

C. Resultados

Inicialmente foram seleccionados 106 casos de acordo com os critérios acima mencionados, mas 11 indivíduos não foram incluídos na análise de resultados por problemas técnicos na obtenção de resultados a partir das suas amostras.

Características Gerais

Foram estudados 95 doentes com HC, seguidos regularmente na Consulta de Hepatologia do Hospital de Santa Maria e 42 controlos. Os doentes foram previamente submetidos a terapêutica com interferão peguilado (2a ou 2b) e ribavirina de acordo com o estado da arte. Os controlos são dadores de sangue da base do Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Lisboa, 74% do sexo masculino e com idade média de $40,77 \pm 0,66$. Os dados rela-

tivamente aos genótipos de ACP1 no grupo de controlo** foram fornecidos pela Dr^a Raquel Carvalho num trabalho efectuado no Centro de Metabolismo e Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Lisboa.

As características basais dos doentes estão descritas na Quadro 16.

Quadro 16: Características gerais dos doentes

Variável	Grupo de doentes
Idade (anos)	44,25 ±10,91 (20-70 anos)
Sexo masculino	68 (71,6%)
AST/ALT	62,53 ± 51,8 / 111,7 ± 90,32
Genotipo 1 / 4	87 (91,6)% / 8 (8,4%)
ARN do VHC (log 10 UI/mL)	5,42±0,81 (2,84 a 6,74)
Tipo de resposta	Não-respondedor (NR) - 43 Resposta sustentada (RS) - 36 Resposta final da terapêutica e recidiva (RR) - 16

Definimos não respondedores (NR) aqueles com viremia detectável no final do tratamento, recaída (RR) se a viremia foi indetectável no final mas detectável após 6 meses. Na Resposta viral sustentada (RS) a viremia é indetectável no final do tratamento e nos 6 meses seguintes. Não foi possível avaliar de forma consistente a Resposta viral precoce (após 4 semanas de tratamento) pois não foi testada na grande maioria dos doentes, não fazendo nessa altura parte das normas de orientação clínica à data de inclusão.

Na análise dos dados considerámos a comparação dos três tipos de resposta (NR, RR, e RS), a agregação em 2 grupos: com resposta sustentada (RS) e sem resposta sustentada (NRS). Este último inclui os não respondedores e os que tiveram recaída.

As características clínicas, bioquímicas e histológicas são semelhantes entre os casos com resposta sustentada e os sem resposta sustentada. Nesta amostra não se detectaram diferenças estatisticamente significativas das variáveis sexo, idade, índice de actividade histológica, estágio e viremia.

Quadro 17: Características gerais do grupo RS e NRS

<i>Variável</i>	<i>RS</i> <i>n=36</i>	<i>NRS</i> <i>N=59</i>	<i>p</i>
Idade (anos)	41,7±8,37	45,8±12,0	0,691
Sexo M/F (n)	27/9	41/18	0,643
ALT (UI)	115,9±89,8	109±91,46	0,388
Genotipo 1 (n)	32	55	0,611
Genotipo 4 (n)	4	4	
Viremia (log 10 UI/mL)	5,17± 1,06	5,55±0,60	0,090
Actividade histológica *			
0-4	30	41	0,177
5-6	6	18	
Estadio de fibrose *			
F0-F1	11	20	0,4
F2-F3	21	25	
F4	1	7	

* Resultados referem-se aos 85 casos em que foi feita análise histopatológica de fragmento de tecido hepático. O sistema de classificação usado foi o de Knodell modificado por Peter Scheuer (Scheuer, 1991).

Não se encontraram diferenças significativas entre o índice de actividade histológica e estadio de fibrose entre os 3 tipos de resposta ou agrupando resposta sustentada vs a sua ausência (Quadro 18, Quadro 19).

Quadro 18 : Estadios de fibrose e resposta à terapêutica

<i>Estádio</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F4</i>	<i>p</i>
RS	11	18	3	1	0,42
NRS	20	20	5	7	

$\chi^2= 8,25$, df 8

Quadro 19: actividade histológica e resposta à terapêutica

<i>Actividade</i>	<i>0-1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>p</i>
RS	1	3	8	18	6	0	0,086
NRS	2	10	7	22	11	7	

$\chi^2=16,147$, df 10

Polimorfismos de Osteopontina, TNF- α e ACP-1 no grupo de controlo e doentes com Hepatite C crónica

A frequência dos genotipos de 2 dos polimorfismos em estudo (OPN e ACP1) é significativamente diferente quando comparámos doentes com HC e indivíduos saudáveis.

No grupo de doentes com HC são mais frequentes os genótipos TT 8090 OPN, GG -308 TNF- α e AA da ACP1.

Quadro 20: Distribuição dos genótipos de OPN no grupo controlo e grupo de doentes com HC

Genótipo OPN	Controlo n (%)	Doentes HC n (%)	p (χ^2)
CC	6 (14%)	29 (31%)	0,003
CT	24 (57%)	26 (27%)	
TT	12 (29%)	40 (42%)	
Total	42	95	

$\chi^2 = 11,487$, $df = 2$

Quadro 21: Distribuição dos genótipos de TNF- α no grupo controlo e grupo de doentes com HC

Genótipo TNF- α	Controlo n (%)	Doentes HC n (%)	p (χ^2)
AG	11 (26%)	28 (30%)	0,206
GG	31 (74%)	61 (64%)	
AA	0	6 (6%)	
Total	42	95	

$\chi^2 = 3,163$, $df = 2$

Quadro 22: Distribuição dos genótipos de ACP1 no grupo controlo e grupo de doentes com HC

ACP1	Controlo n (%)	Doentes HC n (%)	p (χ^2)
AA	8** (6%)	53 (56%)	0
AB	57** (43%)	33 (35%)	
AC	11** (8%)	1 (1%)	
BB	51** (38%)	7 (7%)	
BC	6** (5%)	1 (1%)	
Total	133	95	

$\chi^2 = 80,792$, $df = 4$

** (Carvalho, 2005)

Comparando as frequências alélicas nos dois grupos são apenas significativas as diferenças na ACP1 como se descreve na Quadro 23.

Quadro 23: frequências alélicas no grupo de controlo e doentes com HC

Frequências Alélicas	Controlo	HC	χ^2/df	<i>P</i>
OPN				
Alelo C	0,454	0,454	0,624 / 1	0,878
Alelo T	0,546	0,546		
TNF- α				
Alelo A	0,575	0,57	0,006/1	0,941
Alelo G	0,425	0,43		
ACP1	**			
A	0,32	0,74	35,949/ 2	0
B	0,62	0,25		
C	0,06	0,01		

df: graus de liberdade χ^2 chi-quadrado

Na população controlo, a comparação de frequências esperadas e observadas dos genótipos da OPN, TNF- α e ACP1 não mostrou diferenças significativas o que indica que a população estará em equilíbrio (lei de Hardy Weinberg).

Na presença de genótipo TT da OPN, a razão de probabilidades (OR) de HC é 2,22 vezes superior à do grupo de controlo. Para o genótipo CC é 2,636 superior. A razão de probabilidades na presença de pelo menos um alelo T ou C não atinge estes valores de grandeza (Quadro 24).

Quadro 24: razão de probabilidades de HC de acordo com os genótipos da OPN

	TT	CC	Pelo menos 1 alelo T	Pelo menos 1 alelo C
HC	2,222 (1,005- 4,913)	2,636 (1,001 - 6,943)	0,188 (0,072-0,491)	0,55 (0,251 a 1,204)
Controlo	1	1	1	1
χ^2	3,246 (df 1)	3,230 (1 df)	11,689 (df 1)	1,727 (1 df)
<i>P</i>	0,072	0,072	0	0,189

df: graus de liberdade χ^2 chi-quadrado

Razão de probabilidades (OR) e intervalo de confiança (IC 95%)

A presença de pelo menos 1 alelo A na variante polimórfica do nt -308 do TNF- α aumenta 1,571 (0,702- 3,516) vezes o risco (OR) de HC comparativamente com o controlo como se descreve na Quadro 25. Não é possível calcular o efeito do alelo G pois no grupo de controlo não identificámos indivíduos com genótipo AA.

Quadro 25: razão de probabilidades de HC de acordo com os genótipos do TNF- α

	AA	GG	Pelo menos 1 alelo A	Pelo menos 1 alelo G
HC	**	0,637 (0,284-1,425)	1,571 (0,702-3,516)	**
Controlo				
χ^2	1,471 (1 df)	0,820 (1 df)	0,820 (1 df)	1,471 (1 df)
<i>p</i>	0,225	0,365	0,365	0,225

df: graus de liberdade χ^2 qui-quadrado

** não calculável pois no grupo de controlo não existem indivíduos AA

Agrupando os genótipos de ACP1 de acordo com os seus níveis de actividade fosfatásica e com a frequência relativa de isoenzima *fast* e *slow* verificámos que as diferenças entre grupo de controlo e grupo de doentes com HC são estatisticamente significativas. Nos quadros seguintes estão indicadas as frequências relativas e os valores de χ^2 e *p*.

No grupo de doentes com HC predominam os portadores de genótipos associados a menor actividade e também à presença de isoenzima lenta.

