

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES
PROMOTORAS DAS CITOCINAS FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF-
 α), INTERLEUCINA 6 (IL-6) E INTERLEUCINA 10 (IL-10) EM PACIENTES
COM HEPATITE DELTA**

JULIANA DOS SANTOS AFFONSO

MANAUS – AM

2020

JULIANA DOS SANTOS AFFONSO

**ESTUDO DE CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DAS REGIÕES
PROMOTORAS DAS CITOCINAS FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF-
 α), INTERLEUCINA 6 (IL-6) E INTERLEUCINA 10 (IL-10) EM PACIENTES
COM HEPATITE DELTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, para a obtenção do grau de *Mestre em Ciências Aplicadas a Hematologia*.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Andrea Monteiro Tarragô.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marilu Barbieri Victoria.

MANAUS – AM

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

257e Affonso, Juliana dos Santos
Estudo de caracterização dos polimorfismos das regiões promotoras das citocinas Fator De Necrose Tumoral a (TNF-a), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) em pacientes com Hepatite Delta / Juliana dos Santos Affonso. Manaus : [s.n], 2020.
111 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - PGSS - Ciências Aplicadas à Hematologia (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: Andréa Monteiro Tarragô
Coorientador: Marilu Barbieri Victoria

1. Vírus da Hepatite Delta. 2. Fibrose. 3. Polimorfismos. 4. Citocinas. I. Andréa Monteiro Tarragô (Orient.). II. Marilu Barbieri Victoria (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Estudo de caracterização dos polimorfismos das regiões promotoras das citocinas Fator De Necrose Tumoral a (TNF-a), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) em pacientes com Hepatite Delta

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

FOLHA DE JULGAMENTO



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS À HEMATOLOGIA – UEA/HEMOAM**



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 09/2020

Ao décimo quinto dia do mês de julho do ano de 2020, às 14h00, realizou-se no auditório da Fundação Hemoam, Bloco A, 2º andar da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM, sito Av. Constantino Nery, 4397 – Chapada, a Defesa de Dissertação de Mestrado da discente **Juliana dos Santos Affonso** sob o título “**Estudo Dos Polimorfismos Nos Genes das Citocinas Fator De Necrose Tumoral α (TNF α), Interleucina 6 (IL6) E Interleucina 10 (IL10) Em Pacientes Com Hepatite Delta**”, tendo como orientador a Profa. Dra. **Andréa Monteiro Tarragô** e coorientadora Profa. Dra. **Marilu Barbieri Victoria** segundo encaminhamento do Prof. Dr. Nelson Abraham Fraiji, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído ao aluno o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. José Pereira de M. Neto – Presidente	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 03204317657
Profa. Dra. Myuki Alfaia Esashika Crispim - HEMOAM	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 180464522-20
Profa. Dra. Márcia da Costa Castilho - FMT-HVD	Aprovado(a) (X) Reprovado(a) ()	Assinatura: CPF: 243061002-78

O parecer final da Defesa de Dissertação foi:

Aprovado

Não Aprovado

Presidente da Banca Examinadora

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Bosco Affonso e Janete Santos**, os grandes amores da minha vida, que sempre estiveram ao meu lado me amando, me encorajando, me dando forças e torcendo por mim, e que jamais mediram esforços para que eu chegasse onde estou hoje. Pai e mãe, sem vocês eu não seria, absolutamente, nada.*

*Aos meus irmãos, **Henrique Santos e William Affonso**, pelo incentivo diário que me dão e por me quererem bem.*

*Ao meu amado companheiro, **Bruno Freire**, por sempre me encorajar a ir em frente, pela paciência e pelo amor que tem por mim.*

Eu amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que sempre foi meu melhor amigo, que se faz presente nas horas de aflição e alegria, a quem eu devo por toda graça alcançada na minha vida. Obrigada por ser tão generoso comigo. Foi tua mão que me sustentou.

A **minha família**, que por vezes tiveram que compreender e lidar com minha ausência, mas que mesmo assim, me amam ainda mais. Vocês são minha maior fonte de inspiração.

As minhas amigas, **Keyla Sousa e Tainá Cardoso**, que são as minhas meninas superpoderosas. Obrigada por serem o meu ponto de apoio nessa caminhada.

Ao amigo do coração **Pedro Vieira**, que desde o início dessa caminhada esteve presente e disposto a me ajudar, especialmente quando as coisas deram errado você foi meu ponto de apoio.

As minhas meninas, **Elizianne Burton e Xaiane Martins**, as pessoas mais bem-humoradas com quem pude dividir o cafezinho da tarde e um pouco do meu conhecimento e que me ajudaram com a realização deste trabalho. Vocês são maravilhosas.

