



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL**

**POLIMORFISMO DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM HEPATITE  
C SUA RELAÇÃO COM O TRATAMENTO ANTIVIRAL E O  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SOROLÓGICOS DE  
AUTOIMUNIDADE TIREOIDIANA**

**FRANCISCO MONTENEGRO DE MELO**

**RECIFE, 2008**

**Francisco Montenegro Melo**

**POLIMORFISMO DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM HEPATITE  
C SUA RELAÇÃO COM O TRATAMENTO ANTIVIRAL E O  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SOROLÓGICOS DE  
AUTOIMUNIDADE TIREOIDIANA**

Orientadora: Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Co-orientadora: Dra. Leila Maria Moreira Beltrão Pereira

Tese apresentada como requisito complementar para  
obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical, área  
de concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias  
do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical  
da Universidade Federal de Pernambuco.

**RECIFE, 2008**

**Melo, Francisco Montenegro de**  
**Polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes com**  
**hepatite C sua relação com o tratamento antiviral e o**  
**desenvolvimento de marcadores sorológicos de**  
**autoimunidade tireoidiana / Francisco Montenegro de**  
**Melo. – Recife : O Autor, 2008.**

**102 folhas ; il., fig., tab.,**

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de**  
**Pernambuco. CCS . Medicina Tropical, 2008.**

**Inclui bibliografia.**

**1.Polimorfismo do *MBL2*. 2. Hepatite C. 3.**  
**Autoimunidade tireodiana. 4. Hepatite - Tratamento .**  
**I. Título.**

**616.36-002**  
**616.3623**

**CDU (2.ed.)**  
**CDD (20.ed.)**

**UFPE**  
**CCS12/2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL**

**POLIMORFISMO DO GENE *MBL2* EM PACIENTES COM HEPATITE  
C SUA RELAÇÃO COM O TRATAMENTO ANTIVIRAL E O  
DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES SOROLÓGICOS DE  
AUTOIMUNIDADE TIREOIDIANA**

Francisco Montenegro de Melo

Orientadora: Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Co-orientadora: Dra. Leila Maria Moreira Beltrão Pereira

**Banca Examinadora:**

1. Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro  
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
2. Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho  
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)
3. Profa. Dra. Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti  
(Universidade de Pernambuco - UPE)
4. Profa. Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura  
(Universidade de Pernambuco - UPE)
5. Prof. Dr. Moacir de Novaes Lima Ferreira (UPE)  
(Universidade de Pernambuco - UPE)

Data: 07/03/2008



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

## RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO

**FRANCISCO MONTENEGRO DE MELO**

No dia 11 de março de 2008, às 08h00, no Auditório Prof. Jorge Lobato, no térreo do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Professores: Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro (UFPE – Membro Interno), Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti (UPE – Membro Externo), Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE – Membro Interno), Prof. Dr. Moacir de Novaes Lima Ferreira (UPE – Membro Externo) e a Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (UPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o doutorando FRANCISCO MONTENEGRO DE MELO sobre a sua Tese intitulada "POLIMORFISMO DO GEN MBL2 E O TATAMENTO DA HEPATITE C CRÔNICA COM INTERFEROM-ALPHA PEGADO ASSOCIADO À RIBAVIRINA". Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro

APROVADO

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

APROVADO

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

APROVADA

Prof. Dr. Moacir de Novaes Lima Ferreira

Aprovado

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Aprovado

Célia M. Machado B. de Castro  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Mendonça  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria do Socorro de Mendonça Cavalcanti

Coelho  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Moacir de Novaes Lima Ferreira  
Prof. Dr. Moacir de Novaes Lima Ferreira

Freire de Moura  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a todos os professores que tive durante a minha formação, em especial Dra. Diva Montenegro e Dr. Vital Lira.

Um agradecimento especial à Dra. Patrícia Moura porque sem a sua colaboração este trabalho seria impossível.

Às minhas orientadoras com as quais aprendi muito.

Ao jovem Luydson R. S. Vasconcelos por toda a ajuda durante a pesquisa.

À prof. Dra. Socorro Cavalcanti pelas idéias e na revisão dos manuscritos.

Aos colegas de mestrado e doutorado com os quais compartilhei momentos de crescimento.

Agradeço a colaboração e apoio dos colegas da cadeira de microbiologia e imunologia da Universidade de Pernambuco.

Aos pacientes sem os quais este trabalho seria impossível de ser realizado.

Ao LIKA e laboratório de Virologia da Universidade de Pernambuco pelo espaço cedido para realização do PCR em tempo real.

Aos diretores do banco de sangue IHENE que nos abriram as portas.

A Walter e Jupira, sempre presentes, colaborando com todos e em tudo.

Enfim, a todos que colaboraram com este trabalho.

## Sumário

|                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Lista de Abreviaturas.....</b>                                      | <b>VIII</b> |
| <b>Lista de Figuras.....</b>                                           | <b>XI</b>   |
| <b>Resumo.....</b>                                                     | <b>X</b>    |
| <b>Abstract.....</b>                                                   | <b>XI</b>   |
| <b>1. Introdução.....</b>                                              | <b>12</b>   |
| <b>1.1 Hipótese.....</b>                                               | <b>16</b>   |
| <b>1.2 Revisão da literatura - Vírus da Hepatite C.....</b>            | <b>16</b>   |
| <b>1.2.1 Epidemiologia.....</b>                                        | <b>16</b>   |
| <b>1.2.2 Aspectos virais.....</b>                                      | <b>18</b>   |
| <b>1.2.3 Manifestações clínicas.....</b>                               | <b>21</b>   |
| <b>1.2.4 Diagnóstico laboratorial.....</b>                             | <b>21</b>   |
| <b>1.2.5 MBL.....</b>                                                  | <b>22</b>   |
| <b>1.2.6 MBL e o Vírus da Hepatite C (HCV)..</b>                       | <b>26</b>   |
| <b>1.2.7 MBL e Autoimunidade.....</b>                                  | <b>27</b>   |
| <b>1.2.8 Autoimunidade Tireoidiana e Hepatite C.....</b>               | <b>28</b>   |
| <b>2. Definições dos Objetivos.....</b>                                | <b>29</b>   |
| <b>2.1 Objetivo geral.....</b>                                         | <b>29</b>   |
| <b>2.2 Objetivos específicos.....</b>                                  | <b>29</b>   |
| <b>3. Material e Métodos.....</b>                                      | <b>30</b>   |
| <b>3.1 População de Estudo.....</b>                                    | <b>30</b>   |
| <b>3.2 População alvo.....</b>                                         | <b>31</b>   |
| <b>3.2.1 Tipo de amostragem e definição do tamanho da amostra.....</b> | <b>31</b>   |
| <b>3.2.2 Definição dos casos.....</b>                                  | <b>31</b>   |
| <b>3.2.3 Definição de controles.....</b>                               | <b>32</b>   |
| <b>3.3 Desenho do estudo</b>                                           | <b>32</b>   |
| <b>3.4 Metodologia</b>                                                 | <b>32</b>   |
| <b>Referências Bibliográficas.....</b>                                 | <b>33</b>   |
| <b>4. Publicações.....</b>                                             | <b>40</b>   |
| <b>4.1 Artigo I.....</b>                                               | <b>41</b>   |
| <b>4.2 Artigo II.....</b>                                              | <b>55</b>   |
| <b>4.3 Comunicação Breve.....</b>                                      | <b>69</b>   |
| <b>APÊNDICE.....</b>                                                   | <b>78</b>   |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                     | <b>79</b>   |

### Lista de Abreviaturas

|              |   |                                                           |
|--------------|---|-----------------------------------------------------------|
| AAT          | - | Anticorpos Antitireoidianos                               |
| AIDS         | - | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida                    |
| ANTI-Tg      | - | Anticorpo Anti Tireoglobulina                             |
| ANTI-TPO     | - | Anticorpo Antiperoxidase Tireoidiana                      |
| CRD          | - | Domínio de reconhecimento a carboidratos                  |
| DC-SING      | - | Lectina de superfície de células dendríticas              |
| DNA          | - | Ácido desoxirribonucléico                                 |
| E2           | - | Proteína do envelope viral                                |
| HCV          | - | Vírus da Hepatite C                                       |
| HIV          | - | Vírus da Imunodeficiência Humana                          |
| IFN $\alpha$ | - | Interferon alfa                                           |
| IFN $\gamma$ | - | Interferon gama                                           |
| IFN- PEG     | - | Interferon peguilado                                      |
| IL-2         | - | Interleucina 2                                            |
| ISGs         | - | Genes induzidos por interferon                            |
| L-SING       | - | Lectina de superfície do epitélio hepático                |
| MASP         | - | Serinoprotease associada à MBL                            |
| MBL          | - | Lectina ligadora de Manose                                |
| ORF          | - | Seqüência de leitura aberta                               |
| PCR          | - | Reação em cadeia da polimerase                            |
| PKR          | - | Proteína quinase R                                        |
| RIBA         | - | Ribavirina                                                |
| RNA          | - | Ácido ribonucléico                                        |
| SNP          | - | Polimorfismo de um único nucleotídeo                      |
| STAT         | - | Signal Transducers as well as Activators of Transcription |

**Listas de Figuras**

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 01 – Estrutura da MBL.....                                                            | 23 |
| Figura 02 – Polimorfismo da região promotora e estrutural (éxon 1) do gene <i>MBL2</i> ..... | 24 |

## Resumo

O polimorfismo no éxon 1 do gene da lectina ligadora de manose (*MBL2*) altera os níveis séricos e a funcionalidade desta lectina (MBL), que é um componente da imunidade natural, e poderia estar envolvida na susceptibilidade e no tipo de resposta ao tratamento da hepatite C crônica. O interferon alfa peguilado (IFN $\alpha$ -peg) associado à ribavirina (RIBA) melhorou a resposta terapêutica de pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), embora de modo não satisfatório. Estudos de fatores relacionando a resposta terapêutica não sustentável podem indicar novas estratégias de tratamento. A infecção pelo HCV e seu tratamento com IFN $\alpha$ -peg/RIBA são relacionados aos marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana (AAT). A deficiência de MBL está associada ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Neste estudo verificamos a associação entre o polimorfismo do *MBL2* com o HCV e a resposta ao seu tratamento. Verificamos também, a associação entre o HCV, seu tratamento combinado e genótipos virais com AAT. Participaram deste estudo 162 pacientes infectados pelo HCV, sendo 111 tratados com IFN $\alpha$ -peg/RIBA e 51 não tratados atendidos no Serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco – Brasil e, 232 voluntários sadios. Entre os pacientes, 65 indivíduos tinham a carga viral disponível após o término do tratamento, e foram classificados em respondedores virológicos (n=37) e não respondedores virológicos (n=28). O polimorfismo do *MBL2* foi determinado por PCR em tempo real e classificou o alelo selvagem (A) e os polimórficos (O). Pacientes e controles foram testados para anticorpos anti-peroxidase tireoidiana e anti-tireoglobulina. A frequência do polimorfismo para *MBL2* foi mais alta nos pacientes infectados pelo HCV do que nos indivíduos sadios (p=0,01; OR=4,44; IC 0,56-10,06). Os genótipos minoritários A0/00 não foram mais frequentes no grupo que respondeu ao tratamento (p=0,1146; OR 2,54; IC 0,83 -7,87). A ocorrência de AAT foi de 11,1% (n=18) nos pacientes (n=162), de 11,7% (n=13) nos pacientes após o tratamento (n=111) e de 9,8% (n=5) nos pacientes não tratados (51). Estes dados mostraram correlação positiva quando pacientes com AAT tratados (p=0,01; OR 5,35; IC 1,41-9,89) e sem tratamento específico (p=0,0474; OR 4,38; IC 0,81-29,08) foram comparados com voluntários. Comparando os grupos de pacientes, não encontramos diferenças nas frequências de AAT (p=0,928; OR 1,22; IC 0,38-4,63). A presença de AAT nos pacientes com o HCV não foi maior no sexo feminino (p=0,0801; OR 2,91; IC 0,91-10,9). A chance do genótipo 1 do HCV estar relacionado à AAT foi 3,42 vezes maior do que a do genótipo 3 (p=0,14; OR 3,42; IC 0,71-3,24). Os pacientes infectados pelo HCV e com AAT positivos (n=18) apresentaram uma elevada frequência do polimorfismo do *MBL2* (22%) comparando com aqueles sem AAT (10%) (n=144), entretanto esta diferença não foi significativa (p=0,1196; OR 2,65; IC 0,56 – 10,06). O polimorfismo estrutural do *MBL2* foi associado à infecção pelo HCV, indicando que a MBL poderia ter um papel na imunidade inata contra este vírus. A deficiência de MBL parece não influenciar a resposta ao tratamento do HCV, embora uma população maior de pacientes deva ser estudada. O sexo feminino não foi confirmado como importante fator de risco de desenvolvimento de AAT nos pacientes de HCV. O HCV parece ser um fator importante no desenvolvimento de autoimunidade tireoidiana, independente da terapia combinada. O polimorfismo do gene *MBL2* parece não estar associado com o desenvolvimento de AAT nos pacientes de HCV, entretanto devido ao reduzido número de pacientes infectados pelo HCV com AAT (n=18) esta observação não pode ser considerada definitiva.

Palavras chaves: polimorfismo do *MBL2*, hepatite C, autoimunidade tireoidiana, hepatite - tratamento.

## Abstract

The polymorphism in the exon 1 of mannose binding lectin gene (*MBL2*) diminish the levels and activity of this lectin (MBL) and could be important for the virus acquisition and in the outcome of HCV therapeutic response. The MBL is a lectin of the innate immunity. The use of pegylated interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ -peg) associated to ribavirin (RIBA) significantly improved the therapeutic response of chronic hepatitis C virus infection, but still failure occurs. Studies investigating the causative factors of the therapy failure may highlight new strategies for treatment. The HCV infection and its therapy with IFN $\alpha$ -peg/RIBA are related with serologic markers of thyroid autoimmunity (AAT). The MBL deficiency is associated to autoimmunity. We aim to study the association between *MBL2* polymorphism with HCV infection and its therapy with IFN $\alpha$ -peg/RIBA. We also study the association between *MBL2* polymorphism with AAT in HCV patients. In this study were included 162 HCV patients treated with IFN $\alpha$ -peg/RIBA (n=111) or not (n=51), attended in the University Hospital Oswaldo Cruz of the University of Pernambuco- Brazil and 232 health individuals. The treated patients who tested for viral genome after the treatment (65) were further divided into two groups as following, virological responders, VR (n=37) and non-virological responders, NVR (n=28) according the result in the HCV-RNA PCR, where the VR tested negative and the NVR still tested positive after treatment scheme. The *MBL2* polymorphism was accessed by real time PCR determining the wild type allele (A) and the minority or polymorphic alleles (O). The patients and controls were tested to thyroid anti-peroxidase antibodies and anti-thyroglobulin. The frequency of *MBL2* polymorphism was higher in the HCV patients than in volunteers (p=0,01; OR=4,44; IC 0,56-10,06). The minority genotypes A0 and 00 were not more frequent in VR group of patients comparing to NVR group (p=0,1146; OR 2,54; IC 0,83 -7,87). The HCV patients (n=162) showed 11,1% of positivity to ATT while in health persons (n=124) it was 2,4% (p=0,021) This occurrence was of 11,7% (n= 13) at the patients after the therapy and of 9,8% (n=5) in the untreated group . Data showed a significant correlation when treated (p=0,01; OR 5,35; IC 1,41-9,89) and untreated patients (p=0,474; OR 4,38; IC 0,81-29,08) were compared with health persons. No significant differences were found in the positivity to AAT (p= 0,928; OR 1,22; IC 0,38-4,63), when the groups of patients were compared. Female was not confirmed as important risk factor to the development of AAT in patients with HCV (p=0,0801; OR 2,91; IC 0,91-10,9). The chance that genotype 1 of the HCV can be related to development of AAT was 3,42 times greater than the genotype 3. Patients with HCV and AAT positive (n=18) showed high frequency of polymorphism to *MBL2* (22%), compared with AAT negative ones (10%) (n=144) although there was no significance (p=0,1196; OR=2,65; IC 0,56 – 10,06).The *MBL2* polymorphism was associated with HCV infection. Thus, the MBL deficiency may be important for the virus acquisition, but did not seem to influence the response to the combined treatment in HCV. Since we studied a small group of patients further studies are recommended in order to establish the precise role of MBL in the HCV treatment outcome. Female was not confirmed as important risk factor to the development of AAT in patients with HCV. The HCV seems to be an important factor to the development of thyroid autoimmunity, independently of the combined therapy. The *MBL2* gene structural polymorphism seems to be not associated with the development of AAT in patients with HCV. However as the number of patients is small at the HCV with AAT group (n=18) this observation could not be considered a definitive one.

Keywords: *MBL2* polymorphisms, hepatitis C, thyroid autoimmunity, hepatitis - treatment.

## 1. Introdução

A prevalência de hepatite C está aumentando. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que existam mais de 170 milhões de indivíduos infectados pelo vírus de hepatite C (HCV) em todo mundo. Destes, 4 milhões encontram-se nos Estados Unidos da América (LAUER & WALKER, 2001). No Brasil estima-se que a infecção pelo HCV seja um dos principais problemas de saúde pública. Segundo, Focaccia *et al.*(1998), em um estudo na cidade de São Paulo, a soro-prevalência do HCV é de 1,42% em doadores de sangue.

O HCV é transmitido, através de sangue infectado, promiscuidade sexual, uso de drogas intravenosas e uso de cocaína intra-nasal. A maioria dos pacientes com hepatite C tem doença crônica, que pode progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Infecção pelo HCV é a principal causa de doença hepática crônica e de indicação de transplante hepático. Em 1993 foi iniciada a triagem sorológica de anticorpos anti-HCV em doadores de sangue, o que levou à diminuição do risco de se adquirir a infecção por esta via (CONRY-CANTILENA *et al.*, 1996).

O HCV é um vírus RNA de fita simples, esférico, envelopado, pertencente à família *Flaviviridae* e está agrupado no gênero *Hepacivirus*. Indivíduos infectados podem produzir até 3 milhões de novas partículas virais diariamente. A grande capacidade de multiplicação resulta no aumento de diversidade viral, originando vírus denominados quase-espécies, que possuem diferenças de 1% a 2% nas bases nucleotídicas. A produção de quase-espécies associada com outros fatores virológicos também podem ser responsáveis pela variação do curso clínico e da resposta ao tratamento (FARCI *et al.*, 2002).

Aproximadamente 70% a 80% dos pacientes infectados com o vírus da hepatite C cronicam e podem progredir para cirrose e carcinoma hepatocelular. O genótipo 1, mesmo sendo tratado com drogas antivirais por um ano, não responde bem a tal tratamento específico quando comparado aos pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 que são tratados por apenas 6 meses (LARSON & CARITHERS, 2001).

Os mecanismos responsáveis pela manutenção da infecção pelo HCV ou pela falta de resposta ao tratamento com interferon alpha (IFN- $\alpha$ ) isolado ou associado à ribaverina (RIBA) não são bem entendidos, embora seja provável que o sistema imunológico do paciente tenha papel importante (DUMESTRE-PERARD, *et al.*, 2002).

O sistema complemento é um mecanismo de defesa natural que protege contra infecções, inclusive, as causadas por vírus. Para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, os vírus são capazes de expressar proteínas homólogas do hospedeiro, neutralizar complemento através de suas proteínas reguladoras, além de outros mecanismos (LUBINSKI, *et al.*, 1998).

A lectina ligadora de manose (MBL) é uma proteína de fase aguda secretada pelos hepatócitos que possui em sua forma oligomérica, domínios que reconhecem e ligam-se à molécula de N-acetilglicosamina ou manose presentes na superfície de patógenos que podem então ser fagocitados por macrófagos ou destruídos através do sistema complemento (HARTSHORN *et al.*, 1993). A ligação da MBL ao patógeno ativa simultaneamente serinoproteases específicas responsáveis pela ativação do sistema complemento (TUNER, 1996). A MBL pode também se ligar a carboidratos presentes na superfície de células apoptóticas, restos celulares e imunocomplexos, resultando em opsonofagocitose e ativação do complemento (THIEL *et al.*, 1997).

A concentração sérica da MBL pode ser atribuída a mutações no gene estrutural e na região promotora do gene *MBL2*. As mutações na região promotora resultam na diminuição de expressão da molécula da MBL, enquanto que, em genes estruturais as mutações causam incapacidade de manter a conformação oligomérica necessária para fixar manose e ativar o complemento levando também a baixos níveis séricos (GARRED *et al.*, 2003). As mutações estruturais descritas para MBL estão nos códons 52, 54 e 57 localizados no éxon 1 da região codificadora do gene que traduz um domínio colágeno e uma região com domínio rico em cisteína (SUMMERFIELD *et al.*, 1997). Estas mutações são associadas ao curso desfavorável não só de infecção bacteriana, mas também, às causadas por vírus (THOMAS *et al.*, 1996).

Portanto, tanto as mutações estruturais do *MBL2* quanto o polimorfismo de suas regiões promotoras estão associados a baixos níveis séricos de MBL. Mutações na região promotora de gene de MBL podem resultar em modificação estrutural da molécula da MBL, tornando-a incapaz de manter a conformação polimérica necessária para fixar manose e ativar complemento. Haplotipos associados a baixos níveis séricos de MBL podem ser encontrados em indivíduos com níveis séricos normais ou até mesmo elevados de MBL, embora defectiva, digo, com capacidade de ligar manose diminuída (LIPSCOMBE *et al.*, 1992).

O envolvimento de complemento e da MBL no curso da infecção pelo HCV tem sido pouco estudado, e alguns estudos tiveram resultados conflitantes. Como pouco se sabe sobre a

imunidade inata na hepatite C e a MBL é uma das principais moléculas de reconhecimento de patógenos deste tipo de imunidade, torna-se atraente estudar esta molécula no curso da infecção pelo HCV (MATSUSHITA *et al.*, 1998; KILPATRICK *et al.*, 2003).

Segundo Matsushita *et al.* (1998), pacientes japoneses infectados pelo HCV, com haplótipo da MBL mutante têm uma pior resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$  isolado ou associado à RIBA, enquanto que, aqueles que pertenciam ao grupo com haplótipo selvagem obtiveram uma melhor resposta ao tratamento.

Dumestre-Perard *et al.* (2002), demonstraram redução na atividade de C4 em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C que recorrem da infecção após tratamento com IFN- $\alpha$  associada ou não à RIBA, comparando com os pacientes que responderam de maneira sustentável. Eles, também, demonstraram que a diminuição da atividade de C4 não era associada ao consumo de C1, sugerindo que a ativação do complemento seria pela via da lectina e não pela via clássica. Estes autores também dosaram MBL em seus pacientes (n=66), mas não reportaram nenhuma relação entre os níveis séricos desta lectina com a resposta ao tratamento do HCV.

Matsushita *et al.*, (1998), descreveram, em população japonesa que pacientes com hepatite C portadores de haplotipos que conferem baixa concentração sérica de MBL (60,7%), tinham menor chance de responder ao tratamento com IFN- $\alpha$  do que os pacientes dos haplotipos que sabidamente conferem níveis séricos elevados de MBL (38,5%). Tal diferença foi significativa ( $P < 0,008$ ). Estes autores não correlacionaram as dosagens séricas de MBL com seus respectivos genótipos, embora relatem que a concentração sérica média de MBL nos pacientes que responderam (1,28 g/ml) e naqueles que não responderam ao tratamento (1,38 g/ml), eram comparáveis.

Kilpatrick *et al.* (2003), não encontraram diferença entre os níveis séricos de MBL ( $P = 0,17$ ) nos pacientes com hepatite C que responderam ao tratamento específico e aqueles que não responderam ( $n = 77$ ). Neste estudo, ficou evidente que os níveis séricos de MBL em paciente com HCV ( $n = 180$ ) são significativamente mais elevados do que os encontrados em doadores de sangue ( $n = 566$ ,  $P < 0,0001$ ).

A redução da atividade de C4, em pacientes com níveis normais de C1, indicando uma menor ativação de C4, em pacientes com níveis séricos normais de MBL, sugere que alguma modificação estrutural desta molécula, diminuindo a sua capacidade de ligação à manose,

poderia estar envolvida em não resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$  dos pacientes infectados pelo HCV, como indica o estudo de Dumestre-Perard *et al.*, (2002).

Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que a MBL está envolvida no processo de depuração de restos celulares e células apoptóticas. Redistribuição dos carboidratos na membrana das células apoptóticas permite a ligação da MBL e a posterior opsonofagocitose (HERRERA-ESPARZA *et al.*, 2007).

Desenvolvimento de autoimunidade ou de seus marcadores sorológicos são freqüentes nos pacientes infectados cronicamente pelo HCV. Entre estas, as doenças autoimunes da tireóide ou de seus marcadores são as mais prevalentes. O tratamento com IFN- $\alpha$ /RIBA é fator de risco para o aumento destas prevalências (LIBLAU *et al.*, 1995).

Os anticorpos anti-tireoideanos (AAT), anti-tireoglobulina (Anti-Tg) e Anti-peroxidase tireoidiana (Anti-TPO), particularmente o último, são muito prevalentes nos indivíduos com hepatite C estando presentes em 5.2% a 12,5% destes pacientes (PATERON *et al.*, 1992).