Quadro 26: Distribuição de genótipos no grupo de controlo e grupo HC de acordo com a actividade enzimática total (ordem decrescente: (AA+AB)<(BB+AC)<BC)

	Controlo n (%)	HC n (%)	<i>p</i>
AA+AB	65 (49%)	86 (91%)	<0.05
BB+AC	62 (46%)	2 (8%)	
BC	6 (5%)	1 (1%)	

$\chi^2 = 43.011$, df=2

Quadro 27: Distribuição de genótipos no grupo de controlo e grupo HC de acordo com a isoforma *fast* - ordem decrescente: (AA+AC)<(AB+BC)<BB

	Controlo n (%)	HC n (%)	<i>p</i>
AA+AC	19 (14%)	54 (57%)	<0.05
AB+BC	63 (48%)	34 (36%)	
BB	51 (38%)	7 (7%)	

$\chi^2 = 53.997$ df=2

Quadro 28: Distribuição de genótipos no grupo de controlo e grupo HC de acordo com a isoforma slow - ordem decrescente: (AA+AB+BB)<(AC+BC)

	Controlo n (%)	HC n (%)	<i>p</i>
AA+AB+BB	116 (87%)	93 (98%)	<0.05
AC+BC	17 (13%)	2 (2%)	

$$\chi^2 = 6.931 \quad df=2$$

Quadro 29: Distribuição de genótipos no grupo de controlo e grupo HC comparando genótipos associados a menor actividade enzimática total versus todos os outros-(AA+AB)<(BB+AC+BC)

	Controlo n (%)	HC n (%)	<i>p</i>
AB + AA	108 (81%)	40 (42%)	<0.05
BB +BC+AC	25 (19%)	55 (58%)	

$$\chi^2 = 35.496 \quad df=2$$

Quadro 30: Distribuição de genótipos no grupo de controlo e grupo HC de acordo a de isoformas fast/slow - ordem decrescente: (BB+AB)<(AA+BC+AC)

	Controlo n (%)	HC n (%)	<i>p</i>
BB+AB	108 (81%)	40 (42%)	<0.05
AA+BC+AC	25 (19%)	55 (58%)	

$$\chi^2 = 41,147 \quad df=1$$

Polimorfismos da OPN na resposta à terapêutica antiviral

O genótipo na posição 8090 do gene da OPN mais frequentemente observado na ausência de resposta sustentada (NRS) é o TT, seguido do CT e por último do CC. Nos casos em que ocorre resposta virológica sustentada (RS) o genótipo mais frequente é o CC, seguido de CT e TT com frequências quase iguais (Quadro 31).

Estas diferenças são estatisticamente significativas, particularmente quando comparamos RS versus a sua ausência e mesmo quando analisámos isoladamente os três tipos de resposta.

Quadro 31: Distribuição dos genótipos da OPN de acordo com o tipo de resposta à terapêutica

<i>Genótipo OPN</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>p</i>
NR	9	11	23	0,049 ¹
RR	3	5	8	
RS	17	10	9	0,010 ²
NRS (NR+RR)	12	16	31	

¹ χ^2 9,514 df=4 ² χ^2 9,325 df=2

Polimorfismos da TNF- α na resposta à terapêutica antiviral

Quanto ao polimorfismo na região promotora -308 do TNF- α (Quadro 32) verifica-se não existirem diferenças significativas entre os grupos. Dos 6 doentes homocigotos A, 2 atingiram resposta sustentada e 2 são não respondedores e outros 2 tiveram resposta inicial mas ocorreu recidiva.

Quadro 32: Distribuição dos genótipos da TNF- α de acordo com o tipo de resposta à terapêutica

<i>Genótipo TNF-α</i>	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>p</i>
NR	2	17	24	0,179 ¹
RR	2	5	9	
RS	2	6	28	0,084 ²
NRS (NR+RR)	4	22	33	

¹ χ^2 6,350 df=4 ² χ^2 4,941 df=2

Comparámos também a frequência relativa dos vários genótipos de cada um dos polimorfismos em estudo no grupo de doentes estratificado de acordo com a resposta à terapêutica antiviral.

Polimorfismos da ACP1 na resposta à terapêutica antiviral

Não se observaram diferenças significativas na distribuição dos genótipos da ACP1 no grupo de doentes com HC quando analisados de acordo com o tipo de resposta à terapêutica antiviral.

Quadro 33: Distribuição dos genótipos da *ACP1* de acordo com o tipo de resposta à terapêutica

<i>Genotipo ACP1</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>AC</i>	<i>BB</i>	<i>BC</i>	<i>p</i>
NR	25	15	0	3	0	0,45 ¹
RR	9	4	1	2	0	
RS	19	14	0	2	1	
NRS (NR+RR)	34	19	1	5	0	0,68 ²

¹ χ^2 8,035 df=8 ² χ^2 2,890 df=4

Agrupando os genótipos de *ACP1* de acordo com os seus níveis de actividade fosfatásica verificámos que as diferenças entre grupo de respondedores (RS) versus grupo sem resposta sustentada (NRS) não são estatisticamente significativas. Nos quadros seguintes são apresentados os resultados.

Quadro 34: Distribuição de genótipos de acordo o tipo de resposta e a actividade enzimática total - ordem decrescente: (AA+AB)<(BB+AC)<BC)

	RS n (%)	NRS n (%)	<i>p</i>
AA+AB	33 (92%)	53 (90%)	0,331
BB+AC	2 (5%)	1 (1,5%)	
BC	1 (3%)	5 (8,5%)	

$\chi^2= 2.212$, df=2

Quadro 35: Distribuição de genótipos de acordo o tipo de resposta e com a isoforma *fast* - ordem decrescente: (AA+AC)<(AB+BC)<BB)

	RS n (%)	NRS n (%)	<i>p</i>
AA+AC	19 (53%)	35 (59,5%)	0,611
AB+BC	15 (42%)	19 (32%)	
BB	2 (5%)	5 (8,5%)	

$\chi^2= 0,986$ df=2

Quadro 36: Distribuição de genótipos de acordo o tipo de resposta e com a isoforma *slow* - ordem decrescente: (AA+AB+BB)<(AC+BC)

	RS n (%)	NRS n (%)	<i>p</i>
AA+AB+BB	35 (97%)	58 (98,5%)	0,704
AC+BC	1 (3%)	1 (1,5%)	

$\chi^2= 0,144$ df=1

Quadro 37: Distribuição de acordo o tipo de resposta e comparando genótipos associados a menor actividade enzimática total versus todos os outros-(AA+AB)× (BB+AC+BC)

	RS n (%)	NRS n (%)	<i>p</i>
AB + AA	33 (92%)	53 (90%)	0,883
BB +BC+AC	3 (8%)	6 (10%)	

$$\chi^2 = 0,021 \text{ df}=1$$

Quadro 38: Distribuição de acordo o tipo de resposta e comparando as isoformas fast/slow - ordem decrescente: (BB+AB)×(AA+BC+AC)

	RS n (%)	NRS n (%)	<i>p</i>
BB+AB	16 (44%)	24 (40,5%)	0,948
AA+BC+AC	20 (56%)	35 (59,5%)	

$$\chi^2 = 0,004 \text{ df}=1$$

As razões de probabilidades entre RS e a ausência de resposta sustentada (NRS) tendo como factor de risco a presença de pelo menos 1 alelo T ou C é expressa nos Quadros seguintes. A presença de pelo menos um alelo C associa-se a OR de 3,321 vezes maior (Quadro 40) enquanto a presença de pelo menos um alelo T associa-se a OR de apenas 0,285 (probabilidade NRS superior à de RS) (Quadro 39)

Quadro 39: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de alelo T da OPN versus não resposta na presença do mesmo alelo

OPN / Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	<i>P</i> (χ^2)
TT+ CT	19 (53%)	47 (80%)	0,285	0,115-0,710	0,011
CC	17 (47%)	12 (20%)	1	-	-

1 se RS=NRS

Quadro 40: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de alelo C da OPN versus não resposta na presença do mesmo alelo

OPN / Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	<i>P</i> (χ^2)
CC+CT	27 (75%)	28 (47%)	3,321	1,335-8,261	0,015
TT	9 (25%)	31 (53%)	1	-	-

As razões de probabilidades entre RS e a ausência de resposta sustentada (NRS) tendo considerando como factor de risco a presença de pelo menos 1 alelo A ou G é expressa nos Quadros seguintes. A presença de pelo menos um alelo G associa-se a OR de 1,236 vezes maior e a presença de pelo menos um alelo A associa-se a OR de apenas 0,363 neste caso a probabilidade NRS é superior à de RS. A presença de genotipo GG associa-se a probabilidade de resposta sustentada 2,7 vezes superior.

Quadro 41: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de alelo A do TNF- α versus não resposta na presença do mesmo alelo

TNF /Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	P(χ^2)
A (AA+AG)	8 (22%)	26 (44%)	0,363	0,142-0,927	0,053 (ns)
Não- A	28 (78%)	33 (56%)	1		

OR = 1 quando RS=NRS

Quadro 42: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de alelo G do TNF- α versus não resposta na presença do mesmo alelo

TNF/ Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	P(χ^2)
G (GG+AG)	34 (94%)	55 (93%)	1,236	0,215-7,118	0,844 (ns)
Não- G	2 (6%)	4 (7%)	1		

Quadro 43: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de genotipo GG do TNF- α versus não resposta

TNF/ Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	P(χ^2)
GG	28 (78%)	33 (56%)	2,758	1,07-7	0,053 (ns)
Não- GG	8 (22%)	26 (44%)	1		

Tabela 44: razão de probabilidades de resposta à terapêutica na presença de genótipo AA do TNF- α versus não resposta

TNF/ Grupo	RS	NRS	OR	IC 95%	P(χ^2)
AA	28 (78%)	33 (56%)	0,89	0,14-4,7	0,844 (ns)
Não- AA	8 (22%)	26 (44%)	1		

Contudo estas diferenças não atingem significado estatístico como as observadas no caso da OPN.

Genótipo e níveis plasmáticos de osteopontina

Os valores médios da concentração plasmática de OPN são menores no genótipo TT, contudo a diferença não atinge significado estatístico. Não foi possível efectuar doseamentos em indivíduos saudáveis.

Quadro 45: correlação genótipo e níveis plasmáticos da OPN

OPN (ng/mL de plasma)	Genótipo OPN		
	CC	CT	TT
Média e dp	1,82±1,55	1,85±1,26	1,21±0,90
Minímo	0,28	0,34	0,24
Máximo	4,74	4,37	3,82
Mediana	1,54	1,98	1,18

dp- desvio padrão

ANOVA: F=3 P=0,055 (ns)

Níveis plasmáticos de osteopontina e resposta à terapêutica

A ordem decrescente dos valores médios de concentração plasmática dos grupos é: NR> NRS> RS> RR(Quadro 46). Nos grupos NR e NRS os valores médios de concentração plasmática são significativamente maiores do que nos indivíduos com resposta sustentada, ou que responderam inicialmente e recidivaram. A mediana destas concentrações é superior na presença de resposta sustentada do que na sua ausência. Nos casos de RR verificaram-se os valores mais baixos. Contudo verificou-se uma grande dispersão de resultados como é demonstrado nos Boxplots da página seguinte.