A equipe do laboratório de genômica, **Luciana Cassa, Rechfy Ali, Nadja Garcia e Gustavo Medeiros**, por sempre estarem dispostos a me prestarem auxílio nas atividades diárias dentro do laboratório e por torcerem para que meus experimentos dessem certo.

A **Dra. Débora Rodrigues**, pela amizade sincera feita nos dias de atualização de banco de dados. Entre um nome é outro, foram muitas risadas.

A minha querida orientadora **Dra. Andrea Tarragô**, que me mostrou o caminho das pedras. Obrigada pelo incentivo, ajuda, dedicação e, principalmente, por sua paciência. Obrigada por ser tão apaixonada pelo que faz e por me mostrar o meu verdadeiro valor. Nunca terei palavras suficientes pra te agradecer.

A **Dra. Adriana Malheiro**, pela oportunidade de aprendizado e contribuir na minha formação acadêmica e profissional. Você é uma grande mulher.

A Dra. Marilu Victória por todo apoio, aprendizado e por sempre estar disposta a me ajudar.

Aos amigos da turma 07 do PPGH pelo companheirismo, pelos conhecimentos e experiências compartilhadas, pelos risos que tornavam as aulas mais leve. Vocês sempre estarão no meu coração.

Aos meus amigos da NAEP, que compartilham histórias, sorrisos, conquistas e até mesmo as tristezas e frustrações. Vocês são parte importante da minha vida, obrigada por tornarem essa jornada muito mais leve.

Aos amigos do Departamento de Pesquisa (DEP) e a Secretaria do PPGH, que sempre que nos encontrávamos nos ofereciam palavras de incentivo.

A Universidade do Estado do Amazonas em proporcionar o Curso de Pós-Graduação em Ciências aplicadas a Hematologia.

A Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas e a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado pela infraestrutura concedida para a realização desse trabalho.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela concessão da bolsa de estudo que me possibilitou dedicação exclusiva para a realização desse trabalho.

“E trata-se, precisamente, de viver tudo. No momento viva apenas as suas interrogações. Talvez que, somente vivendo-as, acabe um dia por penetrar, sem perceber, nas respostas.”

Rainer Maria Rilke

RESUMO

INTRODUÇÃO: O vírus da hepatite Delta é um dos principais fatores responsáveis pela hepatite fulminante nos casos de infecção aguda e causa a progressão acelerada da doença hepática em portadores crônicos do VHB. Os SNPs localizados nas regiões promotoras dos genes *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* podem estar relacionados à progressão da fibrose, cirrose hepática, desenvolvimento de CHC e risco de morte. **OBJETIVO:** Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes das interleucinas Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), da Interleucina 6 (IL-6) e da Interleucina 10 (IL-10) em pacientes com Hepatite Delta. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A população do estudo consistiu de setenta e sete (77) pacientes com hepatite Delta e cento e trinta e sete (137) doadores de sangue elegíveis que compõem o grupo controle. As regiões genômicas de interesse dos genes IL6, TNF α e IL10 foram amplificadas por PCR-RFLP. A dosagem das citocinas foi realizada por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Os genótipos G/A (*TNF α -308G/A*) e G/C (*IL6 -174G/C*) parecem ser fatores de risco para infecção por HDV. A análise das concentrações de citocinas séricas no grupo HDV mostrou que as citocinas IL-2 (p<0,0001), IL-4 (p<0,0001), IL-6 (p<0,0001), IL-10 (p<0,0031) encontraram significativamente aumentou no grupo HDV. Os níveis séricos de citocinas para indivíduos do grupo HDV IL-6G/C+C/C + IL-10A/G+G/G demonstraram níveis mais elevados de citocinas IL-2 (p<0,0066), IL-4 (p<0,0053), IL-6 (p<0,0076), IL-10 (p<0,0309) e IFN- γ (p<0,0199). **CONCLUSÃO:** Nossos achados demonstram relevância na influência dos SNPs estudados em pacientes com HDV no perfil de citocinas. TNF α -308G / A e IL6 -174G / C podem predispor indivíduos à infecção por hepatite D. A presença dos genótipos combinados IL-6G / C + CC + IL-10A / G + G / G altera o perfil das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ . No entanto, estudos futuros devem ser realizados para melhor elucidar a influência desses SNPs na patogênese da Hepatite Delta.

Palavras Chaves: Vírus da Hepatite Delta; Fibrose; polimorfismos; Citocinas.