O IFN- $\alpha$  associado ou não à RIBA possui efeitos colaterais incluindo desenvolvimento de AAT e disfunções tireoidianas, sendo as últimas mais freqüentes nos pacientes com AAT positivos antes do tratamento. A maioria dos pacientes, no entanto, reverte para o eutireoidismo após o tratamento, embora existam relatos de que alguns pacientes permanecem doentes (KEE *et al.*, 2006).

Foi demonstrado que a MBL está envolvida no processo de depuração de restos celulares. Haplotipos responsáveis por níveis séricos diminuídos da MBL predispõem ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Desenvolvimento de autoimunidade ou de seus marcadores sorológicos em paciente com hepatite C é relatado com freqüência, principalmente os relacionados à tireóide (HERRERA-ESPARZA *et al.*, 2007).

As freqüências dos alelos mutantes do *MBL2* variam de acordo com as características de cada população, por exemplo, em caucasianos britânicos a mutação no códon 57 ocorre em 26% de sua população. Em populações africanas a freqüência desta mutação é de 58% (LIPSCOMBE *et al.*, 1992). Sendo o Brasil um país constituído de uma população bastante heterogênea etnicamente, o conhecimento das freqüências genotípicas deste gene representa importante informação.

São necessários estudos no Brasil que envolvam a resposta imunológica e sua relação com o genótipo da MBL no curso de doenças. O acesso à freqüência de polimorfismo em pacientes brasileiros com hepatite C pode ajudar na elucidação de questões ainda não

esclarecidas sobre a persistência da infecção, de fatores genéticos na causa da predisposição a infecção pelo HCV e ao tipo de resposta dos pacientes com hepatite C crônica ao tratamento combinado com IFN-*peg*/RIBA.

A genotipagem rápida e simples oferecida pelo PCR em tempo real (ARRAES *et al.*, 2006) possibilita uma geração de dados em larga escala, facilitando o estudo em populações. Grandes amostras são necessárias para simular características próximas das verdadeiras. Sendo assim um dos objetivos deste trabalho foi a utilização da PCR em tempo real para genotipagem do gene *MBL2* em paciente infectados pelo HCV e a investigação da ocorrência de diferenças entre as frequências do polimorfismo do *MBL2* entre indivíduos sadios e com hepatite C, relacionando com o tipo de resposta ao tratamento combinado.

Este trabalho também estudou os marcadores sorológicos de doenças autoimunes da tireóide em paciente com o HCV, relacionando-os com a terapia combinada (*Peg-IFN $\alpha$ /RIBA*) do HCV, genótipo viral, e o polimorfismo do gene *MBL2*.

## 1.1 Hipótese

O polimorfismo do *MBL2* em pacientes infectados pelo o HCV é associado à ausência de resposta virológica sustentável ao tratamento com *peg-IFN- $\alpha$ /RIBA* e ao desenvolvimento de AAT nos pacientes infectados pelo HCV?

## 1.2 Revisão de Literatura - Vírus da Hepatite C (HCV)

### 1.2.1. Epidemiologia

A hepatite C representa um problema de ordem mundial. Acredita-se que mais de 170 milhões de pessoas estão infectadas pelo HCV, correspondendo a cerca de 3% da população mundial e a sua prevalência está aumentando. Na Europa a prevalência de hepatite C em doadores de sangue é de 0,01% a 0,02%; de 1% a 1,5% na Europa Ocidental e de 6,5% em regiões da África Equatorial. Prevalência de até 20% foi relatada no Egito e na Arábia Saudita, atribuída ao uso de terapia parenteral para esquistossomose. Nos EUA 1,8% da população são presumivelmente soropositivos para HCV e, aproximadamente 74% destes indivíduos são positivos para HCV RNA. Estima-se que neste país existam quatro milhões de

infectados por HCV, sendo que dois milhões desenvolveram hepatite crônica (LAUER & WALKER, 2001). O genótipo 1 do HCV é encontrado em 75% desta população infectada (GIANNINI & BRÉCHOT, 2003; MONDELLI, 2003). No Brasil, na cidade de São Paulo, foi relatada uma soroprevalência de 1,42% em uma população de 1.059 doadores de sangue (FOCACCIA *et al.*, 1998).

Nos países ocidentais o HCV é a principal causa de hepatite crônica, responsável por algo próximo dos 20% dos casos de hepatite viral aguda e representa em torno de 40% dos atendimentos das clínicas especializadas em fígado. Aproximadamente 10% dos infectados desenvolvem cirrose. O risco de desenvolver cirrose é relacionado a diversos fatores, tais como: sexo, o uso de álcool, infecção concomitante com HIV ou HBV, e carcinoma hepatocelular, o qual ocorre em 1% a 4% dos pacientes com cirrose (LAUER & WALKER, 2001; BONKOVSKY & MEHTA, 2001).

A principal forma de transmissão do HCV é através de contato com sangue infectado, uso de drogas injetáveis e inalatórias além de acupuntura, lâminas de barbear e tatuagem. A atividade sexual é responsável por menos de 20% dos casos de transmissão. Lesão percutânea com agulha em ambiente hospitalar tem 3% de risco de transmissão. Transmissão nosocomial pode ocorrer por colonoscopia, diálise e órgãos transplantados. Outras formas de transmissão, tal como materno-fetal, são incomuns e representam menos de 5% dos casos. Co-infecção com HIV aumenta tanto o risco de transmissão sexual como da vertical. A maioria dos pacientes infectados pelo HCV tem como fonte de infecção a via parenteral de forma aparente ou inaparente, direta ou indireta. Existe a hipótese de que a transmissão do HCV em pacientes sem fator de risco detectável seria por via parenteral inaparente localizada no ambiente familiar e relacionada com lesões cutâneas, por contacto íntimo prolongado ou através da contaminação de instrumental e utensílios contaminados com sangue infectado. Porém, não existem evidências de transmissão familiar ou sexual, quando os casos index e contactos foram testados. De todos esses procedimentos o uso de drogas injetáveis oferece o maior risco de infecção pelo HCV. Um grande número de pessoas foi infectado por transfusão de sangue, pois a triagem sorológica só começou a ser feita na década de 90 (TAIKANIZAVIA *et al.*, 1990; CONRY-CANTILENA *et al.*, 1996; CONRY-CANTILENA, 1997; ZEIN, 2003).

Nos países desenvolvidos, a maioria dos novos casos de infecção pelo HCV, em torno de 60%, ocorre nos usuários de drogas injetáveis. O risco de se adquirir HCV por transfusão de sangue diminuiu para menos de 1 caso para 130.000 unidades de sangue transfundido. Este risco pode ser muito menor se técnicas mais sensíveis, como a PCR for utilizada para triagem.

Este teste diminui a janela imunológica já que encurta o intervalo necessário para identificar uma infecção recente pelo HVC para aproximadamente três semanas. (BONKOVSKY & METHA, 2001).

### 1.2.2. Aspectos virais

O HCV é membro da família *Flaviviridae* e gênero *Hepacivirus* possui RNA fita simples, é envelopado e seu genoma possui cerca de 9500 nucleotídeos contendo uma sequência de leitura aberta (ORF), codificando uma poliproteína com aproximadamente 3.000 resíduos de aminoácidos que passam por um processamento proteolítico pós-traducional efetuado pelas proteases virais e proteases codificadas pelo genoma celular (SHARARA *et al.*, 1996; LYRA *et al.*, 2004).

As células alvos do HCV são os hepatócitos e os linfócitos B. A infecção é associada ao desenvolvimento de uma forte resposta antiviral pelos linfócitos T citotóxicos e linfócitos auxiliares, embora a viremia persista na maioria dos infectados. Anticorpos neutralizantes produzidos são isolados específicos que mutam modificando seus determinantes antigênicos de maneira rápida e fácil (SHIMIZU *et al.* 1994).

Mecanismos de entrada, ligação e replicação do HCV têm sido dificilmente estudados, devido às dificuldades em se ter um eficiente sistema *in vitro* de propagação viral. O desenvolvimento de partículas infecciosas do HCV por clonagem e expressão de proteínas do envelope viral E1 e E2, permitiu uma maior caracterização da mediação na entrada do vírus na célula, sendo a proteína E1 a que possui um domínio de ligação para os anticorpos, como também alta afinidade para CD81 nos receptores das células T e B (HSU *et al.*, 2003; FLINT *et al.*, 1999). E1 e E2 são proteínas transmembrana tipo I, associadas por um complexo heterodímero e são glicosiladas no retículo endoplasmático (SELBY *et al.*, 1994; KECK *et al.*, 2004; OP DE BEECK *et al.*, 2004).

A CD81 é uma proteína transmembrana tipo quatro, importante na interação entre células e o HCV. Esta proteína possui alta afinidade pela E2, sendo assim, a CD81 pode estar ligada a uma série de eventos celulares envolvendo o HCV, além de está ligada a vários mecanismos celulares, como ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos B e T (FLINT *et al.*, 1999).

O HCV possui uma região hipervariável (HVR1) em seu genoma, localizada na sequência que codifica a E2. Muitos estudos têm relatado esta região como sendo o sítio de

ligação para o anticorpo sem papel neutralizador. A variabilidade desta região em pacientes que responderam com sucesso ao tratamento com IFN $\alpha$  foi menor em relação aos pacientes que não responderam a esta terapia, independente do genótipo do vírus, esta variabilidade da E2 pode ser relevante no curso clínico da infecção (OWSIANKA *et al.*, 2001; FARCI *et al.*, 2002; MONDELLI, 2003).

As proteínas E2 e a não-estrutural 5a (NS5a) possuem uma ação bloqueadora na atividade da proteína quinase (PKR) a qual tem um papel importante na ação antiviral do IFN $\alpha$ . Esta ação das proteínas virais pode ser uma das explicações pela qual o HCV se livra da propriedade antiviral do interferon (SONG *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.*, 1999).

A produção de citocinas por células T tem uma importante função na patogênese da hepatite crônica e também na replicação viral. A resposta imunológica mediada por células T na hepatite C tem sido associada a um aumento na circulação de Th1 a qual tem ação sobre a produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon  $\gamma$  responsáveis pelo recrutamento de células Natural Killer (NK) e T citotóxicas importantes na eliminação do vírus (BOZKAYA *et al.*, 2000).

O HCV é classificado em pelo menos seis principais genótipos e em mais de oitenta subtipos com base na sequência de aminoácidos do seu genoma, sendo que os genótipos que têm distribuição mundial vão do 1 ao 6. Portadores do genótipo tipo 1, especificamente o subtipo 1b, têm uma pior resposta à terapia, além de estarem predispostos a um maior risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (ZEIN, 2000; MONDELLI, 2003). A distribuição dos genótipos varia de acordo com cada país ou região, por exemplo, em um estudo feito em Salvador com 232 pacientes infectados pelo HCV, as prevalências dos genótipos 1b e 1a foram de 31% e 33,5 % respectivamente. Em Pernambuco, de 122 pessoas atendidas na unidade de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – Universidade de Pernambuco, 60,7% possuía o genótipo 1 (CAMPIOTTO *et al.*, 2005). Na Ásia, África e Oriente Médio existe uma maior ocorrência dos genótipos 4, 5 e 6 ( PARANÁ *et al.*, 2000).

Alguns fatores virológicos como genótipo, quase-espécies e viremia podem garantir uma ação mais agressiva ao hospedeiro. Entretanto, a resposta imunológica do hospedeiro tem uma importante função na patogênese, principalmente no controle da replicação viral e dano hepatocelular (TRAPERO *et al.*, 2005). Várias citocinas estão envolvidas no desenvolvimento da imunidade celular contra o HCV. O IFN- $\alpha$  é uma das citocinas que participa na resposta

imune inata antiviral do hospedeiro com atividades imunomoduladoras e antiproliferativas (FELD & HOOFNAGLE, 2005).

O IFN- $\alpha$  tem uma potente atividade antiviral, mas não atua diretamente no complexo de replicação do vírus. O IFN- $\alpha$  liga-se ao receptor na superfície celular e promove a ativação de quinases celulares às quais induzem a fosforilação de proteínas chamadas STAT (Signal Transducers as well as Activators of Transcription) presentes no citoplasma, que juntas formam um complexo com o fator 9 de regulação do IFN (IFN-9), o qual se liga a elementos de resposta estimuladora do interferon no DNA, conduzindo à expressão de múltiplos genes estimulados por interferon. (FELD & HOOFNAGLE, 2005).

Estudos empregando técnicas moleculares de microarranjo de DNA na infecção experimental de chimpanzés confirmaram a importância da via do IFN e do sistema imune inato durante a infecção e no decorrer do tratamento, onde foi observado que mais de 300 genes são induzidos no fígado nesse período, aumentando a indução de genes induzidos por interferon (ISGs) com consequente relação das citocinas envolvidas na via do IFN (BIGGER *et al.*, 2001; BIGGER *et al.*, 2004).

A primeira droga utilizada no tratamento da hepatite C foi o IFN- $\alpha$ , que mais tarde associado à ribavirina (RIBA) mostrou um melhor índice de resposta ao tratamento (DAVIS *et al.*, 1989). A ribavirina é usada desde 1970 contra vários vírus DNA/RNA em humanos. Foi usada inicialmente no tratamento de infecções virais respiratórias e sua ação promove alteração na RNA polimerase do vírus causando alta taxa de erro na replicação viral, com consequente diminuição na carga viral do HCV RNA no soro (LAU *et al.*, 2002). O IFN- $\alpha$  foi acoplado a molécula de polietilenoglicol, resultando em um tempo de meia vida maior no organismo e consequentemente a uma melhor resposta terapêutica (MCHUTCHISON & FRED, 2003).

Segundo Leikina *et al.*, (2005) componentes do sistema inato como defensinas e a lectina ligadora de manose – MBL têm propriedades que bloqueiam a fusão do vírus influenza, criando uma espécie de barreira impedindo o envelope viral efetuar a fusão e entrada do vírus no hospedeiro. Desta forma, o estudo da imunidade inata na infecção por HCV é fundamental para o entendimento da primeira barreira encontrada pelo vírus durante sua propagação e de como esta barreira poderia afetar o desenvolvimento da infecção e na progressão da doença.

### 1.2.3 Manifestações clínicas

Manifestações clínicas da fase aguda da infecção pelo HCV só ocorrem em cerca de 20% a 30% dos infectados e, geralmente, 7 a 8 semanas após o contacto com o vírus. O desenvolvimento de icterícia e hepatite fulminante é raro. Infecção subclínica seguida de viremia persistente ocorre em cerca de 70% a 80% dos pacientes infectados e o desenvolvimento de doença avançada do fígado sintomática, que ocorre em 20% a 30% dos infectados, pode levar até 30 anos. O tempo médio para o aparecimento de hepatite clinicamente significativa é de 10 anos, 21.2 anos para cirrose e de 29 anos para carcinoma hepatocelular (SHARARA *et al.*,1996). Progressão mais rápida da infecção pelo HCV é observada nos indivíduos co-infectados por HIV ou HBV, nos alcoólatras, homens e naqueles infectados com idade mais avançada. Alcoolismo eleva o risco de desenvolvimento de cirrose em 15 vezes e a co-infecção com HIV eleva este risco em 5 vezes (LARSON & CARITHERS, 2001).

A apresentação clínica da hepatite C crônica depende do estado imunológico do paciente, origem e duração da infecção. Mais comumente, o diagnóstico é realizado acidentalmente pelo encontro de níveis elevados das aminotransferases em exames rotineiros ou quando doadores se submetem a triagem sorológica para doação de sangue. A maioria dos pacientes é assintomática ou apresenta sintomas não específicos, tais como: fraqueza, mal estar e fadiga. Caracteristicamente, os níveis das aminotransferases flutuam e podem ser normais, ocasionalmente. Alguns pacientes apresentam-se com doença hepática avançada complicada com sangramento de varizes, ascite, coagulopatia, encefalopatia ou com síndromes extrahepática tais como: crioglobulinemia e glomerulonefrite (LARSON & CARITHERS, 2001).

### 1.2.4 Diagnóstico laboratorial

Triagem sorológica para o HCV é realizada por testes imunoenzimáticos (EIA), e três versões sucessivas destes testes já foram desenvolvidas. A última que possui antígenos estruturais e do core, elevou a sensibilidade do teste e diminuiu a janela imunológica dos testes iniciais de 6 a 9 meses para 4 a 10 semanas. Estes testes podem apresentar resultados falso-negativos, principalmente, nos imunocomprometidos e nos pacientes que desenvolvem crioglobulinemia mista associada ao HCV. Falsos positivos inexplicáveis também podem

ocorrer. Um “imunoblot” que utiliza quatro antígenos recombinantes (RIBA-2) é usado para confirmação dos EIA positivos. Este teste é considerado positivo quando ocorre a presença de anticorpos contra dois ou mais antígenos e inconclusivo, quando reage para um só antígeno (ALTER *et al.*, 2003).

Reação em cadeia pela polimerase (PCR) pode detectar HCV-RNA de maneira qualitativa. Este teste demonstra infecção após uma a três semanas após o contágio, é utilizado para confirmar viremia e para examinar possíveis EIA falso-negativos. Os ensaios quantitativos que determinam a carga viral se prestam para controle da terapia antiviral e quando não detectam o RNA viral na 12ª semana de tratamento predizem uma resposta terapêutica sustentável. A genotipagem do HCV é essencial para tratamento dos pacientes infectados, auxilia a determinar o tempo de tratamento antiviral e definir o prognóstico específico. Clinicamente é relevante distinguir o sorotipo 1, que deve ser tratado por um ano, diferente dos outros sorotipos que devem ser por seis meses (BONKOVSKY & METHA, 2001).

### **1.2.5 Lectina ligadora de manose (MBL)**

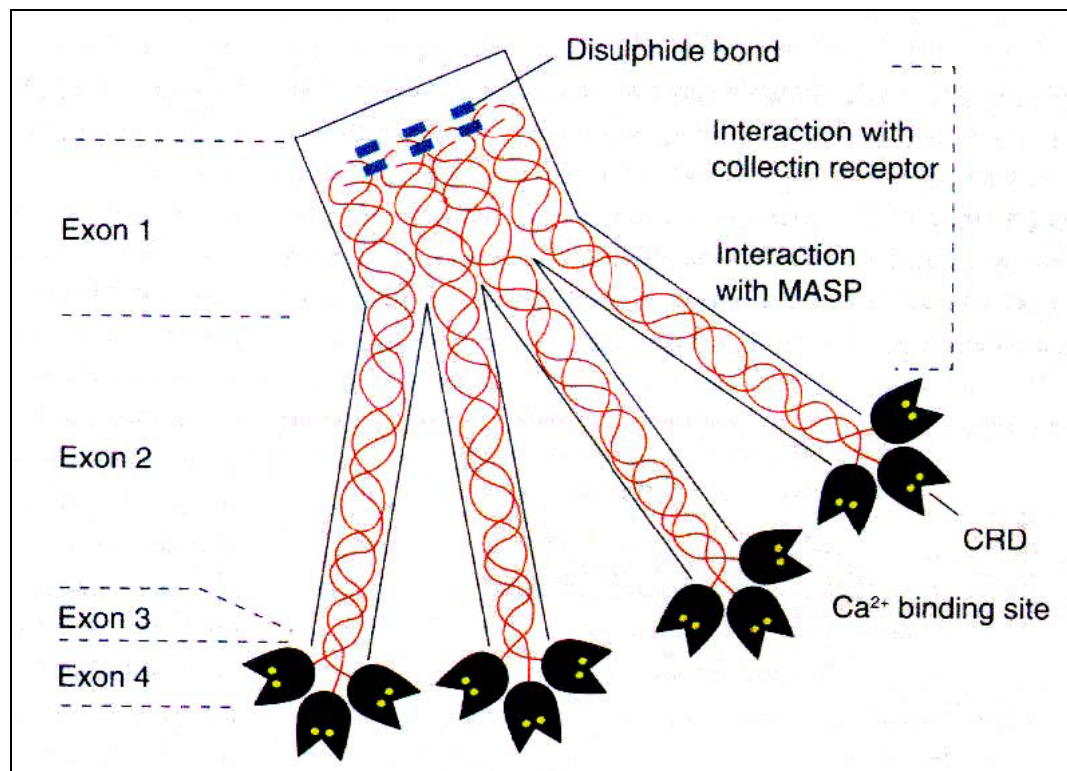
A MBL é uma importante proteína da imunidade inata responsável pela ativação do sistema complemento e opsonização de patógenos em muitas doenças infecciosas. A MBL depende de cálcio para sua ativação e pertence à família das colectinas por possuir regiões com domínios de colágeno (TUNER & HAMVAS, 2000).

A MBL circulante no soro tem grande capacidade de se ligar a superfícies de bactérias, leveduras, vírus e parasitas que são ricos em açúcares como a manose (KAWASAKI *et al.*, 1989; HAURUM, *et al.*, 1993; GREEN *et al.*, 1994). Além da manose a MBL liga-se com afinidade a outros açúcares como N-acetilglucosamina, frutose, maltose, glicose e com menos afinidade a galactose e N-acetilgalactosamina (TUNER & HAMVAS, 2000).

Para que a via do complemento seja ativada é necessário que a MBL esteja associada a uma serinoprotease chamada MASP-2, com a qual forma um complexo que se liga ao patógeno ativando uma cascata de proteínas do sistema complemento que resulta na opsonização ou destruição da membrana do patógeno (THIEL *et al.*, 1997).

Estruturalmente a MBL é um homopolímero em forma de buquê que possui uma região N-terminal rica em cisteína seguida de repetição Gli-Xaa-Yaa e uma região globular C-

terminal com um sítio de reconhecimento a carboidratos (CRD). Na região N-terminal, pontes de dissulfeto ligam unidades de 32KDa formando um arranjo em tripla hélice, que formam um monômero ou subunidade estrutural com aproximadamente 96KDa (Figura 3). No soro a MBL apresenta-se na forma de monômeros até octâmeros, que estão associados também por pontes de dissulfeto, sendo os tetrâmeros a forma capaz de ativar o sistema complemento por associação das serino-proteases associadas à MBL (MASP-2) (TUNER, 1996).



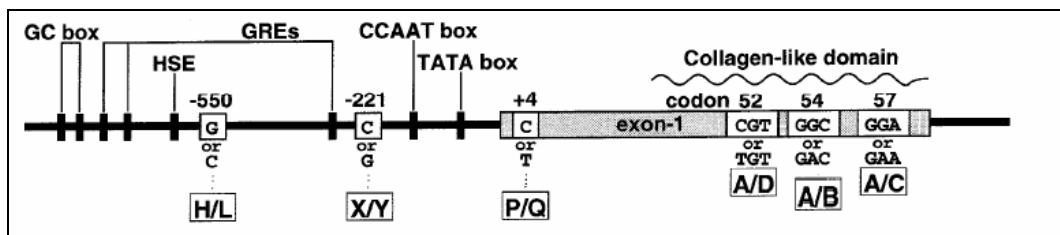
**Figura1 – Estrutura da MBL.**

Fonte: TUNER M.W., Immunol Today. 1996 Nov; 17(11):532-40.

O gene que codifica a MBL funcional (*MBL2*) está localizado no cromossomo 10q11.2-q21 e possui 4 éxons interrompidos por íntrons de 600, 1300 e 800 bp. Foi relatada a presença de um pseudogene localizado no cromossomo 10 chamado *MBL1*, mas que não desempenha função ao nível de expressão (GUO *et al.*, 1998). O gene *MBL2* codifica uma cadeia polipeptídica com 228 aminoácidos, constituindo as unidades que passam por um processamento pós-traducional e formam um arranjo em tripla-hélice que vai dar origem aos oligômeros (LARSEN *et al.*, 2004).

São relatadas mutações tanto na região promotora do gene *MBL2* como no éxon 1 da região estrutural, que codificam a região N-terminal rica em cisteína e parte da região rica em repetições da glicina (Gli-Xaa-Yaa) (TUNER & HAMVAS, 2000). No promotor existem duas regiões polimórficas, a H/L – 550 pb possuindo uma troca de guanina por citosina (G/C) e a Y/X – 221 pb que também troca (G/C), além de uma mutação na região não traduzida +4 pb (P/Q) com uma troca de citosina por timina (C/T). Esses alelos podem se combinar originando vários haplótipos sendo os mais freqüentemente encontrados nomeados de LXP, LYP, LYQ e HYP (MADSEN *et al.*, 1998).

No éxon 1 são encontradas três regiões polimórficas localizadas nos códons 52, 54 e 57, nomeadas de D, B e C, respectivamente, sendo o alelo selvagem chamado de A. No códon 52 uma troca de citosina (CTG) por timina (TGT) causa uma mudança do aminoácido arginina (Arg) por uma cisteína (Cis). No códon 54 a troca de uma guanina (CGC) por adenina (GAC) resulta na troca de uma glicina (Gli) por um ácido aspártico (Asp) e no códon 57 uma guanina (GGA) por uma adenina (GAA), provoca a mudança de uma glicina (Gli) por ácido glutâmico (Glu) (JACK *et al.*, 1997; TUNER & HAMVAS, 2000).



**Figura2 - Polimorfismo da região promotora e estrutural (éxon1) do gene *MBL2***

Fonte: Matsushita *et al.*, 1998.