Quadro 46: correlação tipo de resposta e níveis plasmáticos da OPN

<i>Concentração OPN</i>	<i>Média e desvio padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Minímo</i>	<i>Máximo</i>
NR	1,98±1,54	1,19	0,28	4,74
RR	0,92±0,83	0,47	0,24	2,6
RS	1,49 ±0,7286	1,62	0,29	2,7
NRS	1,64 ± 1,43	1,19	0,20	4,73

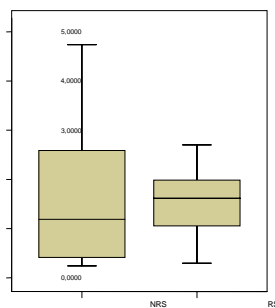
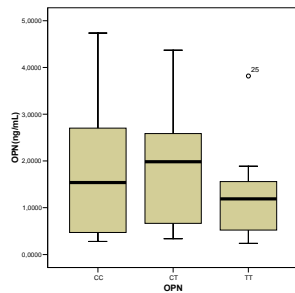
ANOVA: $F=2,84$, $p=0,040$ Figura 8: Boxplot dos níveis *plasmáticos* de OPN segundo o tipo de resposta.

Figura 9: Boxplot dos níveis plasmáticos de OPN segundo o genotipo



IV. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A. Discussão

Não se verificaram diferenças significativas quanto às variáveis idade, sexo, viremia, estágio de fibrose e grau de actividade inflamatória neste grupo de doentes independentemente da sua resposta à terapêutica. Este aspecto na nossa opinião contribui para a uniformização da amostra facilitando a avaliação de factores associados ao hospedeiro. Muitos estudos de polimorfismos genéticos ao incluírem genótipos 2 e 3 do VHC com taxas de resposta superiores, acabam por encontrar diferenças quanto à resposta apenas no grupo que seleccionámos à partida, ié, com genótipos associados a menor taxa de resposta ao tratamento e com maiores viremias. Não usámos como critério de selecção o factor viremia, mas de facto constatámos no nosso grupo de doentes viremias elevadas.

Na amostra estudada predominam doentes com fibrose pouco avançada (F0, 1 ou 2: 69 doentes vs 16 com F3 ou F4). Contudo em 10 doentes tais dados não estão disponíveis porque não efectuaram biopsia hepática.

Neste trabalho encontrámos diferenças estatisticamente significativas quanto a frequências alélicas e genóticas de dois dos polimorfismos em análise (T8090 OPN C e ACP1) entre o grupo de doentes com HC e o de saudáveis. O "haplotipo" OPN/ ACP1 que caracteriza um doente com HC seria T/A. No grupo de controlo 57% dos indivíduos são heterozigotos CT no locus 8090 do gene da osteopontina, 29% são homozigotos T e 14% são homozigotos C. No grupo HC predominam os homozigotos T (42%) seguido dos homozigotos C (31%) e por último os heterozigotos (27%).

A OPN é promotora de resposta de tipo Th1 através da regulação diferencial da produção de IL-10 e IL-12 (Ashkar et al., 2000). Foi associada a doenças auto-imunes como Lupus Eritematoso Sistémico e Esclerose múltipla entre outras. Na avaliação do mesmo polimorfismo (C8090T)

em população japonesa com esclerose múltipla, o genotipo *CC* era mais prevalente do que no grupo de controlo e a presença de alelo *C* aumentava 2,57 vezes o risco de doença, associando este genotipo com susceptibilidade para esclerose múltipla (Niino et al., 2003). Na nossa população de controlo a distribuição dos genotipos do polimorfismo 8090 da OPN (*C/T*) é muito diferente da população controlo japonesa. As frequências relativas na população japonesa e portuguesa são respectivamente: *CC*- 48,4% e 14%; *CT* - 41,9% e 57%; *TT* - 9,7% e 29%. São mais frequentes os indivíduos *CC* na população japonesa (quase 50%), enquanto na portuguesa 29% são *TT* e 57% são heterozigotos. Cerca de 7% dos japoneses com esclerose múltipla são portadores de *TT*, 77,6% são portadores de *CC* e apenas 15,5% de *CT*. As frequências de genotipos no grupo com HC é: *TT* - 42%, *CC*- 31% e *CT*- 37%. A presença do genotipo *CC* aumenta o risco de HC 2,64 (IC 95% 1,001 a 6,94) relativamente ao grupo de controlo e com o genotipo *TT* o OR é ligeiramente menor de 2,22. Não encontramos descritos na literatura trabalhos sobre este polimorfismo na população caucasiana ou com HC.

Nos casos ausência de resposta sustentada e nos casos de resposta e recidiva predomina o genótipo *TT* (*TT* > *CT* > *CC*), enquanto na resposta sustentada predomina o genótipo *CC* (*CC* > *CT* > *TT*). O genotipo *TT* da OPN foi associado à não resposta ou à resposta e recidiva (52,5% dos sem resposta sustentada vs 25% daqueles com resposta sustentada). Na presença de alelo *C* a probabilidade de resposta sustentada é 3,32 vezes superior à ausência desta.

A resolução da infecção pelo VHC está associada a respostas celulares T abrangentes e intensas com produção de IFN- γ . Estas respostas estão diminuídas em doentes com HC (Dustin & Rice, 2007). No estudo de uma amostra de doentes portugueses com HC observou-se uma tendência para a polarização Th1 naqueles com resposta terapêutica mantida ou com ALT normal (Marinho et al., 2004b).

A OPN promove a resposta Th1 e assim seria de esperar que os níveis plasmáticos mais elevados estivessem associados a maior polarização da resposta imune em Th1, aumentando a

probabilidade de resposta à terapêutica. As medianas dos níveis plasmáticos de osteopontina são mais elevadas nos casos de resposta sustentada. Por sua vez os genótipos mais frequentemente associados a resposta sustentada (CC e CT) apresentam níveis mais elevados e os homozigotos T níveis menores (ordem decrescente: CT > CC > TT). Contudo as diferenças encontradas não atingem significado estatístico e há dispersão de resultados. Por outro lado os valores médios e medianos de concentração de OPN nos indivíduos com recidiva nos seis meses após suspensão da terapêutica são os menores (NR > NRS > RS > RR), fazem-nos pensar que não terão polarização Th1 e que conseguem eliminar vírus apenas quando lhes é administrado IFN. Seria necessário efectuar doseamentos antes, durante e após o tratamento para avaliar esta hipótese. Os níveis plasmáticos detectados são baixos comparativamente aos valores apresentados na literatura noutras patologias como carcinoma gástrico ou carcinoma hepatocelular. Desconhecemos dados publicados na HC para comparação. O polimorfismo pesquisado não se localiza em região promotora do gene e desconhece-se o seu efeito na eficiência da transcrição, no splicing alternativo ou na estabilização do ARN mensageiro.

As células dendríticas são cruciais para a diferenciação Th1. A forma intracelular de OPN é aquela que é essencial para a produção de IFN pelas células plasmocitoides dendríticas (Xanthou et al., 2007). Os níveis plasmáticos poderão não reflectir o que se passa a nível hepático ou a sua forma intracelular. Num modelo animal, constatou-se correlação entre os níveis plasmáticos e a expressão hepática (Mochida et al., 2004a). Recentemente descreveram-se efeitos diferentes sobre a regulação da OPN-solúvel nas células dendríticas dependendo se acontecia na sensibilização primária por antigénio ou numa exposição subsequente. Na primeira suprimiria as células dendríticas reguladoras Th2, favorecendo resposta Th1, e na segunda situação promovendo resposta Th2. Especula-se se na fase inicial de contacto com antigénios de VHC poderia promover a resposta Th1 e depuração do vírus, mas numa fase de estímulo repetido faria o contrário. É o que acontece em modelos animais de doença alérgica das vias aéreas (Xanthou et al., 2007).

O TNF- α , protótipo de citocina pró-inflamatória foi implicado na patogênese de várias doenças hepáticas e também na patogênese, persistência de vírus e resposta à terapêutica da HC. O alelo A ou TNF2 está associado a níveis mais elevados e expressão constitutiva de TNF- α (Wilson et al., 1997).

A frequência de alelo A é maior na HC do que no grupo de controlo (21% vs 13%) mas esta diferença não tem significado estatístico. A presença de alelo A associa-se a odds ratio (OR) de 1,571 (IC 95% 0,702 a 3,516) de HC comparativamente com o grupo de controlo. Os 6 homozigotos A identificados neste trabalho pertencem ao grupo HC e destes 2 tiveram resposta sustentada e 4 não (2 sem resposta e 2 com resposta e recidiva). Os estudos prévios são contraditórios predominando os que não confirmam o papel deste polimorfismo como factor de susceptibilidade ou de resposta à terapêutica. Por exemplo (Schiemann et al., 2003) et al avaliando este polimorfismo em população caucasiana com HC não observou diferenças significativas relativamente ao grupo de controlo ou no sucesso da terapêutica. As frequências de alelo A e G são muito semelhantes às descritas no nosso trabalho. Vários trabalhos encontraram resultados semelhantes (Tokushige et al., 2003; Bahr et al., 2003); (Barrett et al., 2003; Vidigal et al., 2002); (Yu et al., 2003), este último em população tailandesa. Um outro trabalho associa a presença de alelo A a resposta sustentada apenas no subgrupo de doentes com genotipo 1 e viremia elevada. (Dai et al., 2006a). A presença de fibrose mais avançada e de menores viremias foi independentemente associada ao alelo A (OR= 1,385) (Dai et al., 2006b). Num outro estudo o OR de cirrose era 5,1 (Yee et al., 2000). Estes dois últimos estudos referem-se a populações caucasianas. Numa área endémica de HC no Japão este alelo também foi associado à fibrose hepática (Kusumoto et al., 2006).

O alelo A na posição -238 do promotor foi associado a maior risco de infecção, maiores viremias pré-tratamento mas ausência de relação com a resposta à terapêutica (Rosen et al., 2002a).

Na população portuguesa com artrite reumatoide, o genótipo GG na posição -308 do TNF- α foi associado a mais lesões observáveis na radiologia e menor capacidade de trabalho (Fonseca et al., 2007).