ABSTRACT

Background: The hepatitis Delta virus is one of the main factors responsible for fulminant hepatitis in cases of acute infection and causes the accelerated progression of liver disease in chronic HBV carriers. The SNPs located in the promoter regions of the *TNFA* -308G/A, *IL6* -174G/C and *IL10* -1082A/G genes may be related to fibrosis progression, liver cirrhosis, development of CHC and risk of death. **Objective:** To evaluate the influence of polymorphisms on the genes for Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) and Interleukin 10 (IL-10) genes in patients with Delta Hepatitis. **Study design:** The study population consisted of seventy-seven (77) patients with hepatitis Delta and one hundred and thirty-seven (137) eligible blood donors who make up the control group. The genomic regions of interest of the *IL6*, *TNFA* and *IL10* genes were amplified by PCR-RFLP. The measurement of cytokines was performed by flow cytometry. **Results:** The G/A genotypes (*TNFA* -308G/A) and G/C (*IL6* -174G/C) appear to be risk factors for HDV infection. The analysis of serum cytokine concentrations in the HDV group showed that cytokines IL-2 (p<0.0001), IL-4 (p<0.0001), IL-6 (p<0.0001), IL-10 (p<0.0031) found significantly increased in the HDV group. Serum cytokine levels for individuals in the HDV group IL-6G/C+C/C + IL-10A/G+G/G demonstrated higher levels of cytokines IL-2 (p<0.0066), IL-4 (p<0.0053), IL-6 (p<0.0076), IL-10 (p<0.0309) and IFN- γ (p<0.0199). **Conclusion:** Our findings demonstrate relevance on the influence of the studied SNPs in patients with HDV on the cytokine profile. *TNFA* -308G/A and *IL6* -174G/C may predispose individuals to Hepatitis D infection. The presence of the combined IL-6G / C + CC + IL-10A / G + G / G genotypes alters the profile of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ . However, future studies must be carried out to better elucidate the influence of these SNPs on the pathogenesis of Hepatitis Delta.

Keywords: Hepatitis D virus; Fibrosis; polymorphisms; Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência de Hepatite D no Brasil.	19
Figura 2. Representação esquemática do vírus da hepatite D.	20
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação viral.	21
Figura 4. Representação esquemática da resposta imunológica contra vírus.	24
Figura 5. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800629 do gene TNF- α	25
Figura 6. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800795 do gene IL-6.	26
Figura 7. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800896 do gene IL-10.	28
Figura 8. Distribuição da população do grupo HDV segundo a naturalidade.	38
Figura 9. Associação das médias de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2, IL4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL17A no grupo controle e grupo HDV.	45
Figura 10. Associação da média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2, IL4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL17A entre os genótipos variantes do SNP TNF α - 308G/A, IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G entre os genótipos categorizados em homocigoto selvagem, heterocigoto e homocigoto mutante.	48
Figura 11. Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2, IL4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL17A entre os genótipos variantes do SNP IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos.	34
Tabela 2. Dados demográficos de indivíduos submetidos ao estudo.	37
Tabela 3. Características clínicas da população de estudo.	40
Tabela 4. Características bioquímicas dos marcadores de dano hepático.	41
Tabela 5. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas nos genes das citocinas TNF α -308G/A, IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G.....	43

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Detecção de cirrose e fibrose moderada conforme valores de APRI e FIB-4.....35

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

agRNA	Ácido Ribonucleico anti-genômico
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FIB-4	Fibrose-4
gRNA	Ácido Ribonucleico genômico
HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B
HBV	Do inglês, Vírus da hepatite B
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCV	Do inglês, Vírus da hepatite C
HDAg	Antígeno da Hepatite Delta
HDV	Do inglês, Vírus da hepatite D
IFN- α	Interferon-A
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-17 ^a	Interleucina-17 ^a
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
L-HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B Médio (do inglês, Medium)
L-HDAg	Antígeno da Hepatite Delta Grande (do inglês, Large)
M-HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B Grande (do inglês, Large)
MHC	Complexo de histocompatibilidade
M-HDAg	Antígeno da Hepatite Delta Médio (do inglês, Medium)
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MVB	Corpo Multivesicular
NK	Células matadoras naturais (do inglês, Natural Killer Cell)
NTCP	Polipeptídeo de Controle de Taurocolato de Sódio
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGHS	Proteoglicano de Sulfato Heparan
RDW	Amplitude de Distribuição dos Glóbulos Vermelhos (do inglês, Red Cell Distribution Width)
RNA	Ácido Ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
S-HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B Pequeno (do inglês, Small)
S-HDAg	Antígeno da Hepatite D Pequeno (do inglês, Small)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
ssRNA	RNA fita simples

TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TGO	Transaminase glutâmico-oxaloacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TLRs	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VCM	Volume Corpuscular Médio
VPM	Volume Plaquetário Médio
WBC	Células Brancas Sanguíneas (do inglês, White Blood Cells)
U/L	Unidades/Litro
%/mm ³	Porcentagem/milímetro cubico
μ l	Microlitro
fL	Fentolitro
g/dl	Gramas/decilitro
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
mm ³	Milímetro cubico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HEPATITE DELTA	18
2.2. HEPATITE DELTA	19
3. OBJETIVOS	30
3.1. GERAL	30
3.2. ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. MODELO DE ESTUDO	31
4.2. ÁREA DE ESTUDO	31
4.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
4.4. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	31
4.5. ASPECTOS ÉTICOS.....	32
4.6. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	32
4.7. EXTRAÇÃO DE DNA	33
4.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	33
4.2. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NOS GENES FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-A), INTERLEUCINA 6 (IL-6) E INTERLEUCINA 10 (IL-10).....	34
4.3. DOSAGEM DE CITOCINAS PLASMÁTICAS POR CBA (CYTOMETRIC BEAD ARRAY).....	34
4.4. AVALIAÇÃO DO ESTADIAMENTO DA DOENÇA HEPÁTICA.....	35
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. DADOS DEMOGRÁFICOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	37
5.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS	41
5.3. ANÁLISE DAS CITOCINAS SÉRICAS Th1, Th2 e Th17	44
5.4. CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS ASSOCIADAS AOS GENÓTIPOS DOS MARCADORES TNF-A -308G/A, IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G.....	46
5.5. RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS E ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE PACIENTES COM HEPATITE DELTA.....	49
6. DISCUSSÃO.....	51
7. CONCLUSÃO	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
9. ANEXOS.....	76

INTRODUÇÃO

As hepatites virais, de modo geral, representam um grave problema de saúde pública em todo o mundo. Esta patologia caracteriza-se como uma inflamação no fígado causada por agentes infecciosos, como o vírus da hepatite B (HBV), C (HCV) e Delta (HDV) (1,2).

O vírus da hepatite Delta é um vírus de RNA que requer a presença do antígeno de superfície da Hepatite B (HBsAg) para tornar-se infeccioso, este vírus é apontado como um dos principais responsáveis pela hepatite fulminante em quadros de infecção aguda e como a causa da progressão acelerada de doença hepática em portadores crônicos do HBV, apresentando taxas de fibrose acelerada, cirrose e risco carcinoma hepatocelular (CHC) aumentados (3,4).

A história natural da hepatite D não se apresenta de forma uniforme, podendo ou não apresentar sintomas. Sua infecção pode discorrer de duas formas diferentes, denominadas de coinfeção e superinfecção (5,6). A coinfeção é caracterizada pela infecção simultânea pelos dois vírus HBV/HDV em indivíduo susceptível, por sua vez a superinfecção ocorre em indivíduos cronicamente infectado com o HBV e possui um prognóstico muito mais grave, uma vez que a infecção prévia pelo HBV dispõe de condições ideais para a replicação do HDV de forma mais intensa, favorecendo o aparecimento de lesões hepáticas muito mais graves (7–9).

A avaliação do grau de fibrose é um dos meios de prognósticos mais utilizados para avaliar o risco de desenvolvimento de cirrose hepática, sendo este o estágio mais avançado da fibrose. A superinfecção da hepatite D tem sido associada a uma forma mais grave de doença hepática, levando à rápida progressão para cirrose. A descompensação hepática é o primeiro sinal clínico observado durante o curso da infecção pelo HDV, antes mesmo do desenvolvimento de CHC (8,10,11).

O diagnóstico da hepatite Delta varia de acordo com a fase de evolução clínica da doença. Os primeiros sinais de anormalidades são identificados pela elevação das transaminases séricas, transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), indicativos de dano hepático. O diagnóstico sorológico específico para o HDV é feito através da detecção do antígeno da Hepatite Delta (HDAg) e quantificação do HDV-RNA (12–14).

A resposta do sistema imunológico do hospedeiro é o principal meio de prevenção contra infecções virais, e dependem da ação conjunta da imunidade inata (células fagocíticas) e adaptativa (linfócitos B e T), a fim de combater a infecção, eliminando as células infectadas e produzindo memória imunológica, além de recrutar uma série de células para o controle da inflamação estabelecida à partir da infecção (13).

Associados a resposta imunológica do hospedeiro, pode-se notar a presença de inúmeras citocinas que podem agir agravando a inflamação existente, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6), ou podem regular positivamente quadros inflamatórios, como a interleucina 10 (IL-10). Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados nas regiões promotoras de IL-6 -174G/C e IL-10 -1082G/A podem afetar a transcrição e a tradução e desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer de fígado, do mesmo modo a inflamação crônica combinada com a alta produção de TNF- α pode aumentar a progressão da fibrose, cirrose hepática, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e risco de morte (15,16).