O nível de MBL circulante no soro está fortemente associado às mutações na região promotora variando de acordo com as possíveis combinações de haplótipos e com os alelos do gene estrutural. As mutações estruturais causam alterações na região do domínio colágeno, impossibilitando a correta associação das subunidades estruturais em oligômeros funcionais. Em alguns casos o domínio rico em cisteína é também alterado, resultando em uma nova conformação estrutural, que muitas vezes impossibilita a interação correta com as MASPS. Indivíduos que são heterozigotos para o alelo mutante do gene estrutural apresentam uma redução de 10% na atividade da MBL em relação àqueles que têm os dois alelos selvagens (MADSEN *et al.*, 1998; TUNER & HAMAS, 2000).

As frequências dos alelos variam a depender do grupo étnico. O polimorfismo do códon 54 ocorre em aproximadamente 26% dos caucasianos. Em africanos a presença do alelo mutante do códon 57 é de 58%, já mutação do códon 52 tem uma frequência de aproximadamente 5% em africanos e caucasianos (LIPSCOMBE *et al.*, 1992; MADSEN *et al.*, 1998).

No Brasil poucos são os estudos sobre polimorfismo do *MBL2*. Um desses trabalhos foi desenvolvido por Boniotto *et al.*, (2003), que observaram em crianças brasileiras atendidas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP) infectadas com HIV-1 uma alta frequência do alelo mutante (O) 0,29, quando comparadas com controle 0,20 ( $p=0,0155$ ), sendo neste caso a MBL mutante seria um fator de risco para infecção por HIV-1.

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra infecções e desempenha um papel importante nos estudos das doenças infecciosas. A imunidade inata possui uma infinidade de elementos que ajudam na resposta do hospedeiro à infecção e a MBL sendo um desses elementos, possui um papel importante na defesa contra vários agentes infecciosos (EISEN & MINCHINTON, 2003; TAKAHASHI & EZEKOWITZ, 2005).

A presença de alelos variantes da MBL facilita a susceptibilidade para doença meningocócica, assim como para infecções provocadas por *Streptococcus pneumoniae* (EISEN & MINCHINTON, 2003). Em infecções por parasitas observou-se que a MBL era capaz de se ligar ao *Plasmodium falciparum*, mas era incapaz de impedir o seu crescimento. Foi também observada uma associação das mutações no promotor e genes estruturais com malária severa em relação à doença mais leve os quais possuíam uma frequência maior de genótipos selvagens para MBL (EISEN & MINCHINTON, 2003).

A manana é um dos principais componentes da membrana dos fungos. A MBL por ter capacidade de ligar-se à manose, apresenta um alto potencial de ligação a fungos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, sugerindo que a MBL pode ser importante fator de defesa contra estes patógenos. Mutações no gene estrutural da MBL estariam associadas com fatores de susceptibilidade a doenças provocadas por esses patógenos (EISEN & MINCHINTON, 2003).

A MBL é capaz de ligar-se à glicoproteína de membrana GP 120 do HIV e associações do polimorfismo da MBL com infecção pelo HIV são observadas em alguns trabalhos. Sendo assim, caso o indivíduo possua um *MBL2* polimórfico, têm maior susceptibilidade para infecção pelo HIV (JI *et al.*, 2005). Dados sobre a progressão da doença ainda são conflitantes, entretanto, especula-se que o genótipo L do promotor do *MBL2*, associado à baixa produção da MBL, parece proteger contra rápida progressão para AIDS. A idéia de que

níveis altos de MBL facilitam a progressão rápida para AIDS precisa ser mais estudada (JI, *et al.*, 2005).

#### 1.2.6. MBL e o HCV

As glicoproteínas E1 e E2 presentes no envelope do HCV são altamente glicosiladas, além de possuírem uma forte ligação *in vitro* com as lectinas de superfícies DC-SIGN expressas em células dendríticas e L-SIGN expressadas no fígado, as quais possuem as mesmas características funcionais e estruturais da MBL (PÖHLMANN *et al.*, 2003).

Matsushita *et al.* (1998), observaram em 93 pacientes japoneses portadores de hepatite C crônica, que o alelo B (códon 54) influencia a resposta ao tratamento com IFN- $\alpha$ , indivíduos com resposta não sustentada apresentaram uma frequência de mutação maior do alelo 54 (14,6%  $p=0,036$ ). Segundo Matsushita *et al.* (1998), essa hipótese atenta para o possível envolvimento do sistema complemento na imunidade inata do hospedeiro durante o tratamento através da eliminação do vírus. Nesse mesmo estudo não foi observada nenhuma associação das frequências genóticas entre população saudável e pessoas infectadas pelo HCV. O autor salienta que a frequência de polimorfismo na população japonesa é relativamente baixa, o que pode ter dificultado a análise do polimorfismo em relação à susceptibilidade para esta infecção.

Kilpatrick *et al.* (2003), dosaram a MBL circulante do soro de 180 pacientes europeus com hepatite C, que foram divididos em quatro grupos com concentração de MBL variando de 0  $\mu\text{g/ml}$  até acima de 2,5  $\mu\text{g/ml}$ . Destes 77 pacientes foram tratados com *peg*-IFN- $\alpha$ /RIBA (37 tiveram resposta sustentada e 40 não sustentada) e a concentração de MBL parece não ter relação com a resposta sustentada para terapia combinada, visto que no grupo com MBL em concentração acima de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  a proporção de resposta sustentada para resposta não sustentada foi de 19:22. Quanto à concentração de MBL, não foi observada nenhuma associação de susceptibilidade à infecção pelo vírus em indivíduos europeus quando comparados com indivíduos saudáveis. Neste trabalho não foi feito nenhum estudo de genótipo associado com a concentração sérica da MBL, o autor relata que é preciso mais estudos com populações maiores para confirmar esta observação.

Naito *et al.* (2005), observaram a frequência de polimorfismo da MBL em 77 indivíduos japoneses com hepatite C cronicamente infectados. Foram investigadas as frequências dos alelos A/B (códon 54) e da região promotora alelos X/Y (-221), os resultados mostraram que os genótipos mutantes da MBL não interferem na terapia com INF, visto que não foi

observada nenhuma relação entre os pacientes com resposta sustentada e resposta não sustentada com a mutação do códon 54 e da região promotora -221.

O estudo das frequências gênicas dos alelos mutantes da *MBL* ainda não é muito explorado em relação ao HCV e o que se tem na literatura atualmente é muito conflitante. A fim de esclarecer pontos da imunidade inata ainda não vistos na infecção e no curso clínico da doença, o presente estudo pretende esclarecer aspectos pouco observados quanto ao papel do polimorfismo da *MBL* na infecção pelo HCV na população brasileira.

### 1.2.7 MBL e Autoimunidade

O papel da imunidade adaptativa no desenvolvimento de doenças autoimunes é bem estabelecido e o interesse da participação da imunidade inata na imunopatogênese destas doenças vem aumentando. O impedimento da depuração de restos celulares expondo epítomos autoreativos parece ser um importante fator desencadeante de autoimunidade. A redistribuição de açúcares na superfície de células apoptóticas permite a ligação da MBL facilitando posterior fagocitose (HRRERA-ESPARZA *et al.* 2007).

Alelos polimórficos do *MBL2*, da região promotora e estrutural, foram relacionados como fator de risco para o desenvolvimento de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). Pacientes com LES e deficiência de MBL apresentam mais frequentemente envolvimento renal, infecções e trombose arterial (GARRED *et al.*, 2001).

A deficiência da MBL não parece ser fator de risco para desenvolvimento de Artrite Reumatóide (AR). Tal deficiência tem demonstrado estar mais relacionada à agressividade da doença do que à sua prevalência, como por exemplo: AR precoce, lesões articulares graves, nível elevado de fator reumatóide IgM; ressaltando o papel de MBL e do complemento na depuração de imunocomplexos (JACOBSEN *et al.*, 2001).

Haplotipos responsáveis por níveis séricos diminuídos de MBL predispoem também o desenvolvimento da Síndrome de Sjogren (SS), Doença Celíaca (DC) e Dermatomiosite (DM), sendo que na DC são também associados a outras doenças autoimunes; na DM, a outros fatores etiológicos de doenças autoimunes, e na SS, não foram demonstradas associações com fatores clínicos (WANG *et al.*, 2001; WERTH *et al.*, 2002; OHLENSCHLAEGER *et al.*, 2004; BONIOTTO *et al.*, 2003).

Na DM, onde o polimorfismo do Fator de necrose tumoral alpha (FNT- $\alpha$ ) (308 A promotor do FNT- $\alpha$ ) que é responsável por acelerar o processo de apoptose, parece estar associado à deficiência de *MBL*, sugerindo um modelo de causas associadas para o

desenvolvimento da doença, digo, exagerada produção de células apoptóticas e deficiência na depuração destas células (WERTH *et al.*, 2002).

Entre as doenças autoimunes associadas ao HCV, as doenças da tireóide ou de seus marcadores sorológicos são as mais prevalentes. O tratamento com alpha Interferon (IFN- $\alpha$ ) e Ribavirina (RIBA) é fator de risco para o aumento destas prevalências (LIBLAU *et al.*, 1995).

### 1.2.8 Autoimunidade Tireoidiana e HCV

Desenvolvimento de autoimunidade ou de marcadores sorológicos em pacientes com hepatite C crônica são relatados com frequência e aparentemente não estão associados com o genótipo viral. Os autoanticorpos mais frequentemente detectados são anticorpos anti-músculo liso (SMA), anti-nuclear (ANA), anti microsomal de fígado/rim (LKM), fator reumatóide, anti-cardiolipina e anti-tireoidianos. Uma maior prevalência de doenças autoimunes nos pacientes com o HCV ocorre mesmo na ausência de autoanticorpos prévios (WASMUTH *et al.*, 2004).

Vários mecanismos foram relatados como causa de associação do HCV com autoimunidade, como: potente linfotropismo viral, maior resistência de células B CD5+ infectadas à apoptose, heterogeneidade genética do vírus e presença no vírus de antígeno semelhante aos do hospedeiro (KESSEL & TOUBI, 2007).

Os anticorpos anti-tireoidianos (AAT), anti-tireoglobulina (Anti-Tg) e Anti-peroxidase tireoidiana (Anti-TPO), particularmente o último, são muito prevalentes nos indivíduos com HCV estando presentes em 5.2% a 12,5% destes pacientes (PATERON *et al.*, 1992). Muitos pacientes com AAT desenvolvem disfunção tireoidiana, principalmente hipotireoidismo (GANNE-CARRIE *et al.*, 2000). Foi demonstrado que o HCV possui seqüências de aminoácidos similares às encontradas nos antígenos tireoidianos. Estas seqüências estão presentes nas moléculas de tireoglobulina e peroxidase tireoidiana (HSIEH *et al.*, 2000).

Está bem estabelecido que a combinação de interferon alfa peguilado com ribavirina (IFN $\alpha$ -peg/RIBA) eleva a cura virológica para aproximadamente 50%, tornando-se o tratamento de escolha para pacientes infectados pelo HCV (MCHUTCHISON *et al.*, 1998; MCHUTCHISON & FRIED, 2003). O efeito terapêutico da terapia combinada em hepatite pelo HCV é relacionado à sua ação imunomodulatória, determinando uma resposta tipo Th 1 crítica no controle da infecção pelo HCV. Falha na resposta Th1 é um importante indicador de progressão da infecção pelo HCV (MIYATAKE *et al.*, 2007). Contudo, resposta tipo 1 é

importante fator para o desenvolvimento e manutenção de doenças autoimunes órgão-específicas (LIBLAU *et al.*, 1995).

O IFN- $\alpha$  associado ou não à RIBA causa efeitos colaterais incluindo desenvolvimento de AAT e disfunções tireoidianas, sendo as últimas mais frequentes nos pacientes com AAT positivos antes do tratamento. A maioria dos pacientes, no entanto, reverte para o eutireoidismo após o tratamento, embora existam relatos de que alguns pacientes permanecem doentes (KEE *et al.*, 2006). Existem evidências de que a adição de RIBA ao tratamento da hepatite pelo HCV não modifica a ocorrência dos AAT, embora cause hipotireoidismo mais frequentemente (CARELLA *et al.*, 2002). Pacientes que não desenvolvem anticorpos com o tratamento com IFN- $\alpha$  isoladamente, também não desenvolvem AAT no curso de um segundo tratamento com IFN- $\alpha$  apenas ou em associação à RIBA, sugerindo que possa ocorrer uma pré-disposição genética importante no desenvolvimento de autoimunidade induzida por citocinas (CARELLA *et al.*, 2002). Muitos dos estudos que demonstraram a associação de tratamento do HCV e desenvolvimento de AAT ou disfunção tireoidiana utilizaram monoterapia com IFN- $\alpha$  na forma não peguilada. Tran *et al.* (2007) compararam a influência dos dois esquemas terapêuticos, IFN- $\alpha$ /RIBA e IFN $\alpha$ -peg/RIBA e não encontraram diferença no desenvolvimento da disfunção tireoidiana no tratamento do HCV.

## **2. Definição dos Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar em pacientes infectados pelo HCV se uma ausência de resposta ao tratamento combinado com Peg-IFN $\alpha$ /RIBA estaria associada ao polimorfismo do *MBL2* e se este polimorfismo é associado ao desenvolvimento de marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana nestes pacientes.

### **2.2 Objetivos específicos**

**2.2.1** Determinar a prevalência do polimorfismo do gene *MBL2* em pacientes com HCV.

**2.2.2** Verificar a frequência do polimorfismo do gene *MBL2* em indivíduos saudáveis.

**2.2.3** Verificar se existe associação entre o polimorfismo do *MBL2* e a susceptibilidade à infecção pelo HCV.

**2.2.4** Verificar se existe associação entre o polimorfismo da *MBL2* e tipo de resposta ao tratamento com *Peg-IFN $\alpha$ /RIBA* nos pacientes infectados pelo HCV.

**2.2.5** Determinar a frequência de anticorpos antitireoidianos em indivíduos sadios e pacientes Infectados pelo HCV.

**2.2.6** Verificar se existe associação entre anticorpos antitireoidianos e o genótipo do HCV.

**2.2.7** Demonstrar a distribuição dos anticorpos antitireoidianos nos pacientes com HCV, segundo sexo e o tratamento com *Peg-IFN $\alpha$ /RIBA*.

**2.2.8** Verificar se existe associação entre o polimorfismo do *MBL2* em pacientes com o HCV e os marcadores sorológicos da autoimunidade tireoidiana.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 População de estudo**

Participaram do estudo 162 pacientes com HCV tratados ou não com *Peg-IFN $\alpha$ /RIBA*, atendidos no serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz- Universidade de Pernambuco- Brasil e 232 voluntários doadores de banco de sangue oriundos da mesma região dos pacientes. Os pacientes foram tratados com terapia combinada por 6 ou 12 meses dependendo do genótipo viral e os pacientes que terminaram o tratamento foram classificados de acordo com o tipo de resposta virológica após o término do tratamento como respondedores virológicos (RV=37), os que apresentaram o teste de HCV-RNA negativo; como não respondedores virológicos (NRV, n=28) os que continuaram positivos. Nenhum dos envolvidos no estudo era infectado por HIV ou HBV.

A frequência dos alelos foi determinada por percentagem e as frequências entre os grupos foram comparadas pelo Chi-quadrado ( $X^2$ ) e teste exato de Fisher utilizando tabela de contingência 2x2. Todas as análises consideram um  $p < 0.05$ , um intervalo de confiança de 95%, um poder de estudo de 80%, e foram realizados utilizando o programa *Epi info 6*.

O projeto da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco (CEPE-UPE) sob o protocolo nº UPE 090/04 (ANEXO A). Todos os indivíduos participantes do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. (APÊNDICE).

### 3.2 População alvo

#### 3.2.1 Tipo de amostragem e definição do tamanho de amostra

A população alvo foi de indivíduos atendidos no serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz – Universidade de Pernambuco – Recife (HUOC) e doadores de banco de sangue.

A amostra foi de indivíduos que foram tratados de infecção crônica pelo HCV com *Peg-IFN $\alpha$ /RIBA*, que responderam ou não de maneira sustentável ao tratamento, de indivíduos com o HCV virgens de tratamento específico e, de doadores de sangue.

Para o estudo que correlacionou AAT com o polimorfismo do *MBL2* em pacientes com o HCV não foi calculado “n” devido à ausência de dados na literatura.

O número de participantes para o estudo que correlacionou o desenvolvimento de AAT à infecção por HCV foi calculado “n” considerando uma frequência do AAT de 2% na população e de 12% nos indivíduos com o HCV (GANNE-CARRIE *et al.*, 2000).

Para o estudo que correlaciona o polimorfismo de *MBL 2* e a resposta ao tratamento de HCV, calculamos um n =150 baseado no estudo de Matsushita et al. (1998), que encontraram estes haplotipos na frequência de 60,7% nos pacientes que não responderam ao tratamento de HVC, e em 38,5% nos pacientes que responderam sustentavelmente, sendo cada grupo formado por 50 indivíduos.

#### 3.2.2 Definição dos casos:

Casos 1 - Indivíduos que apresentam testes imunoenzimáticos 3ª geração reagentes, confirmados por PCR para HCV-RNA qualitativo (pacientes com HCV).

Os pacientes com o HCV que terminaram o tratamento *Peg-IFN $\alpha$ /RIBA* e que tinham a carga viral disponível após o término do tratamento foram subdivididos como:

A - Respondedores virológicos (RV)-Pacientes que apresentaram a PCR-RNA negativa após o término do tratamento.

B - Não respondedores virológicos (NRV)-Pacientes que apresentaram a PCR-RNA positiva após o término do tratamento.

Casos 2 - Pacientes com HCV e com pesquisa de AAT positiva.

### 3.2.3 Definição de controles:

Controle 1 - Indivíduos que responderam ao tratamento combinado com Peg-IFN $\alpha$ /RIBA para o HCV (Este grupo foi considerado como controle quando se verificou a associação entre polimorfismo do *MBL2* e a resposta ao tratamento para o HCV).

Controle 2 - Pacientes com o HCV virgem de tratamento específico.

Controle 3 - Doadores de sangue sadios.

### 3.3 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo casos e controles. Os casos foram de indivíduos com HCV, posteriormente divididos em pacientes que responderam ou não de maneira sustentável o tratamento com Peg-IFN $\alpha$ /RIBA. Os grupos controles foram formados por doadores de sangue sadios e pacientes com o HCV virgem de tratamento.

### 3.4 Metodologia

Todos os pacientes foram diagnosticados como tendo o HCV pela pesquisa de anticorpos por análise imunoenzimática (EIA) positiva confirmada por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para HCV-RNA. Todos os indivíduos participantes do estudo foram soronegativos para HIV e HBV. A genotipagem do HCV foi realizada por PCR no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN-PE).

Todos os indivíduos do estudo foram testados para AAT por quimioluminescência (Roche®), considerando os níveis séricos para anti-TPO >34 e anti-Tg >115 UI/mL como positivo, seguindo a orientação do fabricante dos “kits”.

A genotipagem do Éxon 1 do *MBL2* de todos os indivíduos do estudo foi realizada por Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) utilizando iniciadores específicos seguindo protocolo já estabelecido (ARRAES *et al.*, 2006). Este método permite detectar simultaneamente os três polimorfismos estruturais com base nos diferentes comportamentos da curva de dissociação. Os alelos foram designados de 0, quando incluir qualquer alelo mutante (52, 54 e 57) ou de A quando for o alelo selvagem.

## Referências Bibliográficas

ALTER, M.J.; KUHNERT, W.L.; FINELLI, L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to Hepatitis C virus. Centers for Disease Control and Prevention. **MMWR RECOMM Rep.** v.52, n.3, p.1-13, 2003.

ARRAES, L.C.; DE SOUZA, P.R.; BRUNESKA, D.; CASTELO FILHO, A.; CAVADA, B. DE S.; DE LIMA FILHO J.L. *et al.* A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children. **Braz J Med Biol Res.** v.39, n.6, p.719-723, 2006.

BIGGER, C.B.; BRASKY, K.M.; LANFORD, R.E. DNA microarray analysis of chimpanzee liver during acute resolving hepatitis C virus infection. **J Virol.** v.75, n.15, p.7059-7066, 2001.

BIGGER, C.B.; GUERRA, B.; BRASKY, K.M.; HUBBARD, G.; BEARD, M.R.; LUXON, B.A. *et al.* Intrahepatic gene expression during chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees. **J Virol.** v.78, n.24, p.13779-13792, 2004.

BONIOTTO, M.; BRAIDA, L.; PIRULLI, D.; ARRAES, L.; AMOROSO, A.; CROVELLA, S. MBL2 polymorphisms are involved in HIV-1 infection in Brazilian perinatally infected children. **AIDS.** v.17, n.5, p.779-780, 2003.

BONKOVSKY, H.L.; MEHTA, S. Hepatitis C: a review and update. **J Am Acad Dermatol.** v.44, n.2, p.159-182, 2001.

BOZKAYA, H.; BOZDAYI, A.M.; ASLAN, N.; TÜRKAY, C.; SARIOGLU, M.; CENTINKAYA, H. *et al.* Circulating IL-2 and IL-10 in chronic active hepatitis C with respect to the response to IFN treatment. **Infection.** v.28, n.5, p.309-313, 2000.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J.R.; CARRILHO, F.J.; DA SILVA, L.C.; SOUTO, F.J.; ROSA, H. *et al.* Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v.38, n.1, p.41-49, 2005.

CARELLA, C.; MAZZIOTTI, G.; MORISCO, F.; ROTONDI, M.; CIOFFI, M.; TUCCILLO, C. *et al.* The addition of ribavirin to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism. **Eur J Endocrinol.** v.146, n.6, p.743-749, 2002.

CONRY-CANTILENA, C. Hepatitis C virus diagnostics: technology, clinical applications and impacts. **Trends Biotechnol.** v.15, n.2, p. 71-76, 1997.

CONRY-CANTILENA, C.; VANRADEN, M.; GIBBLE, J.; MELPOLDER, J.; SHAKIL, A.O.; VILADOMIU, L. *et al.* Routes of infection, viremia, and liver disease in blood donors found to have hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** v.334, n.26, p.1691-1696, 1996.

DAVIS, G.L.; BALART, L.A.; SCHIFF, E.R.; LINDSAY, K.; BODENHEIMER, H.C.JR.; PERRILLO, R.P. *et al.* Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa. A multicenter randomized, controlled trial. Hepatitis Interventional Therapy Group. **N Engl J Med.** v.321, n.22, p.1501-1506, 1989.

DUMESTRE-PERARD, C.; PONARD, D.; DROUET, C.; LEROY, V.; ZARSKI, J.P.; DUTERTRE, N. *et al.* Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. **Clin Exp Immunol.** v.127, n.1, p.131-136, 2002

EISEN, D.P.; MINCHINTON, R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infections diseases. **Clin Infect Dis.** v.37, n.11, p.1496-1505, 2003.

FARCI, P.; STRAZZERA, R.; ALTER, H.J.; FARCI, S.; DEGIOANNIS, D.; COIANA, A. *et al.* Early changes in hepatitis C viral quasiespecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. **Proc Natl Acad Sci USA.** v.99, n.5, p. 3081-3086, 2002.

FELD, J.J.; HOOFNAGLE, J.H. Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. **Nature.** v.436, n. 7053, p. 967-972, 2005.

FLINT, M.; MAIDENS, C.; LOOMIS-PRICE, L.D.; SHOTTON, C.; DUBUISSON, J.; MONK, P. *et al.* Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. **J Virol.** v.73, n. 8, p.6235-6244, 1999.

FLINT, M.; THOMAS, J.M.; MAIDENS, C.M.; SHOTTON, C.; LEVY, S.; BARCLAY, W.S. *et al.* Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein. **J Virol.** v.73, n.8, p.6782-6790, 1999.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO, O.J.; SETTE, H.JR.; SABINO, E.; BASSIT, L.; NITRINI, D.R. *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of São Paulo, measured by serologic survey of a stratified, randomized and residence-based population. **Braz J Infect Dis.** v.2, n.6, p.269-284, 1998.

GANNE-CARRIE, N.; MEDINI, A.; CODERC, E.; SEROR, O.; CRISTIDIS, C.; GRIMBERT, S. *et al.* Latent autoimmune thyroiditis in untreated patients with HCV chronic hepatitis: a case-control study. **J Autoimmun.** v.14, n.2, p.189-193, 2000.

GARRED, P.; LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; KOCH, C. Mannose-binding lectin deficiency-revisited. **Mol Immunol.** v.40, n.2-4, p.73-84, 2003.

GARRED, P.; VOSS, A.; MADSEN H.O.; JUNKER, P. Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. **Genes Immun.** v.2, n.8, p.442-450, 2001.

GIANNINI, C.; BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ.** v.10, s.1, s.27-38, 2003.

GREEN, P.J.; FEIZI, T.; STOLL, M.S.; THIEL, S.; PRESCOTT, A.; MCCONVILLE, M.J. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of Leishmania parasites by the human serum mannan-binding protein. **Mol Biochem Parasitol.** v.66, n.2, p.319-328, 1994.

GUO, N.; MOGUES, T.; WEREMOWICZ, S.; MORTON, C.C.; SASTRY, K.N. The human ortholog of rhesus mannose-binding protein-A gene is an expressed pseudogene that localizes to chromosome 10. **Mamm Genome**. v.9, n.3, p.246-249, 1998.