A frequência dos alelos de ACP1 no grupo de controlo é semelhante à descrita noutras populações europeias, predominando o alelo B (62%). Mas no grupo com HC predomina o alelo A (74%). O alelo A está associado a menor actividade fosfatásica do que o B. A ordem crescente de actividade foi definida por Dissing et al do seguinte modo: AA < AB < BB ~ AC < BC < CC. Na base de observações prévias demonstrando associações entre actividades enzimáticas, os genótipos podem ser divididos em 2 classes: baixa actividade (A+BA) e actividade média-elevada (B+CA+CB) (Bottini et al., 2002). Nos portadores de HC predominam genótipos associados a baixa actividade fosfatásica, o que é semelhante ao descrito em portadores de asma, uma doença com polarização Th2. Numa amostra de população italiana, os fenótipos de ACP1 com baixa actividade são mais frequentes na asma (50%), e nos controlos normais (40%) e apenas 32,4% na doença de Crohn, uma doença caracterizada por polarização Th1.

A hipótese que colocámos inicialmente era que em indivíduos portadores de genótipos associados a maior actividade de ACP1 ocorreria maior interferência com as vias de sinalização do interferão e assim tendência à persistência de infecção e também para que a administração exógena de IFN não produzisse o efeito desejado. Assim seria de esperar o predomínio de genótipos associados a maior actividade nos doentes sem resposta sustentada. Na população estudada com HC predominam os genótipos associados a actividade baixa ou intermédia. O genótipo associado a actividade elevada, BC, surgiu num único caso de resposta sustentada (1% dos doentes comparativamente com 4,5% do grupo de controlo). A fosfatase previamente descrita na via de sinalização do IFN foi uma fosfatase de serina-treonina, a PP2A (Christen et al., 2007).

A ACP-1 tem outras funções, entre elas induzir a sinalização após activação dos receptores de células T (TCR), por desfosforilação de uma tirosina fosforilada em ZAP70. A presença de

genótipos associados a baixa actividade fosfatásica conduzirá a uma menor activação de vias de sinalização de tirosina cinase após estímulo de TCR por células apresentadoras de antígenos virais, podendo explicar o déficite funcional das células T CD8 na HC. No nosso trabalho predominam genótipos de ACP1 com isoenzima lenta e de baixa actividade fosfatásica nos doentes com VHC, o que indica uma menor activação de ZAP 70 e menor sinalização via TCR comparativamente com os não infectados do grupo de controlo. Por outro lado estes indivíduos com HC são a fracção daqueles que não conseguiram depurar o VHC na fase inicial da infecção.

A acção da ACP1 sobre o citoesqueleto e redistribuição de receptores à superfície do linfócito T condiciona a eficiência de apresentação antigénica por células apresentadoras profissionais ou pelos próprios hepatócitos infectados. A co-localização de TCR e LFA-1 é um acontecimento fundamental no encontro dos linfócitos T com as células apresentadoras de antígenos. A ACP1 move-se para o citoesqueleto onde desfosforila FAK, que tem acção na modulação e rearranjo do citoesqueleto. A inibição de FAK provocada pela ACP-1 tem consequentes alterações na distribuição celular de TCR e LFA-1 e na actividade do TCR. A sobre-expressão de ACP1 em células da linhagem jurkat conduz a diminuição de adesão célula-célula mediada por LFA-1 após activação do TCR e também nas vias a jusante de FAK. Há redução da colocação de TCR e LFA-1 numa determinada zona da superfície do linfócito T, prevenindo alterações no estado de avidéz do TCR (Giannoni et al., 2003). A presença de genótipo associado a baixa actividade de ACP1 estará associado a menor inibição de FAK e a maior eficiência de contacto célula-célula. Assim uma menor actividade de ACP1 estará associada a maior eficiência da apresentação de antígenos víricos e simultaneamente menor activação das vias de sinalização via receptor de células T.

B. Conclusões

Num grupo de doentes portugueses com características semelhantes quanto ao tipo de VHC (viremia e genotipo) e tipo de lesão hepática (fibrose e actividade inflamatória) submetidos a terapêutica com interferão peguilado constatou-se:

- A distribuição de genótipos da OPN e ACP1 é significativamente diferente na HC comparativamente a indivíduos doadores de sangue. Na HC são mais frequentes os genótipos com actividade fosfatásica da ACP1 baixa: AA e AB (OR= 9,99, IC 95% 4,65 a 21,5), e genótipo TT (OR= 2,22, IC 95% 1-4,9) e CC (OR=2,64, IC 95% 1-6,94) da variante polimórfica do gene da OPN. Não se verificaram diferenças quanto á variante polimórfica no promotor do TNF α (-308).

De acordo com estes dados, os genótipos da OPN e ACP1 são factores do hospedeiro associados a susceptibilidade para a HC.

- O genótipo da variante polimórfica do gene da OPN (C8090T) está associado ao tipo de resposta à terapêutica antiviral. A presença de alelo C associa-se a OR de resposta sustentada de 3,32 (IC 95% 1,34-8,26). A presença de alelo T associa-se a maior probabilidade de ausência de resposta sustentada, OR 0,29 (IC 95% 0,12-0,71)
- As variantes polimórficas do TNF- α (A-308G) e da ACP1 não se associam a diferenças no tipo de resposta à terapêutica
- O genótipo CC da variante polimórfica do gene da OPN apresenta valores medianos de níveis plasmáticos da proteína maiores que os portadores de genótipo TT.
- Os valores medianos da concentração plasmática de OPN são mais elevadas naqueles com resposta sustentada.

De acordo com estes dados o genótipo da OPN (C8090T) é um factor do hospedeiro associado à resposta terapêutica do VHC. A presença de alelo C e níveis plasmáticos de OPN mais elevados estão associados a maior probabilidade de resposta sustentada, o que é sinal de maior indução de polarização em resposta Th1.

V. RESUMO

A hepatite C crónica (HC) é um problema de saúde pública pelo número de infectados (3% da população mundial e dos quais 150000 portugueses) e pelo potencial de evolução para cirrose, doença hepática terminal e carcinoma hepatocelular em muitos deles. O tratamento mais eficaz (interferão peguilado e ribavirina) tem taxas de resposta variáveis entre 45 e 80% e efeitos laterais importantes. A sua duração depende do genótipo e da resposta virológica após as primeiras 12 semanas de terapêutica. Genótipo e carga viral são factores independentes de resposta, mas desconhece-se porque é que com o mesmo genótipo e carga viral semelhante diferentes hospedeiros têm diferentes respostas ao tratamento. Genótipo 1 e viremia elevada, maior diversidade de *quasiespecies*, as variações na sequência NS5A- domínio determinante de sensibilidade ao IFN foram associados a menor resposta. Vários estudos têm tentado identificar factores do hospedeiro na resposta à terapêutica como a raça, expressão génica, alelos HLA- DRB e HLA classe I, polimorfismos de genes de citocinas como interferão- γ , TNF- α , de genes de resposta ao interferão. A análise de expressão génica por microarray permitiu usar 8 genes como discriminadores de resposta. Os níveis de citocinas e de supressores das suas vias de sinalização (SOCS, IP-10) pré-tratamento também se correlacionam com a resposta.

O *objectivo* foi determinar se, numa amostra de indivíduos com HC os polimorfismos de genes associados a polarização da resposta imune em Th1, a mecanismo de lesão hepática e a vias de sinalização após activação do TCR e/ ou do IFN (respectivamente OPN, TNF- α , ACP1) poderiam condicionar diferenças na resposta à terapêutica. Também se compararam doentes com indivíduos saudáveis e correlacionaram os genótipos de OPN com os seus níveis plasmáticos. Foram seleccionados doentes portadores de VHC genótipo 1 e 4.

Material: na análise foram incluídos 95 doentes submetidos a terapêutica com interferão peguilado e ribavirina de acordo com o estado da arte. O grupo de controlo foi constituído por doadores de sangue. O grupo de doentes foi classificado segundo o tipo de resposta à terapêutica:

não respondedores (NR); resposta no final da terapêutica e recidiva (RR); resposta sustentada (RS). O grupo de NRS inclui os NR e os RR.

Métodos: foi feita colheita de sangue total para extracção de ADN e plasma. Os polimorfismos foram avaliados por técnica de PCR-RFLP: 8090 OPN (C/T), -308 TNF- α (A/G), ACP1 (A/B/C). O doseamento de osteopontina plasmática no grupo de doentes foi realizado por ELISA. Análise estatística usando o SPPSS versão 13.

Resultados: a distribuição de genótipos de OPN e ACP1 é significativamente diferente no grupo de controlo comparativamente a doentes com HC. Os genótipos TT da OPN, GG do TNF- α , AA e AB da ACP1 são mais frequentes no grupo HC. OR (odds ratio) para HC é de: 2,22 para o genótipo TT OPN, 1,57 se TNF- α AA ou AG, e 9,99 se genótipos de ACP1 associados a baixa actividade fosfatásica (AA ou AB). O grupo doente com HC incluiu 87 indivíduos portadores de VHC genótipo 1; e 8 com genótipo 4. De acordo com a resposta o grupo HC subdivide-se em: NR - n=43; RR - n=16; RS n=36; NRS-n=59. Não se observaram diferenças significativas quanto a idade, sexo, viremia, genótipo, actividade histológica e estadio de fibrose nestes subgrupos. Predomina o genótipo da OPN TT na NRS e CC na RS. A razão de probabilidades (OR) de RS versus NRS na presença é 3,32 na presença pelo menos 1 alelo T e 0,29 na presença de alelo C da variante polimórfica da osteopontina. Não se observaram diferenças significativas quanto aos polimorfismos da ACP1 nos vários subgrupos de resposta à terapêutica. A ausência de resposta sustentada cursa com medianas de níveis plasmáticos menores que também são menores no genótipo TT. Os níveis mais baixos foram medidos nos casos de RR.

Conclusões: de acordo com os os nossos resultados, os genótipos da OPN e ACP1 estão associados a susceptibilidade para a HC e o genótipo da OPN é um factor do hospedeiro associado à resposta terapêutica do VHC. Há tendência para níveis de OPN plasmática mais elevados nos respondedores e menores nos que recidivam após terem obtido resposta virológica no final da terapêutica.