Os estudos relacionados ao perfil de resposta imunológica e perfil genotípico de indivíduos infectados por HDV ainda são questões que não estão bem consolidadas, muitos estudos ainda buscam responder essas perguntas, uma vez que isso seja essencial para gerar conhecimento a respeito da resposta imunológica, os mecanismos envolvidos na imunopatogênese, progressão e possíveis complicações relacionadas a esta infecção.

Nesse contexto, este estudo busca gerar novos conhecimentos acerca dos mecanismos imunológicos e as características dos indivíduos infectados por HDV na região Amazônica, o perfil de citocinas e os polimorfismos que podem interferir na gravidade de lesão hepática e consequentemente a suas formas mais graves como a fibrose, cirrose e o carcinoma hepatocelular. Os achados deste estudo poderão agregar novos conhecimentos para que sirvam como base para estudos futuros.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos Epidemiológicos da Hepatite Delta

Estima-se que existam aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo infectadas com o vírus da hepatite B (HBV), representando aproximadamente um terço da população mundial e mais de 350 milhões de pessoas infectadas cronicamente com o vírus, gerando em média 500.000 mortes por ano em decorrência de suas complicações, como a cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) (17,18).

Assim como o HBV, o HDV também é considerado endêmico. Estima-se que pelo menos 20 milhões de pessoas também estejam coinfectedos ou superinfectados pelo HDV. No entanto, esta estimativa torna-se inconsistente, podendo este número ser muito maior, uma vez que, lugares com alta prevalência de HBV nem sempre são associados com a presença do HDV e seus genótipos (19–21).

A região Amazônica brasileira ocupa aproximadamente 61% do território nacional (5,2 milhões de km²) com uma população relativa de 3.67 hab/km², apesar de estar sob forte expansão demográfica nas últimas décadas. Estima-se que cerca de 40% da população ainda esteja vivendo em áreas rurais de difícil acesso, dificultando ações preventivas de saúde pública tornando-se o ambiente propício para a propagação de doenças (22).

Segundos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) a região norte apresenta 75% (3.984) dos casos de hepatite D registrados entre os anos de 1999 a 2018 (23). A Amazônia ocidental brasileira é considerada área de alta endemicidade para HBV e HDV, especialmente as regiões situadas as calhas dos rios Purus, Juruá e Solimões, onde nota-se facilmente casos graves de hepatite aguda e crônica relacionadas a infecção por HDV (12,24,25).