HARTSHORN, K.L.; SASTRY, K.; WHITE, M.R.; ANDERS, E.M.; SUPER, M.; EZEKOWITZ, R.A. *et al.* Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. **J Clin Invest**. v.91, n.4, p.1414-1420, 1993.

HAURUM, J.S.; THIEL, S.; JONES, I.M.; FISCHER, P.B.; LAURSEN, S.B.; JENSENIUS, J.C. Complement activation upon binding of mannan-binding protein to HIV envelope glycoproteins. **AIDS**. v.7, n.10, p.1307-1313, 1993.

HERRERA-ESPARZA, R.; HERRERA-VAN-OOSTDAN, D.; LÓPEZ-ROBLES, E.; AVALOS-DÍAZ, E. The hole of apoptosis in autoantibody production. **Reumatismo**. v.59, n.2, p.87-99, 2007.

HSIEH, M.C.; YU, M.L.; CHUANG, W.L.; SHIN, S.J.; DAI, C.Y.; CHEN, S.C. *et al.* Virologic factors related to interferon-alpha-induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. **Eur J Endocrinol**. v.142, n.5, p.431-437, 2000.

HSU, M.; ZHANG, J.; FLINT, M.; LOGVINOFF, C.; CHENG-MAYER, C.; RICE, C.M. *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.100, n.12, p.7271-7276, 2003.

JACK, D.; BIDWELL, J.; TUNER, M.; WOOD, N. Simultaneous genotyping for all three known structural mutations in the human mannose-binding lectin gene. **Hum Mutat**. v.9, n.1, p.41-46, 1997.

JACOBSEN, S.; MADSEN, H.O.; KLARLUND, M.; JENSEN, T.; SKJODT, H.; JESEN K.E. *et al.* TIRA Grup. The influence of mannose binding lectin polymorphisms on disease outcome in early polyarthritis. **J Rheumatol**. v.28, n.5, p.935-942, 2001.

JI, X.; GEWURZ, H.; SPEAR, G.T. Mannose binding lectin (MBL) and HIV. **Mol Immunol**. v.42, n.2, p.145-152, 2005.

KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T.; YAMASHINA, I. A serum lectin (mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. **J Biochem**. v.106, n.3, p.483-489, 1989.

KECK, Z.Y.; OP DE BEECK, A.; HADLOCK, K.G.; XIA, J.; LI, T.K.; DUBUISSON, J. *et al.* Hepatitis C virus E2 has three immunogenic domains containing conformational epitopes with distinct properties and biological functions. **J Virol**. v.78, n.17, p.9224-9232, 2004.

KEE, K.M.; LEE, C.M.; WANG, J.H.; TUNG, H.D.; CHANGCHIEN, C.S.; LU, S.N. *et al.* Thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C receiving a combined therapy of interferon and ribavirin: incidence, associated factors and prognosis. **J Gastroenterol Hepatol**. n.21, n.1, p.319-326, 2006.

- KESSEL, A.; TOUBI, E. Chronic HCV-related autoimmunity: a consequence of viral persistence and lymphotropism. **Curr Med Chem.** v.14, n.5, p. 547-554, 2007.
- KILPATRICK, D.C.; DELAHOOKE, T.E.; KOCH, C.; TURNER, M.L.; HAYES, P.C. Mannan-binding lectin and hepatitis C infection. **Clin Exp Immunol.** v.132, n.1, p.92-95, 2003.
- LARSEN, F.; MADSEN, H.O.; SIM, R.B.; KOCH, C.; GARRED, P. Disease-associated mutations in human mannose-binding lectin compromise oligomerization and activity of the final protein. **J Biol Chem.** v.279, n. 20, p.21302-21311, 2004.
- LARSON, A.M.; CARITHERS, R.L. Hepatitis C in clinical practice. **J Intern Med.** v.249, n.2, p.111-120, 2001.
- LAU, J.Y.; TAM, R.C.; LIANG, T.J.; HONG, Z. Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection. **Hepatology.** v.35, n.5, p.1002-1009, 2002.
- LAUER, G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. **N Engl J Med.** v.345, n.1, p.41-52, 2001.
- LEIKINA, E.; DELANOE-AYARI, H.; MELIKOV, K.; CHO, M.S; CHEN, A.; WARING, A.J. *et al.* Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. **Nat Immunol.** v.6, n.10, p.995-1001, 2005.
- LIBLAU, R.S.; SINGER, S.M.; MCDEVITT, H.O. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunol Today.** v.16, n.1, p.34-38, 1995.
- LIPSCOMBE, R.J.; SUMIYA, M.; HILL, A.V.; LAU, Y.L.; LEVINSKY, R.J.; SUMMERFIELD, J.A. *et al.* High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet.** v.1, n.9, p.709-715, 1992.
- LUBINSKI, J.; NAGASHUNMUGAM, T.; FRIEDMAN, H.M. Viral interference with antibody and complement. **Semin Cell Dev Biol.** v.9, n.3, p.329-337, 1998.
- LYRA, A.C.; FAN, X.; DI BISCEGLIE, A.M.; Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. **Braz J Med Biol Res.** v.37, n.5, p.691-695, 2004.
- MADSEN, H.O.; SATZ, M.L.; HOGH, B.; SVEJGAARD, A.; GARRED, P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. **J Immunol.** v.161, n.6, p.3169-3175, 1998.
- MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; MATSUMOTO, M.; OHTA, Y.; MISHIRO, S. Association of mannose-binding lectin gene haplotype LXPB and LYPB with interferon-resistant hepatitis C virus infection in Japanese patients. **J Hepatol.** v.29, n.5, p.695-700, 1998.

MATSUSHITA, M.; HIJIKATA, M.; OHTA, Y.; IWATA, K.; MATSUMOTO, M.; NAKAO, K. *et al.* Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. **Arch Virol.** v.143, n.4, p.645-651, 1998.

MCHUTCHISON, J.G.; FRIED, M.W. Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and ribavirin. **Clin Liver Dis.** v.7, n.1, p.149-161, 2003.

MIYATAKE, H.; KANTO, T.; INOUE, M.; SAKAKIBARA, M.; KAIMORI, A.; YAKUSHIJIN, T. *et al.* Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate Th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat.** v.14, n.6, p. 404-412, 2007.

MONDELLI, M.U. Natural history of hepatitis C virus infection. **J Biol Regul Homeost Agents.** v.17, n.2, p.128-132, 2003.

NAITO, M.; MATSUI, A.; INAO, M.; NAGOSHI, S.; NAGANO, M.; ITO, N. *et al.* 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.** v.40, n.4, p.381-388, 2005.

OHLENSCHLAEGER, T.; GARRED, P.; MADSEN, H.O.; JACOBSEN, S.; Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. **N England J Med.** v.351, n.3, p.260-267, 2004.

OP DE BEEK, A.; VOISSET, C.; BARTOSCH, B.; CICZORA, Y.; COCQUEREL, L.; KECK, Z. *et al.* Characterization of functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. **J Virol.** v.78, n.6, p.2994-3002, 2004.

OWSIANKA, A.; CLAYTON, R.F.; LOOMIS-PRINCE, L.D.; MCKEATING, J.A.; PATEL, A.H. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. **J Gen Virol.** v.82, n.8, p.1877-1883, 2001.

PATERON, D.; HARTMANN, D.J.; DUCLOS-VALLEE, J.C.; JOUANOLLE, H.; BEAUGRAND, M. Latent autoimmune thyroid in patients with chronic HCV hepatitis. **J Hepatol.** v.16, n.1-2, p.244-245, 1992.

PÖHLMANN, S.; ZHANG, J.; BARIBAUD, F.; CHEN, Z.; LESLIE, G.J.; LIN, G. *et al.* Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. **J Virol.** v.77, n.7, p.4070-4080, 2003.

SELBY, M.J.; GLAZER, E.; MASIARZ, F.; HOUGHTON, M. Complex processing and protein:protein interactions in the E2:NS2 region of HCV. **Virology.** v.204, n.1, p.114-122, 1994.

SHARARA, A.I.; HUNT, C.M.; HAMILTON, J.D. Hepatitis C. **Ann Intern Med.** v.125, n.8, p.658-668, 1996.

SHIMIZU, Y.H.; HIJIKATA, M.; IWAMOTO, A.; ALTER, H.J.; PURCELL, R.H.; YOSHIKURA, H. Neutralizing antibodies against hepatitis C virus and the emergence of neutralization escape mutant viruses. **J Virol.** v.68, n.3, p.1494-1500, 1994.

SONG, J.; FUJII, M.; WANG, F.; ITOH, M.; HOTTA, H. The NS5A protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. **J Gen Virol.** v.80, n.4, p.879-886, 1999.

STEFFENSEN, R.; THIEL, S.; VARMING, K.; JERSILD, C.; JENSENIUS, J.C. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **J Immunol Methods.** v.241, n.1-2, p.33-42, 2000.

SUMMERFIELD, J.A.; SUMIYA, M.; LEVIN, M.; TUNER, M.W. Association of mutations in mannose binding protein gene with childhood infection in consecutive hospital series. **BMJ.** v.314, n.7089, p.1229-1232, 1997.

SUPER, M.; THIEL, S.; LU, J.; LEVINSKY, R.J.; TURNER, M.W. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. **Lancet.** v.2, n.8674, p.1236-1239, 1989.

TAKAHASHI, K.; EZEKOWITZ, R.A. The role of the mannose-binding lectin in innate immunity. **Clin Infect Dis.** v.41, s.7, p.440-444, 2005.

TAYLOR, D.R.; SHI, S.T.; ROMANO, P.R.; BARBER, G.N.; LAI, M.M. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. **Science.** v.285, n.5424, p.107-110, 1999. 12.

THAN, H.A.; ATTIA, J.R.; JONES T.L.; BATEY, R.G. Pegylated interferon- $\alpha 2\beta$  in combination with ribavirin does not aggravate thyroid dysfunction in comparison to regular interferon- $\alpha 2\beta$  in hepatitis C population: meta-analysis. **J Gastroenterol Hepatol.** v.22, n.4, p.472-476, 2007.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S.B.; POULSEN, K. *et al.* A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature.** v.386, n.6624, p. 506-510, 1997.

THOMAS, H.C.; FOSTER, G.R.; SUMIYA, M.; MCINTOSH, D.; JACK, D.L.; TURNER, M.W. *et al.* Mutation of gene of mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. **Lancet.** v.348, n.9039, p. 1417-1419, 1996.

THAN, H.A.; ATTIA J.R.; JONES T.L.; BATEY R.G. Pegylated interferon- $\alpha 2\beta$  in combination with ribavirin does not aggravate thyroid dysfunction in comparison to regular interferon- $\alpha 2\beta$  in hepatitis C population: meta-analysis. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 22, p. 472- 476, 2007.

TRAPERO, M.; GARCÍA-BUEY, L.; MUÑOZ, C.; VITÓN, M.; MORENO-MONTEAGUDO, J.A.; BORQUE, M.J. *et al.* Maintenance of T1 response as induced during

PEG-IFNalpha plus ribavirin therapy controls viral replication in genotype-1 patients with chronic hepatitis C. **Rev Esp Enferm Dig.** v.97, n.7, p.481-490, 2005.

TUNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today.** v.17, n.11, p.532-540, 1996.

TUNER, M.W.; HAMVAS, M.R. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. **Rev Immunogenet.** v.2, n.3, p.305-322, 2000.

WANG, Z.Y.; MORINOBU, A.; KANAGAWA, S.; KUMAGAI, S. Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjögren's syndrome. **Ann Rheum Dis.** v.60, n.5, p.483-486, 2001.

WASMUTH, H.E.; STOLTE, C.; GEIER, A.; DIETRICH, C.G.; GARTUNG, C.; LORENZEN, J. *et al.* The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C. **BMC Infect Dis.** v.4, n. 1, p.4, 2004.

WERTH V.P.; BERLIN J.A.; CALLEN J.P.; MICK, R.; SULLIVAN, K.E. Mannose Binding Lectin (MBL) polymorphisms associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. **J Invest Dermatol.** v.119, n.6, p.1394-1399, 2002.

WERTH V.P.; CALLEN, J.P.; ANG, G.; SULLIVAN, K.E. Associations of tumor necrosis factor alpha and HLA polymorphisms with adult dermatomyositis: implications for a unique pathogenesis. **J Invest Dermatol.** v.119, n.3, p.617-620, 2002.

ZEIN, N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. **Clin Microbiol Rev.** v.13, n.2, p.223-235, 2000.

ZEIN, N. N. The epidemiology and natural history of hepatitis C virus infection. **Cleve Clin J Med.** v.70, s.4, p. 2-6, 2003.

## 4. Publicações

Esta pesquisa originou os seguintes Artigos:

**4.1 Artigo I** - *Ausência de associação entre polimorfismo estrutural da lectina ligadora de manose e a resposta ao tratamento da hepatite C com IFN $\alpha$ -peg/RIBA.*

**4.2 Artigo II** – *Hepatite C e marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana: Fatores virológicos e os relacionados à terapia combinada com interferon alpha peguilado e ribavirina.*

**4.3 Comunicação Breve** – *Polimorfismo do éxon 1 do gene da lecitina ligadora de manose (MBL2) em pacientes com hepatite C portadores de marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana.*

#### 4.1 Artigo I

O artigo científico gerado por esta pesquisa será enviado à revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* o qual foi redigido de acordo com as normas especificadas no endereço eletrônico do próprio periódico. <http://www.scielo.br/revistas/bjmbr/iaboutj.htm> (ANEXO B).

*Artigo I - Ausência de associação entre polimorfismo estrutural da lectina ligadora de manose e a resposta ao tratamento da hepatite C crônica com IFNa-peg/RIBA.*

## **AUSÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE E A RESPOSTA AO TRATAMENTO DA HEPATITE C CRÔNICA COM *IFN $\alpha$ -PEG/RIBA***

F.M. Melo<sup>1,2</sup>, L.R.S. Vasconcelos<sup>2,4</sup>, A.V.M.S. Barreto<sup>2</sup>, P. Moura<sup>2</sup>, M.S.M. Cavalcanti<sup>2</sup>, L.M.M.B. Pereira<sup>3,4</sup>, H. Ramos<sup>1,3</sup>.

1. Deptº de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
2. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco – ICB/UPE
3. Deptº de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de Pernambuco – FCM-UPE
4. Instituto do Fígado de Pernambuco – IFP/PE, Brasil

Endereço para correspondência

Francisco Montenegro de Melo

Rua Amaro Bezerra, 584 Derby

52010-150 - Recife, PE, Brasil

E-mail: francisco.montenegro@ig.com.br

## RESUMO

O Interferon alfa peguilado (IFN $\alpha$ -peg) associado à ribavirina (RIBA) melhorou a resposta terapêutica dos pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), embora de maneira insatisfatória. Estudos de fatores relacionados à resposta terapêutica não sustentável podem indicar novas estratégias de tratamento. O polimorfismo no éxon 1 do gene da lectina ligadora de manose (*MBL2*) altera os níveis séricos e a funcionalidade desta lectina (MBL), que é componente da imunidade natural, e poderia estar envolvida na susceptibilidade e no tipo de resposta ao tratamento do HCV. O presente estudo pretende demonstrar se existe associação entre o polimorfismo do *MBL2* em pacientes com o HCV e a resposta ao tratamento com IFN $\alpha$ -peg/RIBA. Participaram deste estudo 162 pacientes infectados pelo HCV, sendo 111 tratados ou em tratamento com IFN $\alpha$ -peg/RIBA e 51 não tratados atendidos no Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco – Brasil e, 232 voluntários sadios. Entre estes pacientes, 65 indivíduos terminaram o tratamento com IFN $\alpha$ -peg/RIBA e foram classificados de acordo com a resposta virológica em respondedores (RV) (n=37) e não respondedores (NRV) (n=28). O polimorfismo do *MBL2* foi determinado por PCR em tempo real, sendo o alelo selvagem, denominado (A) e mutante (0). A frequência do genótipo 00 do *MBL2* foi mais alta nos pacientes com HCV do que nos voluntários ( $p=0,0045$ ; IC 1,40 – 8,61, OR 3,39). Os genótipos minoritários A0/00 não foram mais frequentes no grupo que responderam ao tratamento ( $p=0,1146$ ; OR 2,54; IC 0,83 -7,87). O polimorfismo estrutural do *MBL2* foi associado à infecção por HCV, indicando que a MBL poderia ter um papel na imunidade inata contra este vírus. A deficiência de MBL parece não influenciar a resposta ao tratamento da HCV, embora uma população maior de pacientes deva ser estudada.

Descritores: HCV, MBL, polimorfismo, tratamento, imunidade inata.

Título Resumido: Polimorfismo do *MBL2* e o tratamento do HVC

## ABSTRACT

The pegylated interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ -peg) associated to ribavirin (RIBA) improved the therapeutic response of hepatitis C virus (HCV), but failure occurs. Studies investigating the causative factors of the therapy failure may highlight new strategies for treatment. The polymorphisms in the exon 1 in the gene of mannose binding lectin (*MBL2*) diminishes the levels and activity of this lectin (MBL), that is a component of the innate immunity, and could be involved in the susceptibility to HCV and the outcome of HCV therapeutic. We intend to study the association between *MBL2* polymorphisms with HCV infection and the response to its treatment. Was studied 162 HCV patients attended in University Hospital Oswaldo Cruz of the University of Pernambuco- Brazil and 232 health individuals. Among the patients, 51 were untreated and 65 ended the treatment. The last patients were further divided as responders, VR (n=37) and non-responders, NR (n=28). The genotypes for *MBL2* were accessed by real time PCR determining the wild type allele (A) and the minority or polymorphic alleles (0). The minority genotypes A0/00 were more frequent in VR group ( $p=0,1146$ ; OR 2,54; IC 0,83-7,87), although without significance. The frequency of the genotyping 00 was higher in the HCV patients than in health individuals ( $p=0,0045$ ; IC 1,40–8,61; OR 3,39). Thus, the MBL deficiency may be important for the virus acquisition, but did not seem to influence the response to treatment in HCV. Since we studied a small group of patients further studies are recommended in order to establish the precise role of MBL in the HCV treatment outcome.

Keywords: HCV, MBL, polymorphism, treatment, innate immunity.

Running title: *MBL2* polymorphisms and HCV treatment

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais doenças crônicas do fígado, considerada problema de saúde pública mundial, sendo atualmente a principal indicação de transplante hepático. A infecção é transmitida principalmente através do sangue e tende a cronificar na maioria dos casos, 50% a 80%<sup>1</sup>. Infecção crônica pelo HCV pode resultar em cirrose e carcinoma hepático. Os fatores relacionados a uma maior tendência para a doença crônica não são bem conhecidos, embora interação entre o vírus e o sistema imunológico do hospedeiro devam estar envolvidos<sup>2</sup>. O tratamento combinado IFN $\alpha$ -peg/RIBA é a terapia padrão para pacientes com o HCV. A adição de polietilenoglicol ao IFN $\alpha$  produz uma molécula com a meia vida maior do que a molécula natural, resultando em melhor eficácia e doses mais espaçadas. Esta associação permitiu a resposta virológica sustentada melhorar de 40% para 50% a 55%<sup>3</sup>. A resposta terapêutica não é uniforme, existindo características do vírus e do paciente que condicionam a eficácia do tratamento, tais como: esteatose hepática, grau de fibrose hepática, genótipo viral e o consumo de álcool, genótipo e características do vírus<sup>4,5</sup>.

A MBL é um componente de imunidade natural capaz de ligar-se a carboidratos presentes na superfície de microrganismos, células apoptóticas, restos celulares e imuno-complexos, resultando em ativação do complemento. O gene *MBL2*, que codifica a MBL, é localizado no cromossoma 10 e contém quatro éxons<sup>6</sup>. Existem várias regiões polimórficas no gene *MBL2* que afetam a concentração sérica desta lectina, como as que se encontram na região promotora e no éxon 1 que pode ocorrer alternativamente nos códonos 52, 54 ou 57. Estes alelos polimórficos do éxon 1 são designados de D, B e C, respectivamente, enquanto o alelo selvagem é chamado de “A”. A presença de qualquer alelo minoritário é chamada coletivamente de “O”<sup>7,8</sup>.

A presença de alelos variantes do *MBL2* é relacionada à maior susceptibilidade para doença meningocócica, e para infecções causadas por *Streptococcus pneumoniae*. A MBL pode reconhecer resíduos de carboidratos na superfície da *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, podendo os alelos minoritários do *MBL2* estarem associados à susceptibilidade de infecção por tais organismos. O polimorfismo do *MBL2* é também associado a casos mais graves de malária<sup>8,9</sup>.

A MBL é associada à resposta antiviral. Ela é capaz de ligar-se ao vírus da influenza A<sup>9</sup> e a glicoproteína 120 (GP120) do envelope do HIV, prevenindo a ligação do vírus com as células CD4<sup>8</sup>. A MBL pode estar relacionada com a fisiopatologia da infecção pelo

HBV<sup>10,11</sup>, embora os dados sejam conflitantes. Cheong *et al.* (2005) não encontraram relação entre o polimorfismo de códon 54 de *MBL2* com progressão de infecção pelo HBV para a cronicidade, na população Coreana<sup>12</sup>. Deficiência de MBL já foi relacionada com o desenvolvimento de cirrose, carcinoma hepatocelular e o desenvolvimento de peritonite bacteriana espontânea, em pacientes com cirrose decorrente de infecção pelo HBV e progressão da hepatite B crônica<sup>12,13</sup>.

Os estudos da associação da MBL com o HCV apresentam dados discordantes. Matsushita *et al.* (1998) não encontraram associação entre polimorfismo do *MBL2* e a susceptibilidade de infecção pelo HCV, embora tenham observado uma associação entre o alelo 54 e a falha ao tratamento<sup>14</sup>. Os dados de Matsushita *et al.* (1998) não foram confirmados por outros estudos, também realizados na população japonesa<sup>15</sup>. Kilpatrick *et al.* (2003) investigando a variação dos níveis séricos de MBL em pacientes com o HCV, na Europa, não demonstraram relação com a progressão da doença nem com a resposta ao tratamento<sup>16</sup>. Mutação no códon 52 foi relacionada com a progressão da infecção em uma série de pacientes japoneses<sup>17</sup>. Um estudo, realizado no Brasil, investigou a influência do polimorfismo do *MBL2* na infecção pelo HCV e evidenciou uma associação entre os alelos e genótipos mutantes do *MBL2* com o HCV, quando comparado com a população sadia, e não demonstrou associação entre este polimorfismo ao tipo resposta ao tratamento combinado com IFN $\alpha$ -peg/RIBA<sup>18</sup>.

O objetivo do presente estudo foi determinar o polimorfismo do *MBL2* é fator de risco para a infecção pelo HCV e investigar a influência do mesmo na resposta terapêutica dos pacientes com o HCV ao tratamento combinado com IFN $\alpha$ -peg/RIBA.

## **Material e Métodos**

### **População de estudo**

Participaram do estudo 162 pacientes com o HCV e 232 voluntários doadores de banco de sangue oriundos da mesma região dos pacientes. Considerando os pacientes, 51 deles eram virgens de tratamento e 46 deles se encontravam em tratamento com IFN $\alpha$ -peg/RIBA. Os indivíduos que terminaram o tratamento (n= 65) foram classificados de acordo com o tipo de resposta virológica após o termino do tratamento como: respondedores

virológicos (RV, n=37), os que apresentaram o teste de HCV-RNA negativos e como não respondedores (NRV, n=28) os que continuavam positivos.

Os pacientes foram atendidos no serviço de Gastrohepatologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco – Brasil. O critério diagnóstico de infecção por HCV foi realizado por análise imunoenzimática (EIA) e confirmação dos positivos pela reação em cadeia da polimerase/transcriptase reversa (RT-PCR) para HCV. Os pacientes foram tratados com terapia combinada por 6 e quando infectados pelo genótipo 1a ou 1b do HCV, por 12 meses. Nenhum dos envolvidos no estudo era infectado por HIV ou HBV. Os genótipos virais mais freqüentes foram 1a e 3b, distribuição que correspondente a descrita para a população do Nordeste do Brasil<sup>19</sup>.

### **Genotipagem para *MBL2***

A detecção do polimorfismo do *MBL2* foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time-PCR), baseada na diferença da temperatura de dissociação que distingue os pacientes homozigotos e heterozigotos (alelo 00 e A0) para a mutação dos pacientes com o alelo selvagem (alelo A), seguindo o protocolo de Hladnik et al. (2002)<sup>20</sup>.

### **Análise Estatística**

Consideramos, para todas as análises, um poder de estudo de 80%. A freqüência dos alelos foi determinada por porcentagem. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado para cada polimorfismo pelo teste do  $\chi^2$ . Comparação de freqüência foi realizada pelo teste exato de Fisher quando necessário.

### **Resultados**

As características demográficas em relação a sexo e idade, não foram diferentes entre os grupos de pacientes (virgens de tratamento, RV, NRV e pacientes em tratamento) e controles. Nos controles, as freqüências dos alelos A e 0 foram de 79%, 21% e dos genótipos AA, A0 e 00 foram de 62%, 33% e 5%, respectivamente. Nos pacientes infectados com o HCV as freqüências dos alelos foram de 68%, 32%, e dos genótipos de 48%, 41% e 11%, respectivamente (tabela 1).