VI. ABSTRACT

Chronic hepatitis C (HC) is a major public health problem because of the number of infected persons (3% of the world population and about 150000 Portuguese individuals) and the potential to cause cirrhosis, end-stage liver disease, and hepatocellular carcinoma in many of those infected. The most effective treatment (pegylated interferon and ribavirin) has variable response rates, between 45 e 80%, and major side effects. Treatment duration depends on viral genotype and virological response after the first 12 weeks on therapy. Genotype and viral load are independent factors of response. However, the question is why hosts infected with same genotype and similar viral loads have different treatment response rates. Genotype 1, high viral load, higher quasispecies diversity, NS5A *interferon determining sensitivity domain variations* was associated with lower responses. Others identified host factors for therapy response such as race, gene expression, HLA-DRB and class I alleles and cytokine gene polymorphisms as interferon- γ , TNF- α , interferon response genes. Gene expression analysis by microarrays found 8 genes as response discriminants. Pre-treatment cytokine and suppressors of cytokine levels may also correlate with treatment response.

Our aim was to analyse if host genetic polymorphisms related to Th1 immune response polarization, hepatic lesion mechanisms and signaling after TCR activation or IFN signaling - OPN, TNF- α , ACP1 respectively could explain different treatment responses. We also analysed healthy individuals and correlated OPN plasma levels and OPN genotypes. Patients with HCV genotype 1 and 4 were included.

Material: 95 patients treated with pegylated interferon and ribavirin were selected. Control group included healthy blood donors. HC group was classified according to treatment response type: non responders (NR); end of treatment response and relapse (RR); Sustained response (SR). Absence of SR (NSR) = NR+RR. Methods: Blood was collected for DNA and plasma extraction. Genetic polymorphisms were performed by PCR-RFLP: 8090 OPN (C/T), -308 TNF- α

(A/G), ACP1 (A/B/C). Plasma OPN concentrations measured by ELISA commercial Kit. Statistical analysis: SPSS vs13.

Results: OPN and ACP1 genotype distribution was significantly different in subjects with HC in comparison with those of control group. OPN TT genotype, TNF- α GG, ACP1 AA and AB are more frequent in HC group. OR for HC was : 2,22 if OPN TT genotype, 1,57 if TNF- α AA or AG, and 9,99 if ACP1 with lower phosphatasic activity. 87 CHC patients were infected by genotype 1 virus and 8 by genotype 4. According to treatment response HC subgroups are: 43 NR, 16 RR, 36 SR and 59 NSR. No significant differences were observed between those groups concerning age, sex, viral load, histological activity and fibrosis stages. OPN TT allele carriers predominate in NSR and CC predominate in SR. OR for SR versus NSR is 3,32 if one T allele is present and 0,29 if one C allele is present. TNF- α and ACP1 genotypes were not significantly different in those treatment response subgroups.

NSR has lower median plasma OPN levels. Also TT genotypes had lower levels. RR patients had the lowest levels plasma OPN levels.

Conclusions: our results suggest that both OPN and ACP1 genotypes are related to HC susceptibility. OPN genotype is a host factor related to treatment response and that there is a trend toward higher median plasma OPN levels in responders.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium (1999). *J. Viral Hepat.*, *6*, 35-47.
- (2007). In B. Goldstein (Ed.), *Tyrosine Phosphoprotein Phosphatases* (second ed., Oxford University Press).
- Agnholt, J., Kelsen, J., Schack, L., Hvas, C. L., Dahlerup, J. F., & Sorensen, E. S. (2007). Osteopontin, a protein with cytokine-like properties, is associated with inflammation in Crohn's disease. *Scand.J.Immunol.*, *65*, 453-460.
- Anand, B. S., Currie, S., Dieperink, E., Bini, E. J., Shen, H., Ho, S. B. et al. (2006). Alcohol use and treatment of hepatitis C virus: results of a national multicenter study. *Gastroenterology.*, *130*, 1607-1616.
- Andre, P., Perlemuter, G., Budkowska, A., Brechot, C., & Lotteau, V. (2005). Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Semin.Liver Dis.*, *25*, 93-104.
- Ank, N., West, H., Bartholdy, C., Eriksson, K., Thomsen, A. R., & Paludan, S. R. (2006). Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. *J. Virol.*, *80*, 4501-4509.
- Apte, U. M., Banerjee, A., McRee, R., Wellberg, E., & Ramaiah, S. K. (2005). Role of osteopontin in hepatic neutrophil infiltration during alcoholic steatohepatitis. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, *207*, 25-38.
- Arafat, H. A., Lada, E., Katakam, A. K., & Amin, N. (2006). Osteopontin deficiency impacts the pancreatic TH1/TH2 cytokine profile following multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes*, *114*, 555-562.
- Arai, M., Yokosuka, O., Kanda, T., Fukai, K., Imazeki, F., Muramatsu, M. et al. (2006). Serum osteopontin levels in patients with acute liver dysfunction. *Scand.J.Gastroenterol.*, *41*, 102-110.
- Asahina, Y., Izumi, N., Umeda, N., Hosokawa, T., Ueda, K., Doi, F. et al. (2007). Pharmacokinetics and enhanced PKR response in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin. *J. Viral Hepat.*, *14*, 396-403.
- Ashkar, S., Weber, G. F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Jansson, M., Zawaideh, S. et al. (2000). Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, *287*, 860-864.
- Bahr, M. J., el, M. M., Boeker, K. H., Musholt, P. B., Manns, M. P., & Lichtinghagen, R. (2003). Cytokine gene polymorphisms and the susceptibility to liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.*, *23*, 420-425.
- Barrett, S., Collins, M., Kenny, C., Ryan, E., Keane, C. O., & Crowe, J. (2003). Polymorphisms in tumour necrosis factor-alpha, transforming growth factor-beta, interleukin-10, interleukin-6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection. *J.Med.Virol.*, *71*, 212-218.
- Bathgate, A. J., Pravica, V., Perrey, C., Hayes, P. C., & Hutchinson, I. V. (2000). Polymorphisms in tumour necrosis factor alpha, interleukin-10 and transforming growth factor beta1 genes and end-stage liver disease. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.*, *12*, 1329-1333.
- Bertoletti, A. & Ferrari, C. (2003). Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology.*, *38*, 4-13.
- Bhogal, R. K. & Bona, C. A. (2005). B cells: no longer bystanders in liver fibrosis. *J.Clin.Invest*, *115*, 2962-2965.
- Billiau, A. (2006). Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Factor Rev.*, *17*, 381-409.

- Bottini, N., Ammendola, M., & Gloria-Bottini, F. (2002). ACP1 is associated with allergy. *Allergy*, *57*, 651-652.
- Bottini, N., Gloria-Bottini, F., Amante, A., Saccucci, P., & Bottini, E. (2005). Genetic polymorphism and TH1/TH2 orientation. *Int.Arch.Allergy Immunol.*, *138*, 328-333.
- Bourdi, M., Eiras, D. P., Holt, M. P., Webster, M. R., Reilly, T. P., Welch, K. D. et al. (2007). Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 double knockout mouse model uniquely susceptible to acetaminophen-induced liver injury. *Chem.Res.Toxicol.*, *20*, 208-216.
- Bowen, D. G. & Walker, C. M. (2005). Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature.*, *436*, 946-952.
- Bowie, A. G. (2007). Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in antiviral immunity. *Clin.Exp.Immunol.*, *147*, 217-226.
- Bressler, B. L., Guindi, M., Tomlinson, G., & Heathcote, J. (2003). High body mass index is an independent risk factor for nonresponse to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Hepatology.*, *38*, 639-644.
- Brown, R. S. (2005). Hepatitis C and liver transplantation. *Nature*, *436*, 973-978.
- Butera, D., Marukian, S., Iwamaye, A. E., Hembrador, E., Chambers, T. J., Di Bisceglie, A. M. et al. (2005). Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood*, *106*, 1175-1182.
- Capobianchi, M. R., Abbate, I., Cappiello, G., & Solmone, M. (2003). HCV and interferon: viral strategies for evading innate defence mechanisms in the virus-host battle. *Cell Death.Differ.*, *10 Suppl 1:S22-4.*, S22-S24.
- Carvalho, A., Santos, A., Santos, R. M., Sargento, C., Lopes, R., & Porto, A. (1991). Hepatite C - Estudo da prevalência do anti-VHC num Serviço de Medicina Interna. *Revista de Gastroenterologia*, *8*, 59-64.
- Carvalho, R. (2005). Tese de licenciatura em Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Chabas, D., Baranzini, S. E., Mitchell, D., Bernard, C. C., Rittling, S. R., Denhardt, D. T. et al. (2001). The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*, *294*, 1731-1735.
- Chang, K. M. (2003). Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Clin.Liver Dis.*, *7*, 89-105.
- Chen, L., Borozan, I., Feld, J., Sun, J., Tannis, L. L., Coltescu, C. et al. (2005). Hepatic gene expression discriminates responders and nonresponders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology.*, *128*, 1437-1444.
- Cheung, R. C., Currie, S., Shen, H., Ho, S. B., Bini, E. J., Anand, B. S. et al. (2005). Chronic hepatitis C in Latinos: natural history, treatment eligibility, acceptance, and outcomes. *American Journal of Gastroenterology*, *100*, 2186-2193.
- Chisari, F. V. (2005). Unscrambling hepatitis C virus-host interactions. *Nature.*, *436*, 930-932.
- Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., & Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.*, *244*, 359-362.
- Choo, Q. L., Richman, K. H., Han, J. H., Berger, K., Lee, C., Dong, C. et al. (1991). Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *88*, 2451-2455.
- Christen, V., Treves, S., Duong, F. H., & Heim, M. H. (2007). Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A. *Hepatology.*, ..
- D'Arena, G., Tarnani, M., Rumi, C., Vaisitti, T., Aydin, S., De, F. R. et al. (2007). Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. *Am.J.Hematol.*