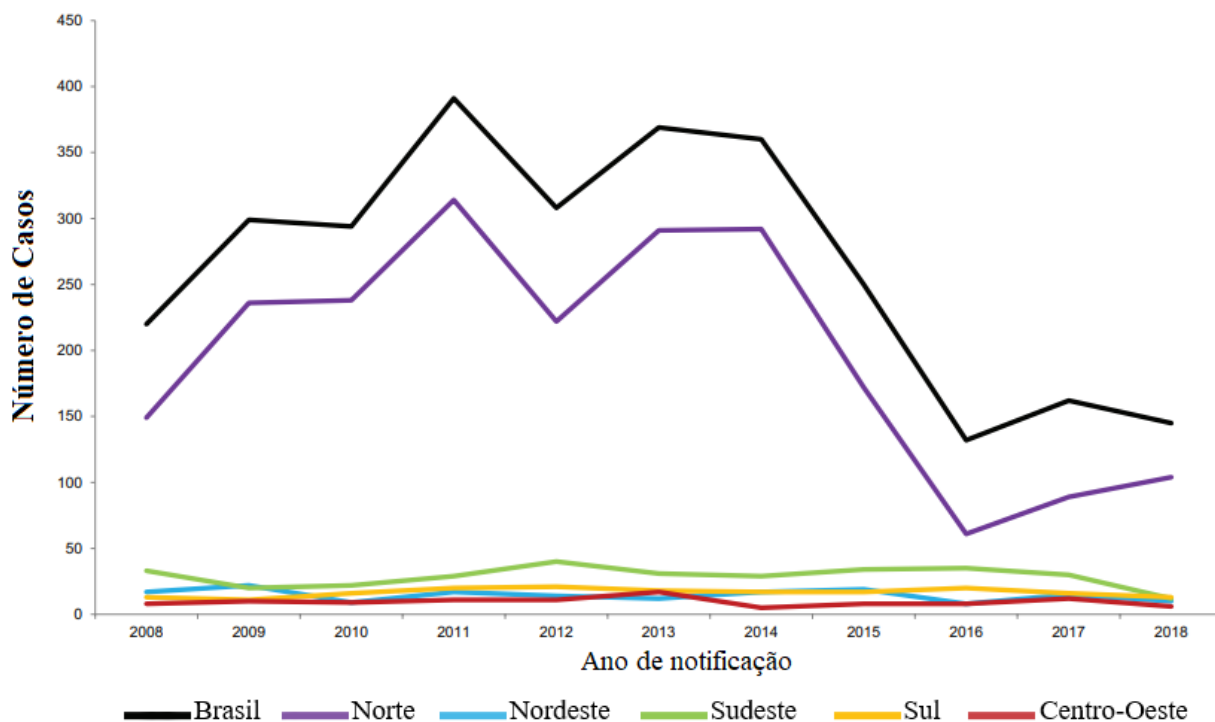


Figura 1. Prevalência de Hepatite D no Brasil.
Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde (23)

2.2. Hepatite Delta

2.2.1. O vírus da Hepatite Delta

O vírus da hepatite D, foi descrito primeiramente por Rizzetto e colaboradores (1977). O HDV foi classificado como o único membro da família *Deltaviridae* e gênero *Deltavírus*. Seu genoma é formado a partir de um RNA fita simples (ssRNA) de polaridade negativa, contendo em média 1.700 nucleotídeos, devido ao seu extenso emparelhamento as bases dentro da molécula aparecem como uma estrutura em forma de bastão de fita dupla (26,27).

O HDV é envolto pelo mesmo envelope do HBV, contendo as três isoformas do HBsAg (S, M e L do inglês, respectivamente, pequeno, médio e grande), do qual o HDV depende para que consiga exercer sua função patogênica e replicativa. Estas três isoformas tem em comum o C terminal, o S-HBsAg possui apenas o domínio S uma vez que o M-HBsAg, além do domínio S possui um domínio hidrofílico no N terminal denominado de Pré-S2, e por sua vez o L-HBsAg, além do domínio S e Pré-S2, possui um domínio adicional denominado de Pré-S1 (26,27) (**Figura 2**).

A ribonucleoproteína (RNP) presente nas partículas virais, e posteriormente nas células infectadas, contém o genoma do vírus e está associado as duas isoformas de HDAG, sendo elas: S-HDAg (pequeno), pesando aproximadamente 24Kda, composto por 195 aminoácidos, sendo um componente importante na replicação viral; L-HDAg (grande), pesando aproximadamente 27Kda, composto por 215 aminoácidos, sendo importante para o empacotamento de novos vírus. Este complexo, formado por RNP somado as duas isoformas do HDAG formam uma estrutura essencial para o tráfego nuclear de RNA do HDV e para a montagem viral (27,28).

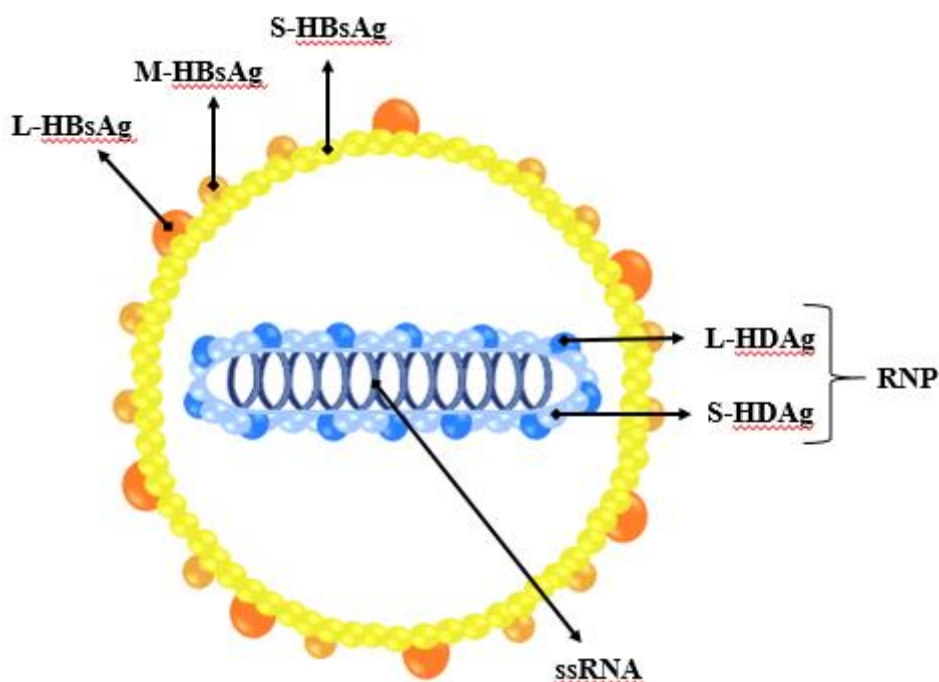


Figura 2. Representação esquemática do vírus da hepatite D.
Fonte: Adaptado de Alfaiate (28)

2.2.2. Ciclo de replicação viral

O HDV é considerado um vírus defeitivo, ou seja, necessita da presença da proteína HBsAg. Para um ciclo viral eficiente é necessário que a mesma célula esteja infectada com o HBV, no entanto demonstram seguir vias de replicação independentes (4).