As freqüências do polimorfismo no éxon 1 do *MBL2* de todos os pacientes infectados pelo HCV e dos voluntários sadios encontram-se na tabela 2.

O alelo 0 e os genótipos A0 e 00 foram mais freqüentes nos pacientes com o HCV de que nos indivíduos do grupo de controle ( $p=0,0005$ ) e ( $p=0,0044$ ), respectivamente. As chances de se encontrar o alelo 0 ou os genótipos A0 e 00 nos infectados pelo HCV foram de 1,79 e 1,84 vezes maior quando comparado com grupo controle. Quando comparamos o genótipo 00, que indica deficiência da MBL, encontramos uma chance 3,39 vezes maior para a infecção pelo HCV, nestes indivíduos.

Os pacientes RV não apresentaram uma freqüência maior dos genótipos A0 e 00 em relação aos pacientes NRV ( $p=0,1146$ ). A diferença da freqüência alélica A vs 0 apresentou resultado semelhante ( $p=0,3168$ ) (Tabela 2).

## Discussão

A persistência de infecção pelo HCV na maioria dos indivíduos infectados é problema de saúde pública mundial. A susceptibilidade à infecção pelo HCV, a eliminação do vírus após a infecção e a resposta ao tratamento parecem ser dependentes do sistema imunológico do paciente. É bem estabelecido que diversos fatores, incluindo idade, momento da infecção primária, sexo e possivelmente etnia são importantes no desenvolvimento das infecções crônicas e no tipo de resposta ao tratamento<sup>2</sup>.

Polimorfismos de genes da imunidade inata são descritos como capazes de influenciar a história natural de doenças virais. Vários estudos relacionam a susceptibilidade à infecção crônica pelo HBV, HIV e HTLV1 com o polimorfismo do gene *MBL2*<sup>21,22,23,24</sup>.

Este estudo demonstrou que há uma elevada freqüência alélica e genotípica do polimorfismo do éxon 1 do *MBL2* em pacientes infectados pelo HCV. Isto confirma os resultados de Segat *et al.*(2007)<sup>18</sup>. Estudamos uma população maior de pacientes e controles (165 pacientes e 232 indivíduos sadios), onde o teste para o HCV, HIV e HBV foi realizado nos voluntários sadios, diferentemente de Segat *et al.*(2007), que estudou 111 pacientes e 165 controles. Na nossa análise a chance do indivíduo com genótipo 00 se infectar com o HCV foi de 3,39, sendo maior do que a encontrada por Segat *et al.*(2007), mostramos também um menor intervalo de confiança (IC=1,40-8,61)<sup>18</sup>.

Este resultado não foi concordante com os relatos anteriores realizados em pacientes de origem asiática. A população do nordeste do Brasil é formada por africanos, caucasianos e

americanos nativos que tornam esta população geneticamente distinta das populações dos relatos citados por Matsushita *et al.* (1998) e Sasaki *et al.*<sup>17,25</sup>.

Quanto à variação sérica da MBL, um estudo de Kilpatrick *et al.* (2003) em população européia não evidenciou qualquer associação entre os níveis da lectina com a progressão para a doença ou resposta ao tratamento, porém os níveis de MBL estavam elevados nos pacientes em comparação com os controles<sup>16</sup>. Neste estudo, não foi realizada análise genética dos alelos variantes do *MBL2*.

As glicoproteínas do envelope do HCV, E1 e E2 são altamente glicosiladas e são capazes de se ligar às lectinas da superfície DC-SIGN expressas em células dendríticas e L-SIGN expressas nas células endoteliais dos sinusóides hepáticos. A DC-SIGN e a MBL podem se ligar aos mesmos ligantes<sup>26</sup>. A MBL poderia ligar-se a regiões glicosiladas no envelope do HCV e prevenir a fusão de vírus com células do hospedeiro ou a destruição viral por ativação do complemento e opsonização<sup>27</sup>. Portanto, MBL poderia prevenir infecções no seu início funcionando como fator protetor. Moléculas de MBL ligadas na superfície do HCV poderiam impedir a penetração do HCV nas células endoteliais dos sinusóides hepáticos e células dendríticas evitando uma resposta imune mais específica.

O tratamento padrão atual para terapia inicial de pacientes com o HCV é IFN $\alpha$ -peg/RIBA. A resposta ao tratamento desta terapia é superior aos relatados anteriores com uso da associação de RIBA e IFN não peguado, embora pacientes infectados pelo sorotipo 1 tenham resposta frequentemente insatisfatória<sup>28</sup>. O conhecimento de fatores imunológicos associados aos tipos de respostas virais ao tratamento da infecção pelo HCV com a terapia combinada poderia levar a melhores resultados deste tratamento. Os estudos anteriores que consideraram a influência da MBL ao tipo de resposta à terapia combinada para o HCV não são conclusivos. Naito *et al.* (2005), não encontraram relação significativa entre resposta sustentada e não sustentada com a mutação 54<sup>15</sup>.

Foi observado por Matsushita *et al.* (1998), que indivíduos japoneses com resposta não sustentada ao tratamento da infecção por HCV apresentaram uma frequência da mutação do alelo 54 mais elevada ( $p=0.036$ ), sugerindo que deficiência de MBL pode interferir com a resposta ao tratamento desta hepatite com IFN ou IFN/RIBA<sup>14</sup>. Kilpatrick *et al.* (2003) não observaram relação do tipo de resposta ao tratamento da infecção por HCV e o nível sérico da MBL<sup>16</sup>. O consumo de C4 via MBL foi relatado como associado a uma resposta virológica pior, sugerindo impedimento à ação das drogas<sup>29</sup>. É possível que os alelos selvagens do *MBL2* favorecendo inflamação hepática poderiam estar associados a este fato. Estes estudos não podem ser comparados diretamente, pois correlacionam parâmetros diferentes para

demonstrar a influência da MBL na resposta ao tratamento medicamentoso do HCV, tais como: níveis séricos de MBL, polimorfismo do *MBL2*, o consumo de C4 mediado por MBL e tratamento com IFN isolado, associado à RIBA na sua forma peguilada ou natural.

Concordando com a maioria dos relatos, o presente estudo não mostrou associação entre o polimorfismo genético do *MBL2* e a resposta ao tratamento padrão de HCV. Encontramos uma frequência alélica e genotípica do polimorfismo do *MBL2*, responsáveis por níveis séricos diminuídos de MBL, maior, embora não significante, nos pacientes respondedores do que nos não respondedores. Estes achados concordam com o estudo realizado, por Segat et al. (2007), na mesma região<sup>18</sup> quanto maior frequência alélica e genotípica do polimorfismo da *MBL2* nos pacientes respondedores virológico ao tratamento combinado. Estes estudos são semelhantes embora com importantes diferenças. O grupo controle do presente estudo foi de doadores de sangue e os pacientes tinham que ter terminado o tratamento farmacológico para serem classificados em respondedores ou não respondedores. O outro estudo não especificou a origem do grupo controle utilizado e considerou a resposta virológica na 12ª semana de tratamento para classificar os pacientes em respondedores recentes e não respondedores e concluiu que a MBL poderia influenciar a resposta ao tratamento padrão do HCV.

Concluimos que o polimorfismo do éxon 1 e do *MBL2* não está associado com a resposta ao tratamento combinado do HCV e, portanto, reposição de MBL não estaria indicada como adjuvante à terapia farmacológica desta patologia. Confirmamos que o genótipo A0 e 00 e o alelo O são fatores de risco para aquisição da infecção pelo HCV no nosso meio, indicando um papel protetor da MBL contra esta infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepatol*, 1999; 6:35-47.
2. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of Hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 215-229.
3. Glue P, Fang JW, Rouzier-Panis R, Raffanel C, Sabo R, Gupta SK, et al. Pegylated interferon- $\alpha$ 2b: pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data. Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Clin pharmacol ther*, 2000; 68:556-567.
4. Björnsson E, Angulo P. Hepatitis C and steatosis. *Arch Med Res* 2007; 38: 621-627.
5. Szabo G. Pathogenic interactions between alcohol and hepatitis C. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5:86-92.
6. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, Schwaible W, Laursen SB, Poulsen K, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*, 1997; 386: 506-510. Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. Mannose-binding lectin deficiency revisited. *Mol Immunol* 2003; 40: 73-84.
7. Madsen HO, Satz ML, Høgh B, Svejgaard A, Garred P. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from Southeast Africa and South America. *J Immunol*, 1998; 161: 3169-3175.
8. Eisen DP, Minchinton RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 2003; 37:1496-1505.
9. Kase T, Suzuzi Y, Kawai T, Sakamoto T, Ohtani, K, Eda S, et al. Human mannan-binding inhibits the infection of influenza A virus without complement. *Immunology*, 1999; 97: 385-392. Gerlich WH, Lu X, Heermann KH. Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepatol*, 1993; Suppl 3: S10-14.
10. Cheong JY, Cho SW, Lim SK, Shin DH, Yoon SK, Lee JE, et al. Lack of association between hepatitis B virus infection and polymorphism of mannose-binding lectin in Korean population. *J Korean Med Sci*, 2005; 20: 65-69.
11. Thio CL, Mosbruger T, Astemborski J, Greer S, Kirk GD, O'Brien SJ, et al. Mannose binding lectin genotypes influence recovery from Hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 9192-9196.
12. Cheong WP, To YF, Ip WK, Yuen MF, Poon TP, Wong WH, et al. Mannose-binding lectin in chronic hepatitis B virus. *Hepatology* 2005; 42: 1037-1045.
13. Yuen MF, Lau CS, Lau YL, Wong, WM, Cheng CC, Lai CL. Mannose-binding lectin gene mutations are associated with progression of liver disease in chronic Hepatitis B infection. *Hepatology*, 1999; 29: 1248-1251.
14. Matsushita M, Hijikata M, Ohta Y, Iwata K, Matsumoto M, Nakao K, et al. Hepatitis C virus infection and mutations of mannose-binding lectin gene MBL. *Arch Virol*, 1998; 143: 645-651.
15. Naito M, Matsui A, Inao M, Nagoshi S, Nagano M, Ito N, et al. 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* 2005; 40: 381-388.

16. Kilpatrick DC, Delahooke TE, Koch C, Turner ML, Hayes PC. Mannan-binding lectin and Hepatitis C infection. *Clin Exp Immunol* 2003; 132:92-95.
17. Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, Ohtani K, Suzuki Y, Watanabe Y, et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with Hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenrol*, 2000; 35: 960-965.
18. Segat L, Silva Vasconcelos LR, Montenegro de Melo F, Santos Silva B, Arraes LC, Moura P, et al. Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL2) in Brazilian patients with HCV infection. *Clin Immunol*, 2007; 124: 13-17.
19. Campiotto S, Pinho JRR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 41-49
20. Hladnik U, Braida L, Biniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A, et al.. Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin exp med*, 2002; 2: 105-108.
21. Song le H, Binh VQ, Duy DN, Jülicher S, Bock TC, Luty AJ, Kremsner PG, Kun JF. Mannose-binding lectin gene polymorphisms and hepatitis B virus infection in Vietnamese patients. *Mutat Res* 2003; 28: 119-125.
22. Kim YJ, Leg HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF-Alpha promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum mel genet* 2003; 1: 2541-2546.
23. Pontes GS, Tamegão-Lopes B, Machado LF, Azevedo VN, Ishak MO, Ishak R, et al. Characterization of mannose-binding lectin gene polymorphism among human T-cell lymphotropic virus 1 and 2-infected asymptomatic subjects. *Hum Immunol* 2005; 66:892-896.
24. Arraes LC, de Souza PR, Bruneska D, Castelo Filho A, Cavada Bde S, de Lima Filho JL, et al. A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 gene of HIV-1-infected children.
25. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Quimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 444-461.
26. Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana- Seisdedos F, Casset FL, et al. C-Type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and Transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem* 2004; 30: 32035-32045.
27. Leikina E, Delanoe-Ayari H, Melikov k, Cho MS, Chen A, Waring AJ, et al. Carbohydrate-binding molecules inhibit viral fusion and entry by crosslinking membrane glycoproteins. *Nat immunol*, 2005; 6: 963-964.
28. McHutchison JG, Fried MW. Current therapy for hepatitis C: pegylated interferon and rebavirin. *Clin Liver Dis*, 2003; 7:149-161.
29. Dumestre-Perard C, Ponard D, Drouet C, Leroy V, Zarski JP, Dutertre N, et al. Complement C4 monitoring in the follow-up of chronic hepatitis C treatment. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 131-136.

**Tabela- 1.** Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo do éxon 1 do gene *MBL2* em indivíduos saudáveis e pacientes infectados com o vírus da hepatite C (HCV).

| Alelo<br><i>MBL2</i>    | Voluntários sem<br>HCV | HCV                 |
|-------------------------|------------------------|---------------------|
| A                       | 0,79<br>(367/464)      | 0,68<br>(220/324)   |
| O                       | 0,21<br>(97/464)       | 0,32*<br>(104/324)  |
| Genótipo<br><i>MBL2</i> |                        |                     |
| AA                      | 0,62<br>(145/232)      | 0,48<br>(77/162)    |
| AO                      | 0,33<br>(77/232)       | 0,41<br>(67/162)    |
| OO                      | 0,05<br>(10/232)       | 0,11**<br>(18/162)  |
| AO/OO                   | 0,38<br>(87/232)       | 0,52***<br>(85/162) |

\*  $p = 0,0005$ ; IC (1,28 – 2,5) OR 1,79 frequência dos alelos A e O em HCV vs Voluntários saudáveis.

\*\*  $P = 0,0045$  ; IC (1,40 – 8,61) OR 3,39 frequência dos genótipos OO e AA em indivíduos saudáveis vs HCV.

\*\*\* $p = 0,0044$ ; IC (1,2 – 2,82) OR 1,84 frequência dos genótipos AO/OO e AA em indivíduos saudáveis vs HCV.

**Tabela 2.** Distribuição do polimorfismo do éxon 1 do gene do *MBL2* em pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento pelo HCV com IFN $\alpha$ -peg/RIBA.

| Genotipo<br><i>MBL2</i> | Respondedor | Não-Respondedor | Total     |
|-------------------------|-------------|-----------------|-----------|
| AA                      | 14          | 17              | 31        |
| AO                      | 18          | 8               | 26        |
| OO                      | 5           | 3*              | 8         |
| AO/OO                   | 23          | 11**            | 34        |
| <b>Total</b>            | <b>37</b>   | <b>28</b>       | <b>65</b> |

AA vs OO      \* $p = 0,3168$    OR 2,02, IC = 0,32 – 15,0

AA vs AO/OO \*\* $p = 0,1146$    OR 2,54, IC = 0,83 – 7,87

## 4.2 Artigo II

O artigo científico gerado por esta pesquisa será enviado a revista Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia o qual foi redigido de acordo com as normas especificadas no endereço eletrônico do próprio periódico. <http://www.scielo.br/revistas/abem/iaboutj.htm> (ANEXO C).

***Artigo II – Hepatite C e marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana:  
Fatores virológicos e os relacionados à terapia combinada com  
interferon alpha peguilado e ribavirina***

ISSN 0004-2730 *versão impressa*

ISSN 1677-9487 *versão online*

*Federação Brasileira de Sociedades de Endocrinologia e Metabologia*

Rua Botucatu, 572, Conjunto 83

040023-062 São Paulo Brazil

Tel.: +55 11 5575-0311

Fax: +55 11 5549-9089

# HEPATITE C E MARCADORES SOROLÓGICOS DE AUTOIMUNIDADE TIREOIDIANA: FATORES VIROLÓGICOS E OS RELACIONADOS À TERAPIA COMBINADA COM INTERFERON ALPHA PEGUILADO E RIBAVIRINA

**Hepatitis C and serologic markers of thyroid autoimmunity: virologic factors and the ones related to the combined therapy with pegylated interferon alpha plus ribavirin**

*Francisco M. Melo<sup>1,2</sup>; Luydson R.S. Vasconcelos<sup>2</sup>; Patricia Moura<sup>2</sup>; Socorro M. S. V. Cavalcanti<sup>2</sup>; Leila L.M.M.B. Pereira<sup>3,4</sup>; Heloísa Ramos<sup>1</sup>*

Deptº de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

1. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco – ICB/UPE
2. Deptº de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de Pernambuco – FCM-UPE
3. Instituto do Fígado de Pernambuco – IFP/PE, Brasil

Endereço para correspondência

Francisco Montenegro de Melo

Rua Amaro Bezerra, 584 Derby

52010-150 - Recife, PE, Brasil

E-mail: francisco.montenegro@ig.com.br

Título resumido: Autoimunidade tireoideana e HCV

## RESUMO

A infecção pelo HCV e seu tratamento com interferon alpha peguilado e ribavirina são relacionados aos marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana. O presente estudo tem como objetivo estudar a associação entre o HCV, seu tratamento e genótipos com marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana (AAT). Pacientes e controles foram testados para anticorpos anti-peroxidase tireoidiana e anti-tireoglobulina. Os pacientes foram atendidos no serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. A frequência de AAT foi de 11,1% nos pacientes (n= 162) e de 2,4% nos voluntários (n= 124). Esta frequência foi de 11,8% (n= 13) nos pacientes após o tratamento e de 9,8% (n= 5) nos não tratados. Estes dados mostraram uma correlação quando, pacientes tratados ( $p = 0,01$ ; OR 5,35; IC 1,41-9,89) e sem tratamento ( $p=0,0474$ ; OR 4,38; IC 0,81-29,08) foram comparados com voluntários. Comparando os grupos de pacientes, não encontramos diferenças nas frequências de AAT ( $p=0,928$ ; OR 1,22; IC 0,38-4,63). A chance do genótipo 1 do HCV esteja relacionado a AAT foi 3,42 vezes maior do que o somatório dos outros genótipos. O HCV parece ser um fator importante no desenvolvimento de autoimunidade tireoidiana, independente da terapia combinada.

Descritores: hepatite C, marcadores sorológicos, autoimunidade tireoideana, interferon peguilado, ribavirina.

**ABSTRACT**

The HCV infection and its therapy with pegylated interferon alpha plus ribavirin are related with serologic markers of thyroid autoimmunity (AAT). We aim of this study the association between the HCV, its therapy and its genotypes with AAT. Patients and controls were tested to thyroid anti-peroxidase antibodies and anti-thyroglobulin. The patients were from Hospital Universidade de Pernambuco. The occurrence of AAT was of 11,1% at the patients (n= 162) and of 2,4% at the volunteers (n=124). This occurrence was of 11,8% (n=13) at the patients after the therapy and of 9,8% (n=5) in the untreated group . Data showed a significant correlation when treated (p= 0,01; OR 5,35; IC 1,41-9,89) and untreated patients (p=0,474; OR 4,38; IC 0,81-29,08) were compared with health persons. No significant differences were found in the positivity to AAT (p=0,928; OR 1,22; IC 0,38-4,63), when the groups of patients were compared. The chance that genotype 1 of the HCV can be related to development of AAT was 3,42 times greater than the swum of others genotypes. Then, HCV seems to be an important factor to the development of thyroid autoimmunity, independently of the combined therapy.

Keywords: hepatitis C, serological markers, thyroid autoimmunity, pegylated interferon, ribavirin

## INTRODUÇÃO

Desenvolvimento de autoimunidade ou de seus marcadores sorológicos em pacientes com hepatite C crônica (HCV) é relatado com frequência e aparentemente não estão associados com o genótipo viral. Os autoanticorpos mais frequentemente detectados são anticorpos anti-músculo liso (SMA), anti-nuclear (ANA), anti microssomal de fígado/rim (LKM), fator reumatóide, anti-cardiolipina e anti-tireoidianos. Uma maior prevalência de doenças autoimunes nos pacientes com HCV ocorre mesmo na ausência de autoanticorpos prévios<sup>1-2</sup>. Vários mecanismos foram relatados como causa de associação de HCV com autoimunidade, como: potente linfotropismo viral, maior resistência de células B CD5+ infectadas a apoptose, heterogeneidade genética do vírus e presença no vírus de antígeno semelhante aos do hospedeiro<sup>3</sup>.

Os anticorpos anti-tireoideanos (AAT), anti-tireoglobulina (anti-Tg) e anti-peroxidase tireoidiana (anti-TPO), particularmente o último, são muito prevalentes nos indivíduos com HCV estando presentes em 5,2% a 12,5% destes pacientes<sup>4</sup>. Muitos pacientes com AAT desenvolvem disfunção tireoidiana, principalmente hipotireoidismo<sup>5</sup>. Foi demonstrado que o HCV possui seqüências de aminoácidos similares às encontradas nos antígenos tireoidianos, tireoglobulina e peroxidase tireoidiana<sup>6</sup>.

Está bem estabelecido que a combinação de interferon alfa peguilado com ribavirina (IFN $\alpha$ -peg/RIBA) eleva a cura virológica para aproximadamente 50%, tornando-se o tratamento de escolha para pacientes com o HCV como terapia primária<sup>7</sup>. Efeito terapêutico da terapia antiviral combinada em infecção pelo HCV é relacionado à sua ação imunomodulatória, determinando uma resposta tipo Th1 crítica no controle da infecção pelo HCV. Falha na resposta Th1 é um importante indicador de progressão desta infecção<sup>8</sup>. Contudo, resposta tipo 1 é importante fator para o desenvolvimento e manutenção de doenças autoimunes órgão específicas<sup>9</sup>.

O IFN- $\alpha$  associado ou não à RIBA possui efeitos colaterais incluindo desenvolvimento de AAT e disfunções tireoidianas, sendo as últimas mais frequentes nos pacientes com AAT positivos antes do tratamento. A maioria dos pacientes, no entanto, reverte para o eutireoidismo após o tratamento, embora existam relatos de que alguns pacientes permanecem doentes<sup>10</sup>. Existem evidências de que a adição de RIBA ao tratamento de HCV não modifica a ocorrência dos AAT, embora cause hipotireoidismo mais frequentemente<sup>11</sup>. Pacientes que não desenvolvem anticorpos com o tratamento com IFN- $\alpha$  isoladamente, também não desenvolvem AAT no curso de um segundo tratamento com IFN- $\alpha$  apenas ou em associação à RIBA, sugerindo que possa ocorrer uma pré-disposição genética importante no desenvolvimento de autoimunidade induzida por citocinas<sup>11</sup>. Muitos dos estudos que

demonstraram a associação de tratamento do HCV e desenvolvimento de AAT ou disfunção tireoidiana utilizaram monoterapia com IFN- $\alpha$  na forma não peguilada. Than *et al.* (2007) compararam a influência dos dois esquemas terapêuticos, IFN- $\alpha$ /RIBA e IFN $\alpha$ -peg/RIBA e não encontram diferença no desenvolvimento da disfunção tireoidiana no tratamento de HCV<sup>12</sup>. O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de AAT em indivíduos infectados com o HCV submetidos ao primeiro esquema terapêutico com IFN $\alpha$ -peg/RIBA ou sem tratamento e comparar com grupo controle de indivíduos saudáveis, e também foi analisado a influência do genótipo viral e do tratamento no desenvolvimento AAT.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra utilizada neste estudo foi composta de 162 pacientes atendidos no serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE) e de um grupo controle composto por 124 indivíduos saudáveis doadores de sangue, sem HCV (Grupo C). Considerando os pacientes, 111 deles foram tratados para infecção pelo HCV por 6 ou 12 meses com IFN $\alpha$ -peg/RIBA (Grupo A) e 51 eram de pacientes virgens de tratamento viral específico (Grupo B). Todos os pacientes foram diagnosticados como tendo o HCV pela pesquisa de anticorpos por análise imunoenzimática (EIA) positiva confirmada por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para HCV-RNA. Todos os indivíduos participantes do estudo foram soronegativos para HIV e HBV.

Todos os sujeitos do estudo foram testados para AAT por quimioluminescência (Roche®), considerando os níveis séricos de anti-TPO >34 e de anti Tg >115 UI/mL como positivo, seguindo a orientação do fabricante dos “kits”, para anti-TPO e anti-Tg, respectivamente. Os pacientes do Grupo B foram testados após a primeira consulta no serviço, os do Grupo A após o término dos medicamentos específicos e os do Grupo C, os voluntários, foram testados após a assinatura do termo de consentimento. O projeto da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco (CEPE-UPE) sob o protocolo nº UPE 090/04. O número de participantes para o estudo foi calculado considerando uma frequência de AAT de 2% na população e de 12% nos indivíduos com HCV, conforme dados publicados<sup>4</sup> (4). No processamento dos dados foi considerado um poder de teste de 80%, um intervalo de confiança de 95% e  $p < 0.05$ . Frequências entre os grupos foram comparadas pelo Chi-quadrado ( $\chi^2$ ).

## RESULTADOS

A amostra utilizada no presente estudo foi composta de 21 indivíduos (7,3%) com positividade para AAT, sendo 13 (11,8%), 5 (9,8%) e 3 (2,4%) indivíduos do grupo A, B e C, respectivamente. Na distribuição dos indivíduos segundo o sexo, não se verificou diferenças importantes entre os grupos A (53 M, 58 F), B (35 M, 29 F) e C (88 M, 87 F).