- Da Silva, A. P., Neves, J., Bicho, M. C., Carvalho, R., Lopes, C., Clara, J. P. et al. (2006). Activity of two enzymes associated with apoptosis and cell aging in arterial hypertension. *Rev.Port.Cardiol.*, 25, 189-195.
- Da Silva, A. P., Sardinha, L. B., Llobet, S., Marta, M. J., Albergaria, F., Torres, A. L. et al. (2002). [Erythrocytic acid phosphatase genetic polymorphism and cardiovascular risk in health children and adolescents]. *Rev.Port.Cardiol.*, 21, 65-71.
- Dai, C. Y., Chuang, W. L., Chang, W. Y., Chen, S. C., Lee, L. P., Hsieh, M. Y. et al. (2005). Polymorphisms in the interferon-gamma gene at position +874 in patients with chronic hepatitis C treated with high-dose interferon-alpha and ribavirin. *Antiviral Res.*, 67, 93-97.
- Dai, C. Y., Chuang, W. L., Chang, W. Y., Chen, S. C., Lee, L. P., Hsieh, M. Y. et al. (2006a). Tumor Necrosis Factor- alpha Promoter Polymorphism at Position -308 Predicts Response to Combination Therapy in Hepatitis C Virus Infection. *J.Infect.Dis.*, 193, 98-101.
- Dai, C. Y., Chuang, W. L., Lee, L. P., Chen, S. C., Hou, N. J., Lin, Z. Y. et al. (2006b). Associations of tumour necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 and -238 with clinical characteristics of chronic hepatitis C. *J.Viral Hepat.*, 13, 770-774.
- De, M. S., Seki, E., Uchinami, H., Kluwe, J., Zhang, Y., Brenner, D. A. et al. (2007). Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*, 132, 1937-1946.
- Diago, M., Castellano, G., Garcia-Samaniego, J., Perez, C., Fernandez, I., Romero, M. et al. (2006). Association of pretreatment serum interferon gamma inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. *Gut.*, 55, 374-379.
- Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D. et al. (2004). Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell-mediated liver diseases. *Immunity.*, 21, 539-550.
- Dienstag, J. L. & McHutchison, J. G. (2006). American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology*, 130, 225-230.
- Dissing, J., Thymann, M., & Hopkinson, D. (2003). Simultaneous detection of ACP1 and GC genotypes using PCR/SSCP. *Ann.Hum.Genet.*, 67, 81-85.
- Dolganiuc, A., Chang, S., Kodys, K., Mandrekar, P., Bakis, G., Cormier, M. et al. (2006). Hepatitis C virus (HCV) core protein-induced, monocyte-mediated mechanisms of reduced IFN-alpha and plasmacytoid dendritic cell loss in chronic HCV infection. *J.Immunol.*, 177, 6758-6768.
- Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Do, T., Romics, L., Jr. et al. (2003). Hepatitis C virus core and nonstructural protein 3 proteins induce pro- and anti-inflammatory cytokines and inhibit dendritic cell differentiation. *J.Immunol.*, 170, 5615-5624.
- Dolganiuc, A., Oak, S., Kodys, K., Golenbock, D. T., Finberg, R. W., Kurt-Jones, E. et al. (2004). Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology.*, 127, 1513-1524.
- Duong, F. H., Christen, V., Berke, J. M., Penna, S. H., Moradpour, D., & Heim, M. H. (2005). Upregulation of protein phosphatase 2Ac by hepatitis C virus modulates NS3 helicase activity through inhibition of protein arginine methyltransferase 1. *J.Virol.*, 79, 15342-15350.
- Dustin, L. B. & Rice, C. M. (2007). Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu.Rev.Immunol.*, 25:71-99., 71-99.
- Fernandes, H., Koneru, B., Fernandes, N., Hameed, M., Cohen, M. C., Raveche, E. et al. (2002). Investigation of promoter polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes in liver transplant patients. *Transplantation*, 73, 1886-1891.
- Fonseca, J. E., Cavaleiro, J., Teles, J., Sousa, E., Androozzi, V. L., Antunes, M. et al. (2007). Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Arthritis Res.Ther.*, 9, R37.
- Freeman, R. B., Jr., Tran, C. L., Mattoli, J., Patel, K., Supran, S., Basile, F. G. et al. (1999). Tumor necrosis factor genetic polymorphisms correlate with infections after liver transplantation. NEMC

- TNF Study Group. New England Medical Center Tumor Necrosis Factor. *Transplantation*, 67, 1005-1010.
- Frese, M., Barth, K., Kaul, A., Lohmann, V., Schwarzle, V., & Bartenschlager, R. (2003). Hepatitis C virus RNA replication is resistant to tumour necrosis factor- α . *J.Gen. Virol.*, 84, 1253-1259.
- Frese, M., Schwarzle, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S. et al. (2002). Interferon- γ inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology*, 35, 694-703.
- Friedman, S. L. (2004). Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat.Clin Pract.Gastroenterol.Hepatol.*, 1, 98-105.
- Friedman, S. L., Rockey, D. C., & Bissell, D. M. (2007). Hepatic fibrosis 2006: report of the Third AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.*, 45, 242-249.
- Gale, M., Jr. & Foy, E. M. (2005). Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, 436, 939-945.
- Gao, C., Guo, H., Mi, Z., Grusby, M. J., & Kuo, P. C. (2007). Osteopontin induces ubiquitin-dependent degradation of STAT1 in RAW264.7 murine macrophages. *J.Immunol.*, 178, 1870-1881.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Kadkhoda, K., Alavian, S. M., Bay, G. H., & Los, M. (2005). Apoptosis in liver diseases--detection and therapeutic applications. *Med.Sci.Monit.*, 11, RA337-RA345.
- Giacopelli, F., Marciano, R., Pistorio, A., Catarsi, P., Canini, S., Karsenty, G. et al. (2004). Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity. *Physiol Genomics.*, 20, 87-96.
- Giacopelli, F., Rosatto, N., Divizia, M. T., Cusano, R., Caridi, G., & Ravazzolo, R. (2003). The first intron of the human osteopontin gene contains a C/EBP- β -responsive enhancer. *Gene Expr.*, 11, 95-104.
- Giannoni, E., Chiarugi, P., Cozzi, G., Magnelli, L., Taddei, M. L., Fiaschi, T. et al. (2003). Lymphocyte function-associated antigen-1-mediated T cell adhesion is impaired by low molecular weight phosphotyrosine phosphatase-dependent inhibition of FAK activity. *J.Biol.Chem.*, 278, 36763-36776.
- Golden, V. L. & Sensabaugh, G. F. (1986). Phenotypic variation in the phosphotransferase activity of human red cell acid phosphatase (ACP1). *Hum.Genet.*, 72, 340-343.
- Gravallese, E. M. (2003). Osteopontin: a bridge between bone and the immune system. *J.Clin.Invest.*, 112, 147-149.
- Gutcher, I. & Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J.Clin.Invest.*, 117, 1119-1127.
- Han, J. Q., Wroblewski, G., Xu, Z., Silverman, R. H., & Barton, D. J. (2004). Sensitivity of hepatitis C virus RNA to the antiviral enzyme ribonuclease L is determined by a subset of efficient cleavage sites. *J.Interferon Cytokine Res.*, 24, 664-676.
- Hashimoto, M., Sun, D., Rittling, S. R., Denhardt, D. T., & Young, W. (2007). Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *J.Neurosci.*, 27, 3603-3611.
- Hay, S. & Kannourakis, G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J.Gen. Virol.*, 83, 1547-1564.
- Hayashi, J., Stoyanova, R., & Seeger, C. (2005). The transcriptome of HCV replicon expressing cell lines in the presence of alpha interferon. *Virology.*, 335, 264-275.
- Hayashida, K., Daiba, A., Sakai, A., Tanaka, T., Kaji, K., Inaba, N. et al. (2005). Pretreatment prediction of interferon- α efficacy in chronic hepatitis C patients. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.*, 3, 1253-1259.
- Herrmann, E. & Zeuzem, S. (2006). The kinetics of hepatitis C virus. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.*, 18, 339-342.

- Hezode, C., Roudot-Thoraval, F., Nguyen, S., Grenard, P., Julien, B., Zafrani, E. S. et al. (2005). Daily cannabis smoking as a risk factor for progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*, *42*, 63-71.
- Hummelshoj, T., Ryder, L. P., Madsen, H. O., Odum, N., & Svejgaard, A. (2006). A functional polymorphism in the Eta-1 promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. *Mol.Immunol.*, *43*, 980-986.
- Iso, Y., Sawada, T., Okada, T., & Kubota, K. (2005). Loss of E-cadherin mRNA and gain of osteopontin mRNA are useful markers for detecting early recurrence of HCV-related hepatocellular carcinoma. *J.Surg.Oncol.*, *92*, 304-311.
- Itsui, Y., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Kanazawa, N., Tanabe, Y., Koyama, T. et al. (2006). Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J.Viral Hepat.*, *13*, 690-700.
- Jaeschke, H. (2006). Mechanisms of Liver Cell Destruction. In T.D.Boyer, T. L. Wright, & M. P. Manns (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology. A Textbook of Liver Diseases* (5th ed., pp. 37-51). Philadelphia: Saunders Elsevier.
- Jiao, J. & Wang, J. B. (2005). Hepatitis C virus genotypes, HLA-DRB alleles and their response to interferon-alpha and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatobiliary.Pancreat.Dis.Int.*, *4*, 80-83.
- Kawashima, R., Mochida, S., Matsui, A., YouLuTuZ, Y., Ishikawa, K., Toshima, K. et al. (1999). Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *256*, 527-531.
- Kinnman, N., Andersson, U., & Hultcrantz, R. (2000). In situ expression of transforming growth factor-beta1-3, latent transforming growth factor-beta binding protein and tumor necrosis factor-alpha in liver tissue from patients with chronic hepatitis C. *Scand.J.Gastroenterol.*, *35*, 1294-1300.
- Knapp, S., Hennig, B. J., Frodsham, A. J., Zhang, L., Hellier, S., Wright, M. et al. (2003). Interleukin-10 promoter polymorphisms and the outcome of hepatitis C virus infection. *Immunogenetics*, *55*, 362-369.
- Kramer, A. B., Ricardo, S. D., Kelly, D. J., Waanders, F., van, G. H., & Navis, G. (2005). Modulation of osteopontin in proteinuria-induced renal interstitial fibrosis. *J.Pathol.*, *207*, 483-492.
- Kusumoto, K., Uto, H., Hayashi, K., Takahama, Y., Nakao, H., Suruki, R. et al. (2006). Interleukin-10 or tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan. *Cytokine.*, *34*, 24-31.
- Lagging, M., Romero, A. I., Westin, J., Norkrans, G., Dhillon, A. P., Pawlotsky, J. M. et al. (2006). IP-10 predicts viral response and therapeutic outcome in difficult-to-treat patients with HCV genotype 1 infection. *Hepatology.*, *44*, 1617-1625.
- Larrea, E., Garcia, N., Qian, C., Civeira, M. P., & Prieto, J. (1996). Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology.*, *23*, 210-217.
- Lefkowitz, J. H., Schiff, E. R., Davis, G. L., Perrillo, R. P., Lindsay, K., Bodenheimer, H. C., Jr. et al. (1993). Pathological diagnosis of chronic hepatitis C: a multicenter comparative study with chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. *Gastroenterology*, *104*, 595-603.
- Liaw, L., Birk, D. E., Ballas, C. B., Whitsitt, J. S., Davidson, J. M., & Hogan, B. L. (1998). Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J.Clin.Invest*, *101*, 1468-1478.
- Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. (2005). Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function. *Nature*, *436*, 933-938.
- Loffreda, S., Muratori, P., Muratori, L., Mele, L., Bianchi, F. B., & Lenzi, M. (2003). Enhanced monocyte Th1 cytokine production in HCV-infected cryoglobulinemic patients. *Journal of Hepatology*, *38*, 230-236.