Embora o ciclo replicativo do HDV ainda seja pouco definido, sabe-se que o processo de entrada do vírus no hepatócito seja similar a entrada do HBV, desta forma é possível que o HDV compartilhe o mesmo receptor de membrana do HBV, porém segue processo de replicação totalmente independente (4) (**Figura 3**).

Estudos anteriores destacam dois diferentes receptores que parecem estar envolvidos no mecanismo de entrada do vírus nos hepatócitos, sendo eles: o proteoglicano de sulfato heparan (PGHS) de baixa afinidade, e o polipeptídeo de controle de taurocolato de sódio (NTCP) de alta afinidade (29,30).

A principal função do NTCP é o transporte sódio e ácidos biliares por meio da membrana celular como parte da circulação entero-hepática, expresso principalmente em indivíduos que demonstraram suscetibilidade ao HBV. É considerado de alta afinidade pois o N-terminal da região pré-S1 do vírus se liga diretamente a NTCP, deste modo facilitando a entrada de HBV nos hepatócitos (31).

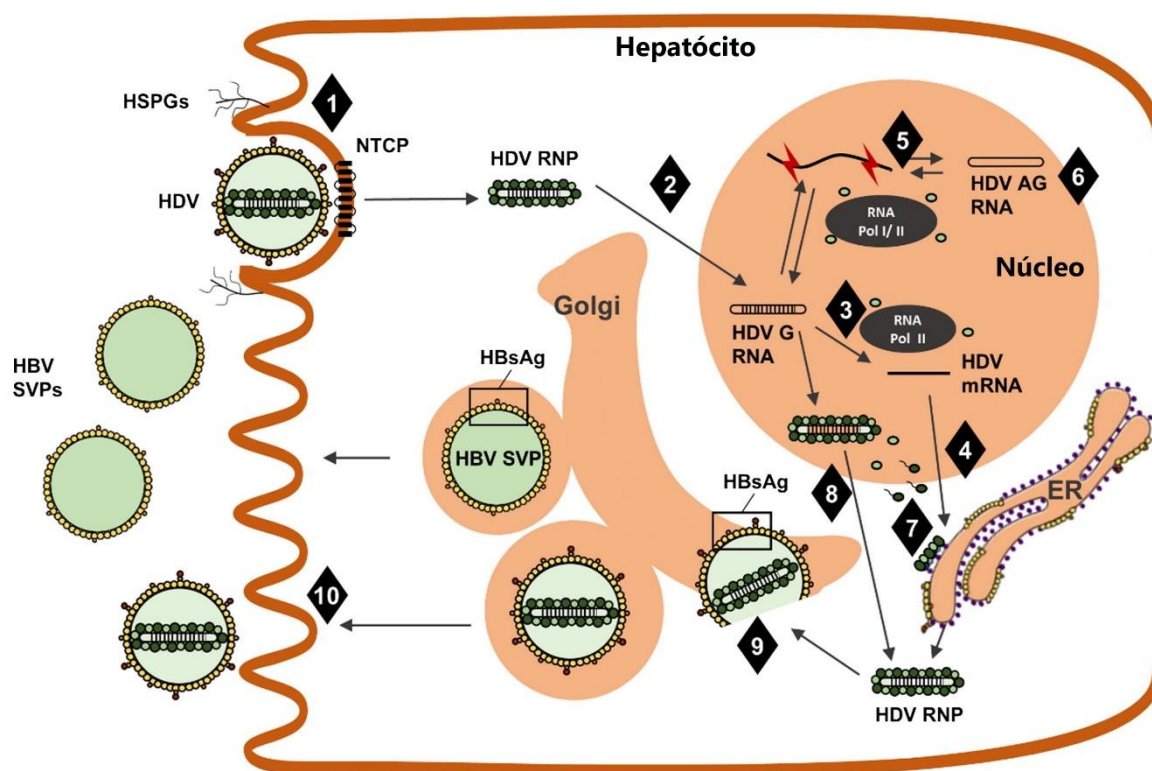


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de replicação viral.