Na distribuição dos sujeitos por faixa etária, a idade variou no grupo A entre 27 e 72 anos, sendo a média foi de 52 anos. A idade média dos AAT positivos do grupo A foi de 53 anos enquanto que esta foi de 56 anos nos indivíduos com AAT negativos. A idade média dos pacientes do grupo B foi de 52 anos, variando de 22 a 71 anos, sendo que a média foi de 58 anos e 51 anos nos pacientes com AAT positivo e negativo respectivamente. No Grupo C, a idade média foi de 34 anos, variando de 18 anos a 55 anos, sendo a média de idade de 42 anos e 33,5 anos para os indivíduos positivos e negativos para AAT, respectivamente.

Observamos uma associação entre pacientes infectados pelo HCV (grupos A+B,  $n=162$ ), ( $p=0,021$ , IC 11-23,75), o grupo de pacientes tratados (A,  $n=111$ ), ( $p < 0,01$ , IC 1,41-29,89) e o grupo dos virgens de tratamento (B,  $n=51$ ), ( $p= < 0,047$ , IC 0,81-29,08) e a presença de AAT, quando comparado com o grupo C, dos voluntários sadios ( $n=124$ ); embora esta associação não foi evidenciada quando comparamos os pacientes tratados (grupo A) e os não tratados (grupo B) ( $p=0,93$  OR 1,22 ; IC 0,38-4,63 ) (Tabela 1).

A presença de AAT não foi mais freqüente nos indivíduos com o HCV do sexo feminino ( $p=0,80$ , OR 2,91, IC 0,91-10,9 (Tabela 2). A genotipagem do HCV disponível foi de 87 e 47 pacientes, tratados e virgens de tratamento, respectivamente. A freqüência do genótipo 1 foi de 65% ( $n=78$ ) e do genótipo 3 de 35% ( $n=41$ ). AAT foi positivo em 13 pacientes do genótipo 1, contrastando com 2 pacientes AAT positivos infectados pelo genótipo b ( $p=0,14$  OR 3,42, IC 0,71-32,4) (Tabela 3).

## DISCUSSÃO

Desordens tireoidianas ocorrem freqüentemente nos pacientes com HCV tratados ou não com IFN- $\alpha$ /RIBA<sup>11,13</sup>. Positividade para AAT com função tireoidiana normal é o achado mais comum<sup>14</sup>. A prevalência de AAT no presente estudo é concordante com o encontrado em diferentes estudos<sup>14,15,16</sup>, o que é explicado pela origem étnica, idade e sexo das populações estudadas. Um estudo realizado em nossa região por Paraná et al.<sup>17</sup> evidenciou AAT em 3,6 % dos pacientes em HCV virgens de tratamento, dado diferente do encontrado neste estudo. Diferenças nas freqüências de AAT podem ser relacionadas à metodologia e ponto de corte, utilizados nos testes.

O risco de se encontrar AAT é maior em mulheres e aumenta com a idade. Mulheres são mais susceptíveis do que homens para desenvolver doença tireoidiana induzida pelo

tratamento de HCV, tendo um risco relativo de até 7 vezes maior do que os homens<sup>18,19</sup>. Embora alguns estudos não confirmem este achado<sup>11,20</sup>. O presente estudo não confirmou que o sexo feminino é um fator de risco importante para o desenvolvimento de AAT nos pacientes com o HCV tratados ou não. Na nossa série, considerando toda a população de pacientes, 13% das mulheres foram AAT positivos e 5% dos homens, diferença não significativa. Este estudo sugere que em nossa população, o HCV pode ser um fator ambiental responsável por quebrar a tolerância imunológica igualmente em ambos os sexos.

O risco de desenvolver disfunção tireoidiana durante o tratamento de HCV é associado fortemente à presença preexistente de AAT. Koh et al, em uma meta-análise demonstraram que 50% dos pacientes com Anti-TPO antes do tratamento com IFN- $\alpha$  desenvolvem disfunção em comparação com 5,4% dos pacientes sem Anti-TPO<sup>21</sup>. Evidenciamos 9,8 % (n=5) dos pacientes não tratados, com AAT positivos, sugerindo que estes anticorpos devem ser pesquisados antes do início do tratamento dos pacientes com o HCV e a função tireoidiana monitorada durante tal tratamento nos casos positivos.

Na literatura, dados relativos à imunidade tireoidiana induzida pelo tratamento do HCV são controversas. Diferentes estudos relatam à recuperação completa alguns meses após a retirada do tratamento. Enquanto, outros demonstraram que autoimunidade tireoidiana induzida pelo tratamento de HCV não é um fenômeno completamente reversível e que alguns pacientes desenvolvem tireoidite crônica<sup>11,14,18,22,23</sup>. No presente estudo, embora, tenha sido encontrado uma chance maior dos indivíduos tratados do HCV serem AAT positivos, do que os virgens de tratamento (OR 5.35 vx OR 4.38) respectivamente, não foi evidenciado diferença quando comparado a frequência de AAT positivo entre estes dois grupos, sugerindo que elevadas frequências de AAT desenvolvidas durante o tratamento de HCV descritas na literatura<sup>24</sup> são, em parte, reversíveis.

Reversibilidade completa de casos de hipotireoidismo autoimune severo induzido por IFN- $\alpha$  são descritos, sugerindo que os indivíduos que não reverterem são geneticamente predispostos a desenvolver autoimunidade tireoidiana e que tratamento é apenas um fator desencadeante. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que pacientes que não desenvolvem autoimunidade tireoidiana no início do tratamento do HCV, não a desenvolvem no futuro ou com o re-tratamento<sup>4,11</sup>.

A infecção pelo HCV pode ser responsável pelo desenvolvimento de autoimunidade tireoidiana. Esta hipótese é sustentada que o HCV poder afetar o tecido tireoidiano levando a modificação de sua estrutura, expondo auto-antígenos e conseqüentemente à autoimunidade<sup>6,18</sup>. Positividade para AAT é muito maior nos pacientes infectados pelo HCV do que nos infectados pelo vírus da Hepatite B (HBV)<sup>18,25</sup>. Foi demonstrado que o HCV

compartilha seqüências de aminoácidos com proteínas encontradas no tecido tireoidiano<sup>12</sup>. Os dados do presente estudo mostraram uma diferença na frequência de AAT nos pacientes virgens de tratamento quando comparamos com a população de voluntários sádios ( $p=0,0474$ ; OR 4.38) (Tabela 1).

O fato de não encontrarmos diferença entre a presença de AAT nos nossos pacientes em relação ao sexo, provavelmente deve-se ao fato da autoimunidade ser um fenômeno multifatorial causado por susceptibilidade genética e fatores ambientais. Podemos especular que o HCV atua quebrando a tolerância imunológica, em homens e mulheres, da mesma maneira, já que as doenças autoimunes da tireóide serem mais frequentes em mulheres do que em homens em pacientes sem infecção pelo HCV<sup>4</sup>.

O genótipo do HCV não é relacionado com disfunção tireoidiana ou a AAT<sup>27</sup>. Este achado também foi observado no presente estudo embora, encontramos que o genótipo 1 tem chance 3,42 vezes maior de está relacionado com AAT do que o conjunto dos outros genótipos (Tabela 3). Frequência do genótipo 1 na nossa população de pacientes de 65% é similar a encontrada em outros estudos brasileiros<sup>28</sup>.

A duração do tratamento com IFN- $\alpha$  é relacionado com o desenvolvimento de disfunção tireoidiana, incluindo AAT<sup>26,27</sup>. O que explicaria uma maior chance de pacientes com o genótipo 1 de desenvolver AAT encontrada neste estudo. O genótipo 1 é tratado por tempo mais prolongado e responde pior do que os outros genótipos<sup>7</sup>.

Os dados encontrados no presente estudo permite sugerirmos que o HCV pode ser um dos fatores desencadeantes de AAT independente da terapia com IFN $\alpha$ -peg/RIBA. AAT que se desenvolvem durante o tratamento do HCV são, em parte, transitórios. Pesquisa de AAT deve ser realizada rotineiramente em todos pacientes com o HCV, independente de sexo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wasmuth HE, Stolte C, Geier A, Dietrich CG, Gartung C, Lorenzen J, et al. The presence of non-organ-specific autoantibodies is associated with a negative response to combination therapy with interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C. **BMC Infect Dis** 2004;4:4. Published online, feb.13
2. Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. **J Hepatol** 1999;31 (suppl.1):39-42.
3. Kessel A, Toubi E. Chronic HCV-related autoimmunity: a consequence of viral persistence and Lymphotropism. **Curr Med Chem** 2007;14:547-54.
4. Pateron D, Hartmann DJ, Duclos-Vallec JC, Jouanolle H, Beaugrand M. Latent autoimmune thyroid disease in patients with chronic HCV hepatitis. **J Hepatol** 1992; 16:244-5.
5. Ganne-Carrie N, Medini A, Coderc E, Seror O, Christidis C, Grimbirt S, et al. Latent autoimmune thyroiditis in untreated patients with HVC chronic hepatitis: a case-control study. **J Autoimmun** 2000;14:189-93.
6. Hsieh MC, Yu ML, Chuang WL, Shin SJ, Dai CY, Chen SC, et al. Virologic factors related to interferon-alpha-induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. **Eur J Endocrinol** 2000;142:431-7.
7. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon-alpha-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Grup. **N Engl J Med** 1998;19:1485-92.
8. Miyatake H, Kanto T, Inoue M, Sakakibara M, Kaimori A, Yakushijin T, et al. Impaired ability of interferon-alpha-primed dendritic cells to stimulate th1-type CD4 T-cell response in chronic hepatitis C virus infection. **J Viral Hepat** 2007;14:404-91.
9. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. **Immunol Today** 1995;16:34-8.
10. Kee KM, Lee CM, Wang JH, Tung HD, Changchien CS, Lu SN, et al. Thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C receiving a combined therapy of interferon and ribavirin: incidence, associated factors and prognosis. **J Gastroenterol Hepatol** 2006;21:319-26.
11. Carella C, Mazziotti G, Morisco F, Rotondi M, Cioffi M, Tuccillo C, et al. The addition of ribavirin to interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus-related chronic hepatitis does not modify the thyroid autoantibody pattern but increases the risk of developing hypothyroidism. **Eur J Endocrinol** 2002;46:743-9.
12. Than HA, Attia JR, Jones TL, Batey RG. Pegylated interferon- $\alpha 2\beta$  in combination with ribavirin does not aggravate thyroid dysfunction in comparison to regular interferon- $\alpha 2\beta$  in hepatitis C population: meta-analysis. **J Gastroenterol Hepatol**. 2007;22:472-6.
13. Prummel MF, Lauberg P. Interferon-alpha and autoimmune thyroid disease. **Thyroid** 2003;13:547-51.
14. Marazuela M, García-Buey L, González-Fernández B, García-Monzón C, Arranz A, Borque MJ, et al. Thyroid autoimmune disorders in patients with chronic hepatitis C before and during interferon-alpha therapy. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1996;44:635-42.

15. Rocco A, Gargano S, Provenzano A, Nordone M, De Sanctis GM, Altavilla N, *et al.* Incidence of autoimmune thyroiditis in Interferon-alpha treated and untreated patients with chronic hepatitis C virus infection. **Neuro Endocrinol Lett** **2001**;22:39-44.
16. Ward DL, Bing-You RG. Autoimmune thyroid dysfunction induced by interferon-alpha treatment for chronic hepatitis C: screening and monitoring recommendations. **Endocr Pract** **2001**;7:52-8.
17. Paraná R, Cruz M, Santos-Jesus R, Ferreira K, Codes L, Cruz T. Thyroid disease in HCV carriers undergoing antiviral therapy with interferon plus ribavirin. **Braz J Infect Dis** **2000**;4:284-90.
18. Fernandez-Sato L, Gonzalez A, Escobar-Jimenez F, Vazquez R, Ocete E, Olean N, *et al.* Increased risk of autoimmune thyroid disease in hepatitis C vs hepatitis B before, during, and after discontinuing interferon therapy. **Arch Intern Med** **1998**; 158:1445-8.
19. Okanoue T, Sakamoto S, Itoh Y, Minami M, Yasui K, Sakamoto M, *et al.* Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. **J Hepatol** **1996**; 25:283-91.
20. Roti E, Minelli R, Giuberti T, Marchelli S, Schianchi C, Gardini E, *et al.* Multiple changes in thyroid function in patients with chronic active HCV Hepatitis treated with recombinant interferon-alpha. **Am J Med** **1996**;101:482-7.
21. Koh LK, Greenspan FS, Yeo PP. Interferon-alpha induced thyroid dysfunction: Thee clinical presentations and review of the literature. **Thyroid** **1997**;7: 891 -6.
22. Imagawa A, Itoh N, Hanafusa T, Oda Y, Waguri M, Miyagawa J, *et al.* Autoimmune endocrine disease induced by recombinant interferon-alpha therapy for chronic active type C hepatitis. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**;80:922-6.
23. Baudin E, Marcellin P, Pouteau M, Colas-Linhart N, Le Floch JP, Lemmonier C, Reversibility of thyroid dysfunction induced by recombinant alpha interferon in chronic hepatitis C. **Clin Endocrinol (Oxf)** **1993**;39:657- 61.
24. Morisco F, Mazziotti G, Rotondi M, Tuccillo C, Iasevoli P, Del Buono A, *et al.* Interferon-related thyroid autoimmunity and long-term clinical outcome of chronic hepatitis C. **Dig Liver Dis** **2001**;33:247-53.
25. Preziati D, La Rosa L, Covini G, Marcelli R, Rescalli S, Persani L, *et al.* Autoimmunity and thyroid function in patients with chronic active hepatitis treated with recombinant interferon alpha-2a. **Eur J Endocrinol** **1995**;132:587-93.
26. Jacobs EL, Clare-Salzler MJ, Chopra IJ, Figlin RA. Thyroid function abnormalities associated with the chronic outpatient administration of recombinant interleukin-2 and recombinant interferon-alpha. **J Immunother** **1991**;10:448-55.
27. Kryczka W, Brojer E, Kowalska A, Zarebska-Michaluk D. Thyroid gland dysfunction during antiviral therapy of chronic hepatitis C. **Med Sci Monit** **2001**;7 suppl 1:221-5.
28. Silva LK, Silva MB, Rodart IF, Lopes GB, Costa FQ, Melo ME, *et al.* Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Braz J Med Biol Res.** **2006**;39:595-602.

**Tabela 1.** Distribuição dos indivíduos investigados segundo resultado das pesquisas de anticorpos anti-tireoidianos.

| Resultado do AAT | Grupo A |      | Grupo B |      | Grupo C |      |
|------------------|---------|------|---------|------|---------|------|
|                  | n       | %    | n       | %    | n       | %    |
| Positivo         | 13      | 11,7 | 5       | 9,8  | 3       | 2,4  |
| Negativo         | 98      | 88,3 | 46      | 90,2 | 121     | 97,6 |
| Total            | 111     | 100  | 51      | 100  | 124     | 100  |

AAT= anticorpos anti-tireoidianos

Grupo A = Pacientes tratados com IFN $\alpha$ -peg/RIBA

Grupo B = Pacientes virgens de tratamento

Grupo C = Voluntários sádios

A vs B  $p=0,9885$ , OR 1,22, IC 0,38-4,63

A/B vs C  $p=0,01$ , OR 5,04, IC 1,42-27,23

A vs C  $p=0,010$ , OR 5,35, IC 1,41-29,89

B vs C  $p=0,047$ , OR 4,38, IC 0,81-29,08

**Tabela 2.** Distribuição dos indivíduos com o HCV segundo o genótipo viral e positividade para anticorpos anti-tireoidianos.

| Genótipo<br>HVC | Anticorpos anti-tireoideano |      |          |      | Total | %   |
|-----------------|-----------------------------|------|----------|------|-------|-----|
|                 | Positivo                    | %    | Negativo | %    |       |     |
| 1/1a/b/c        | 13                          | 86,6 | 78       | 65,5 | 91    | 68  |
| 3/3a/3c         | 2                           | 13,4 | 41       | 34,5 | 43    | 32  |
| Total           | 15                          | 100  | 119      | 100  | 134   | 100 |

$p= 0,14$ , OR **3,42**, IC **0,71- 3,24**

**Tabela 3.** Distribuição dos indivíduos tratados e virgens de tratamento para HCV segundo o sexo e a positividade para anticorpos antitireoideanos.

| Sexo      | Anticorpos antitireoideanos |     |          |      | Total | %   |
|-----------|-----------------------------|-----|----------|------|-------|-----|
|           | Positivo                    | %   | Negativo | %    |       |     |
| Feminino  | 13                          | 72  | 68       | 47,2 | 81    | 49  |
| Masculino | 5                           | 28  | 76       | 52,8 | 83    | 51  |
| Total     | 18                          | 100 | 144      | 100  | 162   | 100 |

AAT= ANTICORPOS ANTI-TIREOIDIANOS

p= **0,0801**; OR **2,91**, IC **0,91 – 10,9**

### 4.3 Comunicação Breve

A comunicação breve gerada por esta pesquisa será enviada à revista *Journal of Human Genetics* a qual foi redigida de acordo com as normas especificadas no endereço eletrônico do próprio periódico.

<http://www.springer.com/west/home?SGWID=4-102-70-1125728>

0&changeHeader=true&SHORTCUT=www.springer.com/10038 (ANEXO D)

***Comunicação Breve*** – Polimorfismo do éxon 1 do gene da lecitina ligadora de manose (MBL2) em pacientes com HCV portadores de marcador sorológico de autoimunidade tireoidiana.

**POLIMORFISMO DO ÉXON 1 DO GENE DA LECTINA LIGADORA DE MANOSE (MBL2) EM PACIENTES COM HCV PORTADORES DE MARCADOR SOROLÓGICO DE AUTOIMUNIDADE TIREOIDIANA.**

*Francisco Montenegro de Melo<sup>1,2</sup>, Luydson Vasconcelos<sup>2</sup>, Patricia. Moura<sup>1</sup>, Maria do Socorro Cavalcanti<sup>1</sup>, Leila Beltrão Pereira<sup>3</sup>, Heloísa Ramos Lacerda<sup>1</sup>*

1. Deptº de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
2. Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Pernambuco – ICB/UPE
3. Deptº de Clínica Médica – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade de Pernambuco – FCM-UPE
4. Instituto do Fígado de Pernambuco – IFP/PE, Brasil

Endereço para correspondência

Francisco Montenegro de Melo

Rua Amaro Bezerra, 584 Derby

52010-150 - Recife, PE, Brasil

E-mail: francisco.montenegro@ig.com.br

## RESUMO

O polimorfismo do éxon 1 do gene da lectina ligadora de manose (*MBL2*) está associado às doenças auto-imunes. Anticorpos anti-tireoidianos (AAT) são mais prevalentes nos pacientes com infecção por HCV. Investigamos a associação do polimorfismo do *MBL2* com AAT em 162 pacientes brasileiros com HCV e 124 voluntários sadios. Os pacientes foram atendidos no Serviço de Gastrohepatologia Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. Os voluntários foram selecionados em banco de sangue. Os pacientes apresentaram 11,1% de positividade para AAT, enquanto nos indivíduos sádios este percentual foi de 2,4% ( $p=0,021$ ). A frequência do polimorfismo para *MBL2* foi mais alta nos pacientes com o HCV do que nos indivíduos sádios ( $p=0,01$ ; OR= 4,44; IC 0,56-10,06). Os pacientes infectados pelo HCV e AAT positivos ( $n=18$ ) apresentaram uma elevada frequência do polimorfismo do *MBL2* (22%), quando comparados com aqueles sem AAT (10%) ( $n=144$ ), entretanto, esta diferença não foi significativa ( $p=0,1196$ ; OR 2,65; IC 0,56 – 10,06). O polimorfismo do gene *MBL2* parece não está associado ao desenvolvimento de AAT nos pacientes com o HCV, entretanto, devido ao reduzido número de pacientes infectados e com AAT positivo ( $n=18$ ) esta observação não pode ser considerada definitiva, sendo necessários mais estudos para se estabelecer o papel do polimorfismo do *MBL2* no desenvolvimento de AAT nos pacientes com o HCV.

Palavras chaves: Hepatite C, lectina ligadora de manose, polimorfismo

**ABSTRACT**

The polymorphisms of the *MBL2* gene have been associated with auto-immune diseases. Anti thyroid antibodies (AAT) are more prevalent in HCV patients. We studied the association of *MBL2* polymorphisms with AAT in 162 Brazilian HCV patients and 124 health volunteers. The patients were attended at the Gastrohepatology Department of University Hospital Oswaldo Cruz of the University of Pernambuco. The volunteers were selected in blood bank. The HCV patients showed 11,1% of positivity to AAT while in health persons was 2,4% ( $p=0,021$ ). The frequency of *MBL2* polymorphisms were higher in the HCV patients than in volunteers ( $p=0,01$ ; OR=4,44; IC= 1,37-8,67). Patients with HCV and AAT positive ( $n=18$ ) showed high frequency of polymorphism *to MBL2*, compared with AAT negative ones although there was no significance ( $p=0,1196$ ; OR= 2,65; IC 0,56 – 10,06). *MBL2* gene structural polymorphism seems to be not associated with the development of AAT in patients with or without treatment to HCV. However as the number of patients is small at the HCV and AAT group ( $n=18$ ) this observation could not be considered a definitive one. It is necessary more studies to establish the real role of *MBL2* polymorphism to the development of AAT in HCV patients.

Keywords: Hepatic C, Mannan binding lectin, polymorphism.

## INTRODUÇÃO

Apoptose é um processo fisiológico que permite a renovação celular. Quando células apoptóticas ou restos celulares expondo autoantígenos não são fagocitados podem ativar clones de células auto-reativas resultando em doenças autoimunes (Herrera-Esparza *et al.* 2007). Foi demonstrado *in vivo* e *in vitro* que a MBL está envolvida no processo de depuração de restos celulares e células apoptóticas. Redistribuição dos carboidratos na membrana das células apoptóticas permite a ligação da MBL e a posterior opsonofagocitose. Haplotipos responsáveis por níveis séricos diminuídos de MBL predis põem ao desenvolvimento de Lupus Eritematoso Sistêmico (LES) (Garred *et al.* 2001), Síndrome de Sjogren (SS) (Wang *et al.* 2001), Doença Celíaca (DC) (Boniotto *et al.* 2005) e a Dermatomiosite (DM) (Werth *et al.* 2002). Desenvolvimento de autoimunidade ou de seus marcadores sorológicos são freqüentes nos pacientes infectados cronicamente pelo HCV, explicado pelo linfotropismo do vírus, células B infectadas resistentes a apoptose, heterogeneidade genética do vírus e presença de autoantígenos no vírus (Kessel and Toubi 2007). Entre estas, as doenças autoimunes da tireóide ou de seus marcadores são as mais prevalentes. O tratamento com alpha Interferon (IFN- $\alpha$ ) e Ribavirina (RIBA) é fator de risco para o aumento destas prevalências (Liblau *et al.* 1995). O objetivo deste estudo foi investigar a associação entre o polimorfismo do gene *MBL2* e o desenvolvimento de AAT em pacientes tratados ou não para HCV.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi do tipo casos e controles realizados no Serviço de Gastrohepatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. A amostra do estudo foi composta de duzentos e oitenta e seis indivíduos, sendo, cento e sessenta e dois pacientes com o HCV, tratados ou não, e cento e vinte quatro voluntários sadios doadores de sangue. Todos os indivíduos da amostra foram soronegativos para HIV e HBV.

Todos os indivíduos do estudo foram testados para anticorpos anti peroxidase tireoidiana (anti-TPO) e anti tireoglobulina (anti-Tg), por quimioluminescência (Roche®). Considerando os níveis séricos anti-TPO >34 UI e anti Tg >115, como positivo, segundo orientação do fabricante dos “kits”. Todos os participantes do estudo assinaram termo de consentimento em pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Pernambuco (CEPE-UPE) sob o protocolo N° UPE 090/04 .

A genotipagem do Éxon 1 do *MBL2* de todos os indivíduos do estudo foi realizada por Reação em Cadeia pela Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos seguindo protocolo anteriormente desenvolvido (Arraes *et al.* 2006). Este método permite detectar simultaneamente os três polimorfismos estruturais com base nos diferentes comportamentos de dissociação. Os alelos foram designados de 0, quando incluir qualquer alelo variante (52, 54 e 57) ou de A quando for o alelo selvagem.

A frequência dos alelos foi determinada por percentagem e as comparações de frequências entre os grupos foram realizadas pelo Chi-quadrado ( $X^2$ ) e teste exato de Fisher utilizando tabela de contingência 2x2. Todas as análises consideram um  $p < 0.05$  e um poder de estudo de 80%, e foram realizadas utilizando o programa *Epi info 6*.

## RESULTADOS

Na distribuição dos indivíduos segundo o sexo, não verificamos diferenças entre os pacientes e controles: 88 M, 57 F e 88 M e 87 F, respectivamente. Na distribuição dos pacientes por faixa etária, a idade variou no grupo de pacientes entre 22 anos e 72 anos, sendo a média de 52 anos e nos controles, a idade média foi de 34 anos, variando de 18 anos a 55 anos. No grupo de pacientes, dezoito (11,1%) apresentaram positividade para AAT, enquanto nos voluntários, este percentual foi de 2,4% ( $n=3$ ), esta diferença é significativa ( $p=0,021$ ). O genótipo AA/A0 foi encontrado em 14 (77,8%) indivíduos com o HCV e AAT positivos e o genótipo 00 em 4 (22,2%) deles. O genótipo 00 foi encontrado em quatorze (9,7%) pacientes dos cento e quarenta e quatro pacientes com o HCV e AAT negativos. O genótipo AA/A0 foi evidenciado em cento e trinta (90,3%) pacientes com AAT negativos. (Tabela 1).