- Lorena, D., Darby, I. A., Gadeau, A. P., Leen, L. L., Rittling, S., Porto, L. C. et al. (2006). Osteopontin expression in normal and fibrotic liver. altered liver healing in osteopontin-deficient mice. *Journal of Hepatology*, *44*, 383-390.
- Mackay, I. R. (2002). Hepatoimmunology: a perspective. *Immunol.Cell Biol.*, *80*, 36-44.
- Marinho, R. T., Moura, M. C., Giria, J. A., & Ferrinho, P. (2001). Epidemiological aspects of hepatitis C in Portugal. *J.Gastroenterol.Hepatol.*, *16*, 1076-1077.
- Marinho, R. T., Pinto, R., Santos, M. L., Lobos, I. V., & Moura, M. C. (2004a). Effects of interferon and ribavirin combination therapy on CD4+ proliferation, lymphocyte activation, and Th1 and Th2 cytokine profiles in chronic hepatitis C. *J.Viral Hepat.*, *11*, 206-216.
- Marinho, R. T., Pinto, R. M., Santos, M. L., & de Moura, M. C. (2004b). Lymphocyte T helper-specific reactivity in sustained responders to interferon and ribavirin with negativation (seroreversion) of anti-hepatitis C virus. *Liver Int.*, *24*, 413-418.
- Martinez-Bauer, E., Crespo, J., Romero-Gomez, M., Moreno-Otero, R., Sola, R., Tesei, N. et al. (2006). Development and validation of two models for early prediction of response to therapy in genotype 1 chronic hepatitis C. *Hepatology.*, *43*, 72-80.
- McManus, R., Wilson, A. G., Mansfield, J., Weir, D. G., Duff, G. W., & Kelleher, D. (1996). TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur.J.Immunol.*, *26*, 2113-2118.
- Mitchell, S. A., Grove, J., Spurkland, A., Boberg, K. M., Fleming, K. A., Day, C. P. et al. (2001). Association of the tumour necrosis factor alpha -308 but not the interleukin 10 -627 promoter polymorphism with genetic susceptibility to primary sclerosing cholangitis. *Gut*, *49*, 288-294.
- Mochida, S., Hashimoto, M., Matsui, A., Naito, M., Inao, M., Nagoshi, S. et al. (2004a). Genetic polymorphisms in promoter region of osteopontin gene may be a marker reflecting hepatitis activity in chronic hepatitis C patients. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *313*, 1079-1085.
- Mochida, S., Yoshimoto, T., Mimura, S., Inao, M., Matsui, A., Ohno, A. et al. (2004b). Transgenic mice expressing osteopontin in hepatocytes as a model of autoimmune hepatitis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, *317*, 114-120.
- Moradpour, D. & Rice, C. M. (2007). Replication and pathogenesis of Hepatitis C Virus. In T.D.Boyer, T. Wright, & M. Manns (Eds.), *Zakim and Boyer's Hepatology- A Textbook of Liver Disease* (5 ed., pp. 125-148). Elsevier.
- Mustelin, T. (2007). Protein Phosphatase Protocols. In G.Moorhead (Ed.), *Methods in Molecular Biology* (2 ed., pp. 9). Humana Press Inc.
- Mustelin, T., Rahmouni, S., Bottini, N., & Alonso, A. (2003). Role of protein tyrosine phosphatases in T cell activation. *Immunol.Rev.*, *191*, 139-147.
- Naito, M., Matsui, A., Inao, M., Nagoshi, S., Nagano, M., Ito, N. et al. (2005). SNPs in the promoter region of the osteopontin gene as a marker predicting the efficacy of interferon-based therapies in patients with chronic hepatitis C. *J.Gastroenterol.*, *40*, 381-388.
- Napoli, J., Bishop, G. A., McGuinness, P. H., Painter, D. M., & McCaughan, G. W. (1996). Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology*, *24*, 759-765.
- Nau, G. J., Chupp, G. L., Emile, J. F., Jouanguy, E., Berman, J. S., Casanova, J. L. et al. (2000). Osteopontin expression correlates with clinical outcome in patients with mycobacterial infection. *Am.J.Pathol.*, *157*, 37-42.
- Nguyen, H., Sankaran, S., & Dandekar, S. (2006). Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes. *Virology*, *354*, 58-68.
- Niino, M., Kikuchi, S., Fukazawa, T., Yabe, I., & Tashiro, K. (2003). Genetic polymorphisms of osteopontin in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J.Neuroimmunol.*, *136*, 125-129.
- Novobrantseva, T. I., Majeau, G. R., Amatucci, A., Kogan, S., Brenner, I., Casola, S. et al. (2005). Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J.Clin.Invest*, *115*, 3072-3082.

- Okamoto, H. (2006). Osteopontin and cardiovascular system. *Mol.Cell Biochem.*
- Osterreicher, C. H., Stickel, F., & Brenner, D. A. (2007). Genomics of liver fibrosis and cirrhosis. *Semin.Liver Dis.*, 27, 28-43.
- Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M. E., Huster, K. M., Jansson, M., Granucci, F., Shim, D. J. et al. (2001). Analysis of the relationship between viral infection and autoimmune disease. *Immunity.*, 15, 137-147.
- Parker, L. C., Prince, L. R., & Sabroe, I. (2007). Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin.Exp.Immunol.*, 147, 199-207.
- Patzwahl, R., Meier, V., Ramadori, G., & Mihm, S. (2001). Enhanced expression of interferon-regulated genes in the liver of patients with chronic hepatitis C virus infection: detection by suppression-subtractive hybridization. *J.Virol.*, 75, 1332-1338.
- Perelson, A. S., Herrmann, E., Micol, F., & Zeuzem, S. (2005). New kinetic models for the hepatitis C virus. *Hepatology.*, 42, 749-754.
- Poynard, T., Ratziu, V., Charlotte, F., Goodman, Z., McHutchison, J., & Albrecht, J. (2001). Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis c. *Journal of Hepatology.*, 34, 730-739.
- Racanelli, V. & Rehermann, B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology.*, 43, S54-S62.
- Randall, G., Chen, L., Panis, M., Fischer, A. K., Lindenbach, B. D., Sun, J. et al. (2006). Silencing of USP18 potentiates the antiviral activity of interferon against hepatitis C virus infection. *Gastroenterology.*, 131, 1584-1591.
- Rehermann, B. & Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat.Rev.Immunol.*, 5, 215-229.
- Renkl, A. C., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T. et al. (2005). Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation toward a Th1-polarizing phenotype. *Blood.*, 106, 946-955.
- Ritchie, K. J., Hahn, C. S., Kim, K. I., Yan, M., Rosario, D., Li, L. et al. (2004). Role of ISG15 protease UBP43 (USP18) in innate immunity to viral infection. *Nat.Med.*, 10, 1374-1378.
- Rockey, D. C. & Friedman, S. L. (2006). Hepatic Fibrosis and Cirrhosis. In T.D.Boyer, T. L. Wright, & M. Manns (Eds.), *Zachim and Boyer's Hepatology- a Textbook of Liver Disease* (fifth ed., pp. 87-109). Elsevier.
- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., Schmitt, F. L., Paulsson, M., & Lindmark-Mansson, H. (2007). The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.*, 16, 1087-1097.
- Romero, A. I., Lagging, M., Westin, J., Dhillon, A. P., Dustin, L. B., Pawlotsky, J. M. et al. (2006). Interferon (IFN)-gamma-inducible protein-10: association with histological results, viral kinetics, and outcome during treatment with pegylated IFN-alpha 2a and ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *J.Infect.Dis.*, 194, 895-903.
- Romero-Gomez, M., Gonzalez-Escribano, M. F., Torres, B., Barroso, N., Montes-Cano, M. A., Sanchez-Munoz, D. et al. (2003). HLA class I B44 is associated with sustained response to interferon + ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology.*, 98, 1621-1626.
- Romero-Gomez, M., Montes-Cano, M. A., Otero-Fernandez, M. A., Torres, B., Sanchez-Munoz, D., Aguilar, F. et al. (2004). SLC11A1 promoter gene polymorphisms and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut.*, 53, 446-450.
- Rosen, H. R. (2006). How hepatitis injures the liver. In AASLD - Mechanisms of liver injury in emerging therapeutics. Syllabus Postgraduate Course 2006 AASLD.
- Rosen, H. R., McHutchison, J. G., Conrad, A. J., Lentz, J. J., Marousek, G., Rose, S. L. et al. (2002a). Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology.*, 97, 714-720.

- Rosen, H. R., McHutchison, J. G., Conrad, A. J., Lentz, J. J., Marousek, G., Rose, S. L. et al. (2002b). Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *American Journal of Gastroenterology*, *97*, 714-720.
- Round, J. L., Humphries, L. A., Tomassian, T., Mittelstadt, P., Zhang, M., & Miceli, M. C. (2007). Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors. *Nat.Immunol.*, *8*, 154-161.
- Sahai, A., Malladi, P., Pan, X., Paul, R., Melin-Aldana, H., Green, R. M. et al. (2004). Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol.*, *287*, G1035-G1043.
- Saika, S., Shirai, K., Yamanaka, O., Miyazaki, K., Okada, Y., Kitano, A. et al. (2007). Loss of osteopontin perturbs the epithelial-mesenchymal transition in an injured mouse lens epithelium. *Lab Invest*, *87*, 130-138.
- Saitoh, E., Matsui, A., Inao, M., Mimura, S., Koh, H., Ohno, A. et al. (2005). Extrahepatic manifestations in transgenic mice of osteopontin in hepatocytes-A clue to advent of pathological state in various organs of chronic hepatitis C patients. *Hepatol.Res.*, *31*, 197-202.
- Sarrazin, C., Berg, T., Weich, V., Mueller, T., Frey, U. H., Zeuzem, S. et al. (2005). GNB3 C825T polymorphism and response to interferon-alfa/ribavirin treatment in patients with hepatitis C virus genotype 1 (HCV-1) infection. *Journal of Hepatology*, *43*, 388-393.
- Sato, T., Nakai, T., Tamura, N., Okamoto, S., Matsuoka, K., Sakuraba, A. et al. (2005). Osteopontin/Eta-1 upregulated in Crohn's disease regulates the Th1 immune response. *Gut*, *54*, 1254-1262.
- Scheuer, P. J. (1991). Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology*, *13*, 372-374.
- Schiemann, U., Glas, J., Torok, P., Simperl, C., Martin, K., Konig, A. et al. (2003). Response to combination therapy with interferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C according to a TNF-alpha promoter polymorphism. *Digestion.*, *68*, 1-4.
- Schinkel, J., Spaan, W. J., & Kroes, A. C. (2004). Meta-analysis of mutations in the NS5A gene and hepatitis C virus resistance to interferon therapy: uniting discordant conclusions. *Antivir. Ther.*, *9*, 275-286.
- Sen, G. C. (2001). Viruses and interferons. *Annu.Rev.Microbiol.*, *55*:255-81., 255-281.
- Serlin, D. M., Kuang, P. P., Subramanian, M., O'Regan, A., Li, X., Berman, J. S. et al. (2006). Interleukin-1beta induces osteopontin expression in pulmonary fibroblasts. *J.Cell Biochem.*, *97*, 519-529.
- Shackel, N. A., Gorrell, M. D., & McCaughan, G. W. (2002). Gene array analysis and the liver. *Hepatology.*, *36*, 1313-1325.
- Shi, Y., Evans, J. E., & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.*, *425*, 516-521.
- Shi, Z., Wakil, A. E., & Rokey, D. C. (1997). Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, *94*, 10663-10668.
- Shinohara, M. L., Jansson, M., Hwang, E. S., Werneck, M. B., Glimcher, L. H., & Cantor, H. (2005). T-bet-dependent expression of osteopontin contributes to T cell polarization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, *102*, 17101-17106.
- Shinohara, M. L., Lu, L., Bu, J., Werneck, M. B., Kobayashi, K. S., Glimcher, L. H. et al. (2006). Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells. *Nat.Immunol.*, *7*, 498-506.
- shton-Rickardt, P. G. (2005). The granule pathway of programmed cell death. *Crit Rev.Immunol.*, *25*, 161-182.

- Smith, M. W., Yue, Z. N., Korth, M. J., Do, H. A., Boix, L., Fausto, N. et al. (2003). Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology*, 38, 1458-1467.
- Stauber, R. E. & Stadlbauer, V. (2006). Novel approaches for therapy of chronic hepatitis C. *J.Clin.Virol.*, 36, 87-94.
- Su, A. I., Pezacki, J. P., Wodicka, L., Brideau, A. D., Supekova, L., Thimme, R. et al. (2002). Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99, 15669-15674.
- Suzuki, F., Arase, Y., Suzuki, Y., Tsubota, A., Akuta, N., Hosaka, T. et al. (2004). Single nucleotide polymorphism of the MxA gene promoter influences the response to interferon monotherapy in patients with hepatitis C viral infection. *J.Viral Hepat.*, 11, 271-276.
- Szabo, G. & Dolganiuc, A. (2006). HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. *Clin.Liver Dis.*, 10, 753-771.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000b). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100, 655-669.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000a). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 100, 655-669.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., & Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, 21:713-58. Epub;2001 Dec;19, 713-758.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Stemmann, C., Satoskar, A. R., Sleckman, B. P., & Glimcher, L. H. (2002). Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science*, 295, 338-342.
- Tajiri, T., Tate, G., Kunimura, T., Endo, Y., Inoue, K., Mitsuya, T. et al. (2005). Osteopontin expression in proliferated bile ductules: the correlation with liver damage in fulminant hepatitis. *Dig.Dis.Sci.*, 50, 188-195.
- Takafuji, V., Forgues, M., Unsworth, E., Goldsmith, P., & Wang, X. W. (2007). An osteopontin fragment is essential for tumor cell invasion in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*.
- Takaoka, A. & Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.*, 8, 907-922.
- Tang, H., Wang, J., Bai, F., Hong, L., Liang, J., Gao, J. et al. (2007). Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer. *Biochem.Cell Biol.*, 85, 103-110.
- Taylor, M. W., Tsukahara, T., Brodsky, L., Schaley, J., Sanda, C., Stephens, M. J. et al. (2007). Changes in gene expression during pegylated interferon and ribavirin therapy of chronic hepatitis C virus distinguish responders from nonresponders to antiviral therapy. *J.Virol.*, 81, 3391-3401.
- Tokushige, K., Tsuchiya, N., Hasegawa, K., Hashimoto, E., Yamauchi, K., Komatsu, T. et al. (2003). Influence of TNF gene polymorphism and HLA-DRB1 haplotype in Japanese patients with chronic liver disease caused by HCV. *American Journal of Gastroenterology*, 98, 160-166.
- Valenti, L., Pulixi, E., Fracanzani, A. L., Dongiovanni, P., Maggioni, M., Orsatti, A. et al. (2005). TNFalpha genotype affects TNFalpha release, insulin sensitivity and the severity of liver disease in HCV chronic hepatitis. *Journal of Hepatology*, 43, 944-950.
- Vidigal, P. G., Germer, J. J., & Zein, N. N. (2002). Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. *Journal of Hepatology*, 36, 271-277.
- Waggoner, S. N., Cruise, M. W., Kassel, R., & Hahn, Y. S. (2005). gC1q receptor ligation selectively down-regulates human IL-12 production through activation of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J.Immunol.*, 175, 4706-4714.
- Walsh, M. J., Jonsson, J. R., Richardson, M. M., Lipka, G., Purdie, D., Clouston, A. et al. (2005). Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of SOCS-3 in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut*, ..

- Walsh, M. J., Jonsson, J. R., Richardson, M. M., Lipka, G. M., Purdie, D. M., Clouston, A. D. et al. (2006). Non-response to antiviral therapy is associated with obesity and increased hepatic expression of suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3) in patients with chronic hepatitis C, viral genotype 1. *Gut*, *55*, 529-535.
- Westin, J., Lagging, M., Dhillon, A. P., Norkrans, G., Romero, A. I., Pawlotsky, J. M. et al. (2007). Impact of hepatic steatosis on viral kinetics and treatment outcome during antiviral treatment of chronic HCV infection. *J. Viral Hepat.*, *14*, 29-35.
- Whittington, P. F., Malladi, P., Melin-Aldana, H., Azzam, R., Mack, C. L., & Sahai, A. (2005). Expression of osteopontin correlates with portal biliary proliferation and fibrosis in biliary atresia. *Pediatr. Res.*, *57*, 837-844.
- Wilson, A. G., di Giovine, F. S., Blakemore, A. I., & Duff, G. W. (1992). Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum. Mol. Genet.*, *1*, 353.
- Wilson, A. G., Symons, J. A., McDowell, T. L., McDevitt, H. O., & Duff, G. W. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, *94*, 3195-3199.
- Wu, C. Y., Wu, M. S., Chiang, E. P., Wu, C. C., Chen, Y. J., Chen, C. J. et al. (2007). Elevated plasma osteopontin associated with gastric cancer development, invasion and survival. *Gut*, *56*, 782-789.
- Xanthou, G., Alissafi, T., Semitekolou, M., Simoes, D. C., Economidou, E., Gaga, M. et al. (2007). Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat. Med.*, *13*, 570-578.
- Yamamoto, N., Sakai, F., Kon, S., Morimoto, J., Kimura, C., Yamazaki, H. et al. (2003). Essential role of the cryptic epitope SLAYGLR within osteopontin in a murine model of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.*, *112*, 181-188.
- Yee, L. J. (2004). Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immun.*, *5*, 237-245.
- Yee, L. J., Tang, J., Herrera, J., Kaslow, R. A., & van Leeuwen, D. J. (2000a). Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection. *Genes Immun.*, *1*, 386-390.
- Yeung, E. & Chung, R. T. (2005). Microarrays and prediction of interferon response in chronic hepatitis C: not yet ready for prime time. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, *3*, 1192-1194.
- Young, H. A. (2007). Interferons- The First family of cytokines. In American Association for the Study of the Liver.
- Yu, M. L., Dai, C. Y., Chiu, C. C., Lee, L. P., Lin, Z. Y., Chen, S. C. et al. (2003). Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Antiviral Res.*, *59*, 35-40.
- Zein, N. N. (2005). Etanercept as an adjuvant to interferon and ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus infection: a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Hepatology*, *42*, 315-322.
- Zein, N. N., Germer, J. J., El-Zayadi, A. R., & Vidigal, P. G. (2004). Ethnic differences in polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta1 genes in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *70*, 434-437.
- Zeisel, M. B. & Baumert, T. F. (2006). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture: a breakthrough for basic and applied research. *Journal of Hepatology*, *44*, 436-439.
- Zylberberg, H., Rimaniol, A. C., Pol, S., Masson, A., De, G. D., Berthelot, P. et al. (1999). Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *Journal of Hepatology*, *30*, 185-191.