## DISCUSSÃO

Vários estudos relacionaram polimorfismo de gene de MBL com doenças autoimunes. Uma maior frequência destas mutações foi relatada em diferentes populações com LES. Em meta análise de oito estudos publicados foi demonstrado que a presença de gene minoritário de MBL confere um risco de 1,6 vezes maior de se adquirir LES (Garred *et al.* 2001). É sugerido que no LES a deficiência de MBL pode levar ao acúmulo de restos celulares que serviriam como fonte de auto-antígenos (Seelen *et al.* 2005). A MBL pode ligar-se a molécula de DNA e ter papel na depuração destas moléculas (Palaniyar *et al.* 2004).

Indivíduos com deficiência de MBL podem ser infectados com organismos relacionados ao desenvolvimento de doenças autoimunes como o HCV (Segat *et al.* 2007). Nossa hipótese de que deficiência de MBL causando diminuição da depuração de células apoptóticas

associadas à infecção por HCV poderia causar desenvolvimento de AAT, não foi confirmada. Encontramos uma chance de 2,65% maior de pacientes homozigótico 0 e com o HCV terem AAT. Como as doenças autoimunes da tireóide são doenças heterozigóticas, a contribuição do *MBL2* e do HCV deve ser considerada com outros fatores genéticos e ambientais. Esta associação não é evidente devido, provavelmente, ao tamanho de amostra, indicado pelo IC alargado encontrado e ao desequilíbrio causado pela associação entre HCV e o genótipo A0 do *MBL2* encontrado em nossos pacientes (Segat *et al.* 2007).

O polimorfismo do *MBL2* é associado a fatores fisiopatológicos bem definidos, como a predisposição genética e a ingestão do glúten no desenvolvimento de DC. Nesta doença, Haplotipos do *MBL2* está fortemente associado ao desenvolvimento de outras doenças autoimunes (Boniotto *et al.* 2005).

Pacientes com AR possuem mais frequentemente alelos variantes de MBL. O genótipo 00 presentes nos indivíduos com AR é relacionado com o desenvolvimento de Fator Reumatóide IgM e proteína C reativa (Graudal *et al.* 1998). Estes encontros sugerem que os polimorfismos no éxon 1 do *MBL2* são relevantes na fisiopatologia de AR. Existem evidências que o polimorfismo do *MBL2* é fator de risco para HCV em pacientes do nordeste do Brasil (Segat *et al.* 2007).

Deficiência de MBL, isoladamente não é suficiente para causar doenças autoimunes. A maioria dos indivíduos com o genótipo 00 não adquirem qualquer doença autoimune. Portanto, outros fatores são necessários para que indivíduos 00 ou A0 adquiram estas doenças. Nossos dados indicam que mais estudos são necessários para comprovar a relação de marcadores sorológicos de autoimunidade tireoidiana em pacientes com HCV e o polimorfismo do *MBL2*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arraes LC, de Souza PR, Bruneska D, Castelo Fihlo A, Cavada Bde S, de Lima Filho JL, Crovella S (2006) A cost-effective melting temperature assay for the detection of single-nucleotide polymorphism in the MBL2 of HIV – 1 infection in Brazilian pediatric population. *Braz J Med Biol Res* 39:719-723
- Boniotto M, Braida L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vattas S, Radiollo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, Amoroso A, Crovella S (2005) Evidence of a correlation Between mannose binding lectin and celiac disease: A model for other autoimmune diseases. *J Mol Med* 83:308–315
- Garred P, Voss A, Madson HO, Junker P (2001) Association of mannose-binding lectin gene variation with disease severity and infections in a population-Based Cohort of Systemic Lupus Erythematosus patients (2001) *Gene and Immunun* 2:442–450
- Graudal NA, Homann C, Madson HO, Svejgaard A, Jurik AG, Gradual HK, Garred P (1998) Mannan binding lectin in Rheumatol Arthritis. A longitudinal study. *J Rheumatol* 25:629-635
- Herrera-Esparza R, Herrera-Van-Oostdan D, López-Rubles E, Avalos-Díaz E (2007) The hole of apoptosis in autoantibody production. *Reumatismo* 59:87–99
- Kessel A, Toubi E (2007) Chronic HCV Autoimmunity: A consequence of viral persistence and Lymphotropism. *Curr Med Chem* 14:547-554
- Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO (1995) Th1 e Th2 cells in patogeneris of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16:34-38
- Palaniyar N, Nadesalingam J, Clarck H, Shih MJ, Dodds AW, Reld KB (2004) Nucleic acid is movel ligand for innate immune Pat tern recognition collectins surfactant proteins A and O and mannose-biding lectin. *J Biol Chem* 279:32728–32736
- Seelen MA, Van der Bijl EA, Trouw LA, Zuiverloon TC, Munoz JR. Fallaux–van den Houten FC, Schlagwein N, Daha MR (2005) A role for mannose-binding lectin dysfunction in generation of autoantibodies in systemic Lupus Erythematosus. *Rheumatol* 44:111–119
- Segat L, Vasconcelos LRS, Melo FM, Silva BS, Arraes LC, Moura P, Crovella S (2007) Association of polymorphisms in the first exon of mannose binding lectin gene (MBL 2) in Brazilian patients with HCV infection. *Clinic Immunol* 124: 13-17.
- Wang Z–Y, Morinobu A, Kanagawa S, Kumagai S (2001) Polymorphisms of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren’s syndrome. *Ann Rheum Dis* 60:483–486
- Werth VP, Berlin JA, Callen JP, Mick R, Sullivan KE (2002) Mannose Binding Lectin (MBL) Polymorphisms Associated with low MBL production in patients with dermatomyositis. *The Journal of investigative dermatology* 119:1394–1399

**Tabela 1**

Distribuição da Frequência do Polimorfismo do Gene *Mbl2* em pacientes com Hcv e marcadores para AAT

| <b>AAT</b>       | <b>GENÓTIPO <i>MBL2</i></b> | <b>PACIENTE COM HCV</b> | <b>CONTROLES</b> |
|------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|
| <b>POSITIVOS</b> | <b>AA/A0</b>                | <b>14</b>               | <b>3</b>         |
|                  | <b>00</b>                   | <b>4</b>                | <b>0</b>         |
| <b>NEGATIVOS</b> | <b>AA/A0</b>                | <b>130</b>              | <b>117</b>       |
|                  | <b>00</b>                   | <b>14</b>               | <b>4</b>         |
| <b>TOTAL</b>     |                             | <b>163</b>              | <b>124</b>       |

P= 0,1196 OR 2,65, IC 0,56 – 10,06

AAT = Anticorpos antitireoidianos

**APÊNDICE****CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Responsável: FRANCISCO MONTENEGRO DE MELO

Você está sendo consultado (a) a participar de um estudo clínico, que pretende estudar a Resposta ao tratamento da Hepatite C e uma substância do sangue relacionada a imunidade (defesa), chamada de *MBL*.

Os procedimentos laboratoriais utilizados serão aqueles solicitados pelo seu médico assistente para controle e tratamento de Hepatite C e, o mesmo material clínico (sangue) será realizado exames para pesquisar *MBL*.

Não é comum a colheita de sangue causar danos, mas pode resultar em formação de hematoma (braço ficar roxo e inchado) no local onde a agulha for introduzida.

Mesmo que não concorde em participar da pesquisa, será garantido o atendimento neste serviço e seu consentimento poderá ser suspenso em qualquer momento da pesquisa.

Obrigado.

**CONCORDO EM PARTICIPAR**

---

**ASSINATURA DO PARTICIPANTE**

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2008

**NOME:** \_\_\_\_\_

**IDENTIDADE:** \_\_\_\_\_

**ENDEREÇO:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**TELEFO**

**NE:** \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## Anexo A



## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

No. do protocolo: UPE/021/05: CISAM/047/05

Título do projeto: Resposta ao tratamento de hepatite C e a capacidade de fixar manose da lectina fixadora de manose - (projeto de tese de doutorado de medicina tropical da UPE)

Pesquisador principal: Prof. Francisco Montenegro de Melo (FOP)

Data de distribuição: 11/05/05 no CEP do CISAM

**Análise:** Este estudo tem como *objetivo* verificar em pacientes com ICHCV, tratados com IFN e RIBA. Uma resposta antiviral não sustentável estaria associada a capacidade diminuída da MBL sérica de fixar manose.

Os procedimentos metodológicos foram assim descritos:

1.) O desenho do estudo será um corte transversal, analisado como caso controle. Os casos serão de indivíduos que não responderam de maneira sustentável ao tratamento de ICHCV com IFN e RIBA. Enquanto o grupo controle será formado pelos pacientes com ICHV que responderam de maneira sustentável. E o outro grupo controle será formado por pacientes com ICHCV não tratados.

2.) A amostra será formada por indivíduos que foram tratados de ICHCV, e que não responderam ou responderam de maneira sustentável e de indivíduos com ICHCV não tratados especificamente, atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Osvaldo Cruz - Recife - PE, com um n = 120.

3.) No tocante a coleta de dados esta será feita através de um questionário.

4.) Os resultados serão analisados através de estatísticas descritivas, EPI - INFO 6.0.

Foram apresentados os seguintes documentos: Os cronogramas de Execução Física e Financeira; o modelo do instrumento a ser utilizado, o Termo de consentimento livre e esclarecido. Ressalta-se que foi apresentado o aval da Instituição onde será realizada a pesquisa, bem como o Certificado do pesquisador (não na plataforma Lattes).

Parecer final do CEP: Projeto aprovado. Deverá apresentar relatório no término da pesquisa.

Recife, 11 de maio de 2005.

Maria Luiza Bezerra Menezes  
Coordenadora do CEP/CISAM

# Brazilian Journal

---

of medical and biological research

## Scope and policy

The purpose of the **BRAZILIAN JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL RESEARCH** is to publish the results of original experimental research that contribute significantly to knowledge in medical and biological sciences.

Preference will be given to manuscripts that develop new concepts or experimental approaches and are not merely repositories of data. Papers that report negative results will require special justification for publication.

Papers that report preliminary results or are only confirmatory in nature will not be accepted for publication. Papers that report negative results require special justification for publication.

Methodological papers shall be considered for publication provided they describe new principles or a significant improvement of an existing method.

The following articles will not be accepted for publication unless the authors can demonstrate the originality of the research:

- Manuscripts that report preliminary results or only confirm previously reported results.
- Manuscripts that translate a test already published to the language of another country without new original research.
- Manuscripts that use questionnaires translated to the language of another country and their validation in local patients.
- Manuscripts that deal with transcultural adaptation and validation of instruments of measurement.

Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee where the research was carried out, where at least one of the authors is associated and that written informed consent has been obtained from all persons in the study.

## Page charges

The Journal will bill authors for "page charges" for all accepted papers. All authors are expected to pay the "page charges".

The charge is R\$960/paper for Brazilian authors and US\$500/paper for authors outside Brazil.

Page charges will be billed to the Corresponding Author by the journal, at the time the paper is accepted. Please contact Reinaldo de Souza ([bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)) if you have any questions.

## Manuscript criteria and information

The *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* is a peer-reviewed journal published monthly by the Associação Brasileira de Divulgação Científica (ABDC).

Submission of a manuscript to the *Brazilian Journal* implies that the data have not been published previously and will not be submitted for publication elsewhere while the manuscript is under review.

The following represent "prior publication": any printed material in excess of 500 words describing results or methods of a submitted/in press manuscript; published tables or illustrations that duplicate the content of a manuscript; or electronic manuscripts or posters available via the Internet. When part of the material in a manuscript has been presented as a preliminary communication or in an refereed symposium, this should be cited as a footnote on the title page and a copy should accompany the submitted manuscript.

### **Manuscript Submission**

To submit a paper please complete the form for submission in <http://www.bjournal.com.br> and submit the paper via e-mail [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br) or [bjournal@terra.com.br](mailto:bjournal@terra.com.br).

If this is not possible, a CD with manuscripts in "doc" or "rtf" accompanied by all supporting materials, should be mailed, with adequate protection, to:

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Av. Bandeirantes, 3900**  
**14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil**

### **Telephone and Fax**

Brazil: (0XX) 16-3633-3825 or 3630-2778  
 Others: 55-16-3633-3825 or 3630-2778

### **Paper Format**

Eight to nine numbers of the *Brazilian Journal* are organized into sections of Biosciences and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior
- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

Three to four numbers per year will be dedicated to Clinical Investigation and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Analytical, diagnostic and therapeutic techniques and instruments
- Blood, immunology and organ transplantation
- Cardiovascular, respiratory and sport medicine
- Digestive system
- Endocrine diseases, nutrition and metabolism
- Environmental factors of diseases
- Health care
- Infectious agents and diseases
- Kidney and extracellular environment
- Neonatal medicine, growth and development
- Oncology
- Psychological processes, behavior and mental diseases

- Reproductive medicine
- Skeletal, muscle and nervous systems
- Skin and connective tissue diseases
- Surgical procedures, anesthesia and analgesia

### Full-length Paper.

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature. It should contain:

- an **abstract** of no more than 250 words
- no more than 6 **key words**
- a **running title** to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text **should be divided** into separate sections (**Introduction, Material and Methods, Results, Discussion**), without a separate section for conclusions
- **no more than 40 references**

authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a Full-length Paper

### Short Communication.

A short communication is a report on a single subject which should be concise but definitive. The scope of this section is intended to be wide and to encompass methodology and experimental data on subjects of interest to the readers of the Journal. It should contain:

- an **abstract** of no more than 250 words
- no more than 6 **key words**
- a **running title** to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- text not exceeding 12 double-spaced typed pages of 23 lines each
- a maximum of 2 **figures** or **tables** (or one of each)
- **no more than 20 references**
- a Short Communication should **not be divided** into separate sections (Introduction, Methods, etc.)
- authors should state in the **cover letter** that the manuscript is intended to be a Short Communication

### Review Article.

A review article should provide a synthetic and critical analysis of a relevant area and should not be merely a chronological description of the literature. A review article by investigators who have made substantial contributions to a specific area in medical and biological sciences will be published by invitation of the Editors. However, an outline of a review article may be submitted to the Editors without prior consultation. If it is judged appropriate for the Journal, the author(s) will be invited to prepare the article for peer review. A minireview is focused on a restricted part of a subject normally covered in a review article. A minireview and review article should contain:

- an **abstract** of 250 words or less
- no more than 6 **key words**
- a **running title** to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- **no more than 60 references**
- the text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles

**Concepts and Comments.** The Concepts and Comments Section provides a platform for readers to present ideas, theories and views. Contributions should be presented with an **abstract**, 6 **key words**, a **running title**, no more than 20 **references** and up to 2 **tables** or **figures**.

**Case Report.** A case report should have at least one of the following characteristics to be published in the Journal:

- to be of special interest to the clinical research community
- a rare case that is particularly useful to demonstrate a mechanism or a difficulty in diagnosis
- new diagnostic method
- new or modified treatment

finally a text that demonstrates relevant findings and is well documented and without ambiguity.

## Overviews

- Does not contain unpublished data
- Presents the point of view of the author(s) in a less rigorous form than in a regular review or minireview.
- Is of interest to the general reader

## Cell Biology

The main characteristic of research papers in the area of Cell Biology is the emphasis on the integration at the cellular level of biochemical, molecular, genetic, physiological, and pathological information. This section considers manuscripts dealing with either prokaryotic or eukaryotic biological systems at any developmental stages. Papers on all aspects of cellular structure and function are considered to be within the scope of Cell Biology for the BJMBR. The Editors encourage submission of manuscripts defining cell biology as an area of convergence of several other research fields, especially manuscripts providing insights into the cellular basis of immunology, neurobiology, microbial pathology, developmental biology, and disease. Manuscripts containing purely descriptive observations will not be published. Manuscripts reporting new techniques will be published only when adequately validated and judged by the Editors to represent advances of exceptional significance.

## Biological activity of natural products

The Journal will consider papers for publication which describe the activity of substances of biological origin only if they satisfy all of the following criteria:

- Papers should describe the separation of the crude material into fractions (not necessarily into homogeneous materials) with the fractions containing biological activity identified clearly in the separation scheme. Phytochemical studies should be accompanied by biological tests. A survey of pharmacological activity of plant extracts or teas will not be considered for publication.
- In addition to the demonstration of activity in one or more biological systems, experiments must be performed attempting to provide information concerning the mechanism(s) of action of the substance(s) being tested.
- Sufficient experimental information must be provided to permit repetition of the preparation of fractions and the bioassay used.
- Sources should be identified completely, and, if plant material, a specimen should be classified by an expert and deposited in a local botanical garden, university or research institute. The name and institution of the person who classified the plant and the number of the voucher under which it was deposited should be provided in the materials section.

The Journal will not publish toxicological studies.

## Authorship information

**Authorship Requirements.** Only a person who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as an author. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.

- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.

Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not, by themselves, criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be acknowledged, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

**Copyright.** Most of the provisions of the United States Copyright Act of 1976 became effective on Jan. 1, 1978. All published manuscripts become the permanent property of the *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* and may not be republished without written permission from the *Brazilian Journal*.

All manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by the authors and sent by regular mail:

The undersigned author(s) transfer all copyright ownership of the manuscript (title of article) to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research, in the event the work is published. The undersigned warrant(s) that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, and has not been previously published. The author(s) confirm that they have reviewed and approved the final version of the manuscript.

**Permission for Reproduction.** The journal is registered with the Copyright Clearance Center, Inc., 222 Rosewood Dr., Danvers, MA 01923, USA. Consent is given for the copying of articles for personal or internal use of specific clients. This consent is given on the condition that the copier pays directly to the Center the per copy fee beyond that permitted by US Copyright Law. This consent does not extend to other kinds of copyright, such as for general distribution, resale, advertising, and promotional purposes, or for the creation of new collective works.

All other inquiries regarding copyrighted material from this publication, other than those that can be handled through the Copyright Clearance Center, should be directed in writing to Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55-16-3633-3825 or 3630-2778. E-mail: [bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)

To request permission for reproduction, please send us a request via e-mail, via fax or mail with the following information:

- Name, title, and institution
- Complete mailing address, phone number, fax number and e-mail
- Article title
- Year of publication, volume and issue numbers
- Authors' names
- Page numbers on which the material of interest appears
- Specific figure number or portion of text (or supply a photocopy)
- Include the following information about the intended use:

### **Editorial review and processing**

The receipt of manuscripts is acknowledged immediately. Once a paper has been evaluated by peer review, the authors will be notified of the editorial decision.

Accepted manuscripts are copyedited and proofs will be sent to authors for the correction of errors. Authors are responsible for all statements made in their work, including changes made by the copy editor and authorized by the corresponding author.

The dates of receipt and acceptance will be published. If the paper is sent to the authors for revision and is not returned within 30 days, the date of submission will be revised. The date of acceptance will

be assigned when the authors return the manuscript after the final correction for English style and clarity.

## Manuscript preparation

Manuscripts should be submitted in English. Authors are requested to use American rather than British spelling, except, of course, for references whose titles should appear exactly as published. Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: *Scientific Style and Format: The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 6th edn. Cambridge University Press, New York, 1994; *Medical Style and Format*. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, which can be found on the website of the National Library of Medicine([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

## Text Format.

The text of your manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file created with MS Word 6.5 or a later version as a “doc” or “rtf” document.

- Submit the manuscript by e-mail, in letter size format (8.5 x 11”), with wide margins of at least 1 inch (2.54 cm), 23 lines per page, which contains approximately 2,156 characters, including spaces.
- Use a serif font, preferably **Times New Roman, 12 point** type and **double-space** throughout, including **title page**, **abstract**, text, **acknowledgments**, **references**, **figure legends**, and **tables**. Each page should contain the page number in the **upper right corner** starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable.
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures should be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.
- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and location (state, city and country or electronic address) of the manufacturer should be given in parentheses in the text.
- A file with good quality black-and-white **figures** must be supplied.

**Related Publications.** All submissions must be accompanied by a list of the authors’ manuscripts on related subjects that are in press or currently under editorial review. A list of related published papers by the authors may also be helpful to the reviewers.

## Cover Letter.

A manuscript submitted for publication should be accompanied by a cover letter containing the following information.

- Full name(s) of author(s) for indexing.
- Complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of corresponding author.
- Indicate subject section of the paper.
- A statement indicating if the paper is intended to be a full paper, short communication, review article or a section paper (Concepts and Comments, Overview, Case Report, etc.).
- A statement signed by the corresponding author that written permission has been obtained from all persons named in the acknowledgements should be sent by Fax 55-16-3633-3825 or 3630-2778.

**The authors** should provide the names and e-mail

- **addresses of 3 to 5 persons** who could act as referees.

- If a version of the manuscript has been previously submitted for publication to another journal, include comments from the peer reviewers and indicate how the authors have responded to these comments.
- Papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated) and written informed consent from all participants has been obtained.
- The authors should obtain written permission to reproduce **figures** and **tables** from other sources.

Note: *Neither the manuscript nor the figures are returned to authors.*

## Title page.

The title page should contain the following information:

- Title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.
- Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions).
- Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil). Acknowledgment of research grants and fellowships (agency and grant number).
- Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

**Key words.** A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see <http://www.scielo.br/bjmbr>; articles search/subject) to index the article.

## Abstract

- Since abstracts are published separately by Information Services, they **should contain** sufficient hard data to be appreciated by the reader.
- The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions.
- The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph **double-spaced** on a separate page following the title page.
- **Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined.**
- If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.
- Note that the *Brazilian Journal* publishes **unstructured abstracts**. Writing a good abstract
- Since most indexing services provide abstracts free of charge, the abstract is especially important because it is generally the first contact a potential reader has with your paper.
- Our objective, as Editors, is to provide the reader with an abstract that contains an accurate description of the content of the paper and which stimulates the reader to go to Scielo to read and/or obtain a copy of the paper. Hopefully, the
- reader will cite your paper. The problem is that the abstract cannot have more than 250 words and thus each word must be weighed carefully.

In one paragraph without subheadings, references or undefined abbreviations the abstract should contain:

1. A statement of justification and the objective(s) of the research and justification.
2. A description of the most important method(s) used.
3. Identification of the experimental species studied: age, weight, sex if relevant, and the number of subjects in each experimental group.
4. A report of the most important statistically significant new results (not necessarily all results),

preferably in numerical form reporting both control and experimental values.

5. A closing statement with a conclusion which is not simply a restatement of the results.

- These suggestions are meant to provide an accurate statement of the content of your paper. They will stimulate serious scientists to read the paper. Please do not worry about giving away your results - ethical scientists will give you credit for your work.

We suggest you study the content of abstracts in the Brazilian Journal and/or leading international journals to see how others have approached the problem of writing a good abstract.

**Footnotes.** Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

## Headings in Text

- Use only three types of headings in the text. Clearly indicate the type of level of headings by using the following typographic conventions.
- Position all headings flush with the left margin.

•

Keep headings short (three or four words); do not use abbreviations

|                                                                                 |                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| First-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, bold type.     | <b>Structural features of rhabdovirus G protein</b> |
| Second-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, regular type. | <b>Plant materials and extraction</b>               |
| Third-level: Only the 1st letter of the 1st word is capitalized, italic type.   | <i>Preparation of test microorganisms</i>           |

## Abbreviations and Symbols

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Please keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 ml, not 3 milliliters (ml)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).

Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be

## Tables

- Tables should be understandable without referring to the text. Therefore, the legend must be complete (see a recent issue of the Journal or PDF in Scielo at <http://www.scielo.br/bjmbr>).
- Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and grouped together after the Reference section.
- Tables must be cited in the text in numerical order.
- Each table should be typed double-spaced on a separate page (or, if exceptionally large or requiring special symbols or unusual treatment, the table should be submitted as an image as a tif or jpg file).
- Explain all abbreviations in table legends, even if they are explained in the text.

**Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.**

**Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions.** Acknowledgments of original sources of copied material should be given.

## Figures

- **We can accept** figures in **tif, jpg, cdr or eps** format prepared preferentially with Adobe Photoshop or Corel Draw. In case a graphic was created with Microsoft Word or Excel, it should be saved in the original file format. **Do not copy/paste** graphics from one program to another.
- **We cannot accept** some application programs such as Microsoft Office (Access), Corel Perfect Office (WordPerfect, Quattro Pro, Presentations), Lotus SmartSuite (Freelance Graphics, 1-2-3, Approach, WordPro), Harvard Graphics and SigmaPlot because they are not intended for the high resolution imaging necessary for publication. Graphics created in one of these programs and saved as jpg or similar also cannot be accepted.
- **Attention** - We recommend that the authors send electronic figures but also require that the authors also send a photographic copy or a printed copy of high quality when the paper is accepted, especially for grayscale and color photographs. A glossy copy must also be submitted by regular mail.  
All figures with the exception of line drawings will be published exactly as the author sent them to the Journal and the reproduction quality will be the total responsibility of the author.

## ALL IMAGES SHOULD BE:

- at least 5 inches (12.5 cm) wide.
- Numbered in the order in which they are cited in the text using consecutive Arabic numerals.
- **Do not insert figures within the text.**
- Only the PC format is acceptable as an attachment by E-mail or on CD. For information on the preparation of graphics in tif, jpg or eps formats, see <http://cjs.cadmus.com/da/>

Words in figures should have an initial capital

- letter followed by lower-case lettering; letter size and type should be uniform in style
- Check figures carefully before submission to ensure that proper versions are being sent and that there are no labeling errors.
- **Photomicrographs** should include **stain and magnification data** at the end of the legend for each part of the figure. A magnification bar should be added to each photomicrograph. If no scale marker appears in the figure, the original magnification should be reported in the legend.
- **Adapting/Reproducing Figures and Relevant Permissions.** Acknowledgments of original sources of copied material should be given.
- **Legends** must be complete. Figures should be understandable without referring to the text. Type all figure legends double-spaced consecutively on a separate page. Begin each legend with a descriptive title. Explain all abbreviations and symbols in the figure, even if they are explained in the text.
- **Color figures** are published only when absolutely necessary. The author must pay for the cost, which is US\$250.00 per figure. The author **must decide** about the use of color before submitting the paper since the reviewers will have to evaluate the paper in the form in which it will be published, if accepted. Color images need to be CMYK, at least 300 dpi, and have an accompanying color photograph - not a color laser print or color photocopy. Note: This photograph will be used at press for color reproduction. Contact the Journal for more details ([bjournal@fmrp.usp.br](mailto:bjournal@fmrp.usp.br)).
- **Grayscale images** should be at least 300 dpi and include a photograph.

**Line art** (black and white or color) should be at least 300 dpi.

## References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references in English should be cited.

The reference list must be **numbered consecutively** in the order in which the references are first cited in the text, using arabic numerals, and must be typed double-spaced on separate sheets. In the text, citation of two or more references, within parentheses, should be separated by a comma without a space (1,5,7); three or more consecutive references should be separated by a hyphen (4-9).

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*, which can be found on the website of the National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details.

If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd") as an attachment.

The following information must be given in the list of references:

**Standard Article.** First 6 authors followed by et al., Title, *Journal* (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages.

- Xu J, Liu M, Liu J, Caniggia I, Post M. Mechanical strain induces constitutive and regulated secretion of glycosaminoglycans and proteoglycans in fetal lung cells. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 6): 1605-1613.
- Poirier P, Lemieux I, Mauriege P, Demailly E, Blanchet C, Bergeron J, et al. Impact of waist circumference on the relationship between blood pressure and insulin: the Quebec Health Survey. *Hypertension* 2005; 45: 363-367.
- The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Australia* 1996; 164: 282-284.

**Abstract.** First 6 authors followed by et al., Title, *Journal* (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

- Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinæ in a tropical fish.
- *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).

**Article accepted for publication but not yet published.** First 6 authors followed by et al., Title, *Journal* (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

- Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

**"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers".** Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

- (Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).  
It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

Book, Whole. Authors, *Book title*, Edition, City, Publisher, Year.

- Norman IJ, Redfern SJ. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Book, Chapter. Authors, Chapter Title, Editors, *Book title*, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

- Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy. In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.
- Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Drugs and toxins. In: Scheuer PJ, Lefkowitz JH (Editors), *Liver biopsy interpretation*. 6th edn. London: WB Saunders; 2000. p 134-150.

### Report

- WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.
- National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

### Thesis

- Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

**Conference, Symposium Proceedings.** Cite papers only from published proceedings.

- Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

**Electronic Citations (Online Journals).** Ensure that URLs are active and available.

- American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol* [http://www.aao.org/education/library/recommendations/international\\_dr.cfm](http://www.aao.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm); 2005.
- Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999.

**Internet Communication.** Ensure that URLs are active and available.

- Developmental toxicology. <http://www.devtox.org/nomenclature/organ.php>. Accessed June 27, 2005.
- CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.
- CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

### Audiovisual Material

- *Physician's Desk Reference (PDR)*. Release 2003.1AX . [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

### Computer Program

- Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.
- *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

## Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

Manuscript checklist

## General

Submit by E-mail a file containing the manuscript that conforms to the format described in "Instructions for Authors".

All listed authors have seen and approved the manuscript.

List of all "in press" manuscripts cited accompany the submission.

Contents of the manuscript have not been previously published and are not currently submitted elsewhere.

Permission for the reproduction of figures and tables from other sources.

An abstract that conforms with the required abstract format.

Check all references for accuracy and completeness. Put references in proper format in numerical order, making sure each is cited in sequence in the text.

When appropriate, papers in the area of Clinical Investigation should include a statement indicating that the protocol has been approved by the Hospital Ethics Committee (Hospital with which at least one of the authors is associated). Animal studies should be carried out according to ethical guidelines.

Include a title for each table and figure - a brief, succinct phrase, preferably no longer than 10 to 15 words.

Send a good quality black-and-white file figures. For photographic material that does not photocopy well (for example, photomicrographs or radiographs), submit a glossy copy by mail. All photomicrographs carry scale bars.

Color Figures. The *Brazilian Journal* normally publishes figures in black and white. However, color figures are published when absolutely necessary. The author must pay for the cost, which is US\$ 250.00 per plate. The author **must decide** about the use of color before submitting the paper since the reviewers will have to evaluate the paper in the form in which it will be published, if accepted.

## Cover Letter

Include a statement signed by the correspondig author that written permission has been obtained from all persons named in the acknowledgements.

Include full name(s) of author(s) for indexing.

Complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of corresponding author.

Main subject area of the paper.

A statement indicating if the paper is intended to be a full-length paper, short communication, review article, overview or concepts and comments.

If the authors so wish, the names of five persons who could act as referees.

If a version of the manuscript has previously been submitted for publication to the Brazilian Journal or to another journal, include comments from the peer reviewers and an indication of how the authors have responded to these comments.

### **Title Page**

Provide a title as short and informative as possible. It should not contain non-standard acronyms or abbreviations and should not exceed two printed lines

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions).

Institution(s) (Department, Faculty, University) of each author.

Related Links

Writing a Good Abstract

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication

The Système International (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) in metric units is used for units and abbreviations of units.

Instructions to make quality images for publications - <http://cjs.cadmus.com/da/>

The Editorial Policies of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Brazilian Journal of Medical and Biological Research at Scielo: **<http://www.bjournal.com.br>**

## Anexo C



### Scope and editorial policy

**Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia (ABE&M)**, the official journal of FEBRASEM - Federação Brasileira de Sociedades de Endocrinologia e Metabologia (SBEM, SBD, ABESO e SOBEMOM), accepts contributions in Clinical and Basic Endocrinology and related sciences according to the categories: (1) Original Article, (2) Review and Mini-review Article, (3) Case Reports, (4) Special Case, (5) Perspectives, (6) Controversies, (7) Memories and (8) Letters to Editor.

These contributions must be written in Portuguese or English and comply with the Instructions provided by the International Committee of Medical Journal Editors. The main guidelines are summarized below. For more details see **N Eng J Med 1997;336[4]:309-15** (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. "International Committee of Medical Journal Editors" (ICMJE).

The manuscripts (MS) should be **typed using double spacing**, on letter-size paper (215 x 28 cm) or A4 (210 x 300 cm), with **margins of at least 25 mm** on each side.

Begin each section on a new page: (A) Title page, (B) Abstract, (C) Abstract (abstract in English), (D) Text, (E) Acknowledgements, (F) References, (G) Tables (each table with title and legend), (H) Figure legends and, (I) Figures. The pages shall be numbered consecutively beginning with the title page.

### Instructions for original article

The manuscripts (MS) should be typed using double spacing, on letter-size paper (215 x 28 cm) or A4 (210 x 300 cm), with margins of at least 25 mm on each side.

Begin each section on a new page: (A) Title page, (B) Abstract, (C) Abstract (abstract in English), (D) Text, (E) Acknowledgements, (F) References, (G) Tables (each table with title and legend), (H) Figure legends and, (I) Figures. The pages shall be numbered consecutively beginning with the title page.

### Title page

It should contain: (a) the MS title, (b) name of all authors (first name, initials of middle name and surname of each author); (c) name of Department(s) and Institution(s) where the work was developed; (d) name and complete address of the author responsible for correspondence; (e) "abbreviated title" of no more than 40 characters (count letters and space).

### Authorship

All persons designated as authors should qualify for authorship of MS and should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for its content. One or more authors should take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article.

Authorship credit should be based only on substantial contributions related to (a) conception, planning, performance, analysis and interpretation of results; (b) drafting the MS or revising it for important intellectual content; (c) final approval of the version to be published. Participation limited to acquisition

of funding, collection of data, general supervision or coordination of a research group does not justify authorship of MS. Editors may require explanation for inclusion of authors during the process of reviewing the MS, particularly if there are more than six authors.

### **Abstract**

The second page should carry an abstract of **no more than 200 words**, stating the purposes of the investigation, basic procedures, main findings (giving specific data and statistical analysis, if possible), and conclusions. [If written in Portuguese] send an accurate translation in English of the **Abstract** on a separate page.

The Editors highly recommend the authors to show the Abstract to people who master English before submitting it to the journal. In the end of the Abstract the following MS descriptors should be provided: **4 to 6 key words** (in compliance with Index Medicus standard) in order to assist further indexing.

### **Text**

It should be divided into the following sections: (I) Introduction, (II) Material and Methods, (III) Results and (IV) Discussion.

### **Introduction**

It should state the purpose of the work and summarize the rationale for the study. Avoid an extensive review of the subject and do not include data or conclusions from the work being reported.

### **Material and Methods**

It should have a description of the experimental models (patients or laboratory animals), identifying the methods and apparatus (manufacturer's name and/or origin of material, in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results. Established methods may be cited in references.

### **Medical Ethics**

Indicate that the study was approved by the Ethics Committee of the Hospital or Research Institution where the study was carried out, or if in accordance with the Helsinki Declaration.

### **Statistics**

The statistical methods should be described with enough detail to enable those with access to the original data to verify the results.

### **Results**

They should be presented in logical sequence in the text. Avoid repetition of data presented in tables or figures and emphasize only the most important observations.

### **Discussion**

Focus on the new and important aspects of the study and conclusions drawn from them. Avoid repeating results and information presented in other sections. Emphasize the implications of the findings, their limitations, and recommendations for further research.

### **Acknowledgements**

On a new page, this section may include: (a) contributions that require acknowledgements but do not meet the criteria for authorship; (b) acknowledgements for technical support; (c) acknowledgements for financial and material support, including government and/or pharmaceutical industry support; (d) financial relations that might represent potential conflict of interests.

### **References**

References should be numbered consecutively in the order they are mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses, not superscript). The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus.

Avoid mention of abstracts presented in congresses. Papers accepted but not yet published should be included, stating the name of the journal, followed by year and "in press". Use the style of the examples, as follows:

### Articles in Journals

(List all authors, but for more than six authors, add et al.):

Taylor AE, Hubbard J, Anderson EJ. Impact of binge eating on metabolic and leptin dynamics in normal young women. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:428-34.

### Chapters in Books

Kane JP, Malloy MJ. Disorders of lipoprotein metabolism. In: Greenspan FS, Strewler GJ, editors. **Basic & Clinical Endocrinology**. 5<sup>th</sup> edition. London:Prentice Hall, 1997:680-709.

### Books

Leder P, Clayton DA, Rubenstein E. **Introduction to Molecular Medicine**. New York:Scientific American Inc, 1994.

### Tables

Each table should be printed on a separate sheet of paper, with double spacing, and numbered in Arabic numerals, in the order of citation in the text. Tables should supply a brief title on the heading, and explanatory matter, statistics, etc, should be indicated in footnotes.

### Illustrations

Each MS should be submitted with 2 (two) original set of illustrations. The MS copies should have clear photocopies of the illustrations. The figures should be professionally drawn and photographed. **Do not use colors**, use a light-colored background and apply different textures to highlight contrast.

Instead of original drawings and/or x-ray films, send sharp, glossy, black-and-white photographs, in 12 × 18 cm or 18 x 24 cm.

Letters, numbers, and symbols should be clear and of sufficient size to be legible even after a substantial reduction for publication.

Titles and legends of figures should be provided on a separate piece of paper, and never on these figures themselves.

Each figure should be marked on its back with a blue pencil, indicating the author's name, number of the figure, and orientations to insert it in the text.

### Units and Measurements

The measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (meter, kilogram, and liter) or their decimal multiples. Temperatures should be given in degrees Celsius; blood pressure should be given in millimeters of mercury (Hg).

All hematologic and clinical chemistry measurements should be reported in the traditional metric system.

### Instructions for review and mini-review articles

The review and mini-review articles are usually requested by the Editor to authors with proven experience in the field. The journal, however, encourages submission of material not requested, provided published experience of the author is demonstrated and it does not consist only of a literature review.

The instructions for reviews and mini-reviews are the same for original articles, and should include an Abstract, uniterms and keywords.

The mini-reviews should be no longer than 15 pages, including references (no more than 20) and excluding two possible illustrations (tables, figures or charts or a combination of them).

### Instructions for case reports

This section is designed for publication of interesting clinical cases that are original or have some curious or not conventional aspect. It should show clinical, laboratory and progression aspects of interest, and be sufficiently documented.

The instructions are the same mentioned for original articles, including an Abstract, uniterms and keywords.

### **Special cases**

This section provides cases of special interest, that have been appropriately studied and presented in clinical meetings of well-known national Endocrinology centers or services. It should include a general discussion held by the audience, with the complete name and occupation of the participants.

The manuscript should be previously edited by someone in charge of the case or of the meeting. The authors of the MS should limit themselves to presenter and debaters of the case. Information on date and place of presentation and name and address of the person in charge of the MS should be provided.

### **Instructions for perspectives section articles**

The purpose of this section is to be a means of reporting new ideas and concepts in Endocrinology, both in the basic and applied fields, or concerning teaching and training.

The articles could have: (a) Interpretative trials using research data collected by the authors themselves to develop new ideas; (b) Research proposals for collaborative studies among several centers; (c) Innovative trials dealing with interrelation of Endocrinology and other fields; (d) Reports on the Brazilian or international history of Endocrinology supplying critical analysis of events, individuals or institutions. The instructions are the same mentioned for original articles.

### **Instruction for controversies section articles**

The aim of this section is to report Clinical Endocrinology subjects, particularly related to diagnosis and treatment of frequent endocrine diseases, of which management is not yet sufficiently standardized and, therefore, may have different management options.

The articles provided in this section are requested by the Editorial Board to two or more specialists in the subject, who have different opinions and/or management of the topic chosen.

Therefore, it is expected to provide more information to readers so that they could make their decision appropriately in similar situations. It is also expected to encourage peer discussion, by means of more Letters to Editor, with standpoints.

### **Submission of manuscripts**

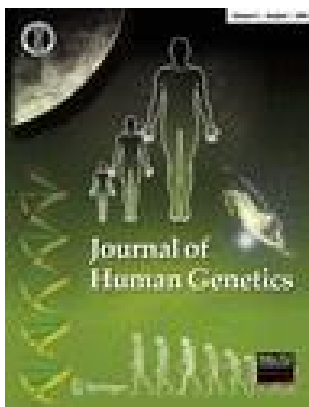
MS of any kind should be submitted in three copies (one original) to ABE&M office, **together with a covering letter** addressed to Dr. Claudio E. Kater, Chief-Editor, and signed by all authors. **Do not send diskettes on first submission of the article.**

All articles submitted to ABE&M will be analyzed as to scientific quality and language plainness by qualified referees of the Editorial Board.

in order to minimize typing and transcription errors and to speed up the process of publication, we require that, once accepted for **publication**, the final MS version be sent in floppy-disks well identified and prepared in Word or WordPerfect editing, in a simple form, with no special format or layout. Figures and illustrations should not be inserted in text files.

For editorial reasons, the Editors are entitled to make some slight graphic or wording modifications in the text, not interfering in its content. After having their article approved for publication, the authors implicitly transfer their copyrights of the article to the "Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia."

## Anexo D



### Journal of Human Genetics

Editor-in-Chief: Katsushi Tokunaga

ISSN: 1434-5161 (print version)

ISSN: 1435-232X (electronic version)

Journal no. 10038

Springer Japan

### Aims and scope

The Journal of Human Genetics is a leading international journal publishing articles on human genetics, including medical genetics and human genome analysis.

We welcome papers on any aspects of human genetics, including gene cloning and mapping, linkage analysis, mutational analysis, evolution, cancer genetics, and gene therapy, as well as genetic and functional analysis of animal models of disease or behavior.

The journal also welcomes clinical or cytogenetic case reports, as well as reports of genetic polymorphism of biologically important genes, novel mutations found in patients with hereditary diseases or in cancer cells, and population genetics.

Data on novel pathological mutations of genes, in which many mutations have been reported, are not published in this journal. Data on a single or a few novel genetic polymorphisms are also not within the scope of the journal unless an author adds an association with some disease phenotype. However, a set of novel polymorphisms detected by systematic screening of an entire gene of biological or medical importance may be published as a short communication.

Papers will be considered for publication in the following categories:

1. Minireviews
2. Original articles
3. Short communications (including case reports and polymorphism reports)
4. Announcements

The editors reserve the right to decide in which section an article will appear.

### Instructions for Authors

#### Submission

Papers will be considered for publication in the following categories:

1. Minireviews
2. Original articles
3. Short communications (including case reports and polymorphism reports)
4. Announcements

The editors reserve the right to decide in which section an article will appear.

Authors should submit their manuscripts to the Journal of Human Genetics online to facilitate even quicker and more efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing time and shortens overall publication time. Please log directly onto the site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jhumgenet> and upload your manuscript following the instructions given on screen. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, click on the icon titled "Get Help Now" in the upper right corner.

#### **General**

Papers should be written in English. They should be concise but contain sufficient detail to make it possible to identify the method by which the results were obtained.

Short communications must not exceed two printed pages, including references, illustrations, and tables. (An average printed page includes approximately 6200 characters including spaces, or about 1000 words. The total number of figures and tables is limited to a maximum of three.)

Submissions of minireviews covering recent discoveries or topics of current interest are welcome and encouraged. Minireviews should be concise and no longer than six printed pages. They should not be extensive reviews covering the full history of the topic. Please send the title and a short summary of the proposed topic to the Editor-in-Chief for approval before submitting a manuscript. Minireviews will be peer-reviewed.

Manuscripts should be typed with double-line spacing and wide margins. Form and content should be carefully checked to exclude the need for corrections in proof. A charge will be made for changes introduced after the manuscript has been typeset.

Authors are requested to follow the technical instructions for manuscripts and illustrations in electronic form printed in each issue.

The "Copyright Transfer Statement" must be signed and faxed to the publisher together with the corrected proofs. The form is regularly published in this journal and can also be downloaded from Springer's server.

The authors transfer the copyright to their article to the Japan Society of Human Genetics and to Springer-Verlag Tokyo, effective if and when the article is accepted for publication. The copyright covers the exclusive and unlimited rights to reproduce and distribute the article in any form of reproduction (printing, electronic media, or any other form); it also covers translation rights for all languages and countries. For American authors, the copyright is transferred to the extent transferable.

Manuscripts must contain a statement to the effect that all human studies have been reviewed by the appropriate ethics committee or it should be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

New nucleotide data must be deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank databases and an accession number obtained before a paper can be accepted for publication. Submission to any one of the three collaborating databanks is sufficient to ensure data entry in all. The accession number should be included in the manuscript, e.g., as a footnote on the title page: The nucleotide sequence data reported are available in the DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession number(s)----. If requested, the database will withhold release of data until publication. The most convenient method for submitting sequence data is by using the following URLs:

DDBJ via SAKURA:  
<http://sakura.ddbj.nig.ac.jp/>

EMBL via WEBIN:  
<http://www.ebi.ac.uk/emb/Submission/webin.html>

GenBank via BankIt:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BankIt/>  
or by stand-alone submission tool Sequin:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>

For special types of submissions (e.g., genomes and bulk submissions, additional submission systems are available at the following sites:

DDBJ: Center for Information Biology and DNA Data Bank of Japan  
National Institute of Genetics, Yata, Mishima, Shizuoka 411-8540, JAPAN;

telephone +81-559-81-6853; fax +81-559-81-6849; e-mail: ddbj@ddbj.nig.ac.jp;  
URL: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

EMBL: EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute,  
Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, U.K.;  
telephone +44-1223-494400; fax +44-1223-494472;  
e-mail: [datasubs@ebi.ac.uk](mailto:datasubs@ebi.ac.uk); URL: <http://www.ebi.ac.uk>

GenBank: National Center for Biotechnology Information,  
National Library of Medicine, Bldg. 38A, Rm 8N-803, Bethesda, MD 20894, U.S.A.;  
telephone +1-301-496-2475; fax +1-301-480-9241; e-mail: [info@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:info@ncbi.nlm.nih.gov);  
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or for failure to fulfill the above-mentioned requirements.

Technical instructions (pdf, 183 Kb)

### **Arrangement of the manuscript**

The title page should comprise: title of paper, first names and surnames of all authors, affiliations, any footnotes referring to the title, and address to which proofs should be sent. To facilitate communication between the authors, editors, and publisher, the author should also furnish a fax number, a telephone number, and an e-mail address on this page.

Each paper should be preceded by a short Abstract. The abstract should not exceed 200 words. Normally, complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense.

Immediately following the abstract, five to eight key words should be supplied, indicating the scope of the paper.

The text of original articles should also include the following sections: Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, and References.

### **References**

References should be cited in the text by the author and year as follows: Goldstein and Brown (1983) or (Goldstein and Brown 1983). In the case of a paper written by three or more authors the style Tommerup *et al.* (1981) or (Tommerup *et al.* 1981) should be used. The reference list at the end of the paper should include only works cited in the text and should be arranged alphabetically by the name of the first author. Citations of "unpublished results" or papers "in preparation" should be included in the text but not in the reference list.

References should be cited as follows: journal papers---names and initials of all authors, year in parentheses, full title, journal as abbreviated in Index Medicus, volume number, first and last page numbers; books---names and initials of all authors, year, names and initials of all editors, full title, edition, publisher, place of publication.

If there are several works with the same (first) author they should be entered in the following order within the list: (1) all works by a single author in chronological order; (2) same author and one co-author alphabetically by co-author, then chronologically; (3) same author plus two or more co-authors chronologically.

Examples of a journal paper citation:

Nakashima H, Hasegawa T, Sakai M, Inaba R, Imamura T (1995) Identification of iso(18p) marker chromosome by fluorescence in situ hybridization with single-copy DNA probe. *Jpn J Hum Genet* 40:185-188

If available the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question.

Ochi K, Daigo Y, Katagiri T, Saito A, Saito-Hisaminato A, Tsunoda T, Toyama Y, Matsumoto H,

Example of a book citation:

Vogel F, Motulsky AG (1997) Human genetics-- problems and approaches, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York

Nakamura Y (2003) Expression profiles of two types of human knee-joint cartilage. *J Hum Genet* 48:177-182 DOI 10.1007/s10038-003-0004-8

Example of an article quoted from a book:

Kimura M (1991) Neutral evolution. In: Osawa S, Honjo T (eds) *Evolution of life*. SpriBerlinHeideYopp 67-78

Responsibility for the accuracy of bibliographic references rests entirely with the author.

### **Figures and tables**

Figures should be used with discretion. An illustration is justified only if it clarifies or reduces the text. Information given in captions should not be repeated in the text. Previously published illustrations are not usually permitted. The author must guarantee that the reproduction of illustrations in which a patient is recognizable has been approved either by the patient or by his/her legal representative.

Figures, and tables should always be mentioned in the text and should be numbered with arabic numerals.

A brief descriptive legend should be provided for each figure; legends are part of the text and should be placed at the end of the text. Figure parts should be identified by lowercase roman letters (a, b, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure legends and citations.

Submit all figures as separate files and do not integrate them within the text. The preferred figure formats are EPS (Encapsulated Postscript) for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure. The file name should include the figure number.

Line drawings. Inscriptions should be legible, with initial capital letters and appropriately scaled to the size of the drawing. Scanned line drawings should be digitized with a resolution of 800 dpi relative to the final figure size.

Halftone illustrations (black and white and color). Magnification should be indicated by scale bars. For scanned halftone illustrations, a resolution of 300 dpi is usually sufficient.

Color figures will always be published in color in the online version. In print, however, they will appear in color only if the author agrees to make a contribution (approx. US\$1000 for the first and US\$550 for each additional page) to printing costs. Otherwise the figures will be printed in black and white.

Please note that, in such cases, it is authors' responsibility to prepare figures to be illustrative enough to convey the necessary information even after they are converted into black and white. Save color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

Vector graphics . Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size.

Size of figures. The figures, including legends, should match either the column width (86 mm) or the print area of 176 × 236 mm. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

If total file size exceeds the maximum file volume for online submission, reduce resolution of large files for initial submission. In this case, please send high-resolution figure files of the final version to the publisher after acceptance.

### **Electronic Supplementary Material**

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is:  
submitted in electronic form together with the manuscript accepted after peer review

ESM may consist of: information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc. large quantities of original data that relate to the paper, e.g., additional tables, large numbers of illustrations (color and black & white), etc.

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc.

After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

### **Proofreading**

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can be made only in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

### **Online First**

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

### **Offprints**

Offprints can be ordered at cost price provided the order is received with the corrected proof. Please return the offprint order form along with the corrected page proofs within 48 hours of receipt.