Fonte: Adaptado de Mentha (27)

O HDV possui uma via de replicação chamada de “duplo círculo rolante” (*double-rolling circle*) que utiliza uma fita de RNA circular como seu molde, que posteriormente é transcrito por uma RNA polimerase dependente do hospedeiro (Pol II) ou de um outro vírus. Após sua entrada as novas fitas de RNA formadas são submetidas um processo de auto-clivagem mediadas por ribozimas para a produção de antigenomas HDV-RNA, que servirá como molde para RNAs multiméricos de polaridade genômica (32,33).

O RNA genômico (gRNA) do HDV associado ao seu antígeno formam uma ribonucleoproteína (RNP), essencial para a montagem de novos vírus e é um importante auxiliar no desnudamento e transporte nuclear. A RNP é importada para o núcleo da célula, onde o gRNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) e RNA antígenomico (agRNA). O mRNA é exportado para o citoplasmas onde é traduzido para S-HDAg no retículo endoplasmático (RE). Essas novas moléculas retornam ao núcleo, e juntamente como o L-HDAg associam-se ao gRNA para formação de novas RNPs, que são exportadas ao citoplasma, onde interagem com as proteínas HBsAg formando novas partículas virais, liberados através da via do corpo multivesicular (MVB) (28,34) (**Figura 3**).

2.2.3. Mecanismos imunes inatos e adaptativos no desenvolvimento da Hepatite Delta e fibrose hepática

A resposta imunológica contra o vírus da hepatite D ainda não é bem compreendida, no entanto, supõe-se que a infecção pelo HDV induz resposta imune celular semelhante a resposta imunológica específicas para a hepatite aguda clássica causada por HBV. (35,36).

A fase inicial da infecção viral é caracterizada pela ativação de células natural killer (NK), a fim de limitar a disseminação da infecção e para iniciar o desenvolvimento eficiente de uma resposta imunitária adaptativa (37). Essas células estão envolvidas na citotoxicidade direta de células infectadas, e induz a produção de citocinas como interferon- α e γ (IFN- α e IFN- γ) que desenvolve um estado antiviral contra os vírus, e fator de necrose tumoral (TNF- α) que apresenta interação com ligante indutor de apoptose (TRAIL), que induz morte celular dos hepatócitos (38)

O mecanismo de reconhecimento de células infectadas por vírus (DNA e RNA) e outros agentes infecciosos (fungos, protozoários e bactérias) é atribuído primeiramente a imunidade inata. Através do reconhecimento de estruturas virais e que possuem uma ampla variedade de moléculas ligadas em sua superfície que constituem os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) que interagem com diferentes receptores, dentre os quais estão presentes os receptores do tipo Toll-like (TLRs) que são uma classe de Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRR). Nos humanos, dos 10 TLRs funcionais descritos, quatro deles reconhecem ácidos nucleicos (TLR3,7,8 e 9) e estão localizados nos endossomos e são capazes de estimular e iniciar o processo de reconhecimento e resposta ao agente infeccioso (39,40).

Após o reconhecimento, as células dendríticas (DC), iniciam respostas imunitárias primárias, combinando a imunidade inata e adaptativa, o vírus é internalizado, ativa os linfócitos T CD4+, CD8+ e subpopulações de células Th (37). Após estimulação antigênica, as células T CD4+ se proliferam e se diferenciam em vários subconjuntos de células efetoras caracterizadas pela produção de citocinas distintas e por suas funções efetoras distintas (Th1, Th2, Th17, Treg), determinadas pelo perfil de citocinas produzidas e pelas propriedades funcionais (41,42).

A resposta celular mediada por linfócitos T CD4+ coordena subpopulações específicas e produção de citocinas na resposta imune, como produção de citocinas inflamatórias do perfil Th1 tais como, IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IFN, TNF, que estão envolvidos na imunidade celular efetora. As citocinas IL-4, IL-5, IL-13, IL-15 do perfil Th2 desencadeiam uma resposta humoral, junto com os linfócitos B levando a neutralização e opsonização do vírus, impedindo sua entrada nos hepatócitos (43–45).

Em resposta a produção de citocinas inflamatórias exacerbada contra os vírus, são produzidas citocinas T regulatórias como IL-10 e Fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), caracterizadas por regular as respostas imune, causando um efeito antagonista na ação de citocinas inflamatórias, que induz a supressão viral (39).

Os linfócitos T citotóxicos exercem papel importante na imunidade adaptativa, principalmente contra células infectadas por vírus e células tumorais. O reconhecimento do antígeno através da interação do TCR com o MHC de classe I e desencadeia a liberação de proteínas citotóxicas (perforinas, granzimas) pelos linfócitos T citotóxicos caracterizadas por levar a processos citolíticos e eliminação dos reservatórios virais (46,47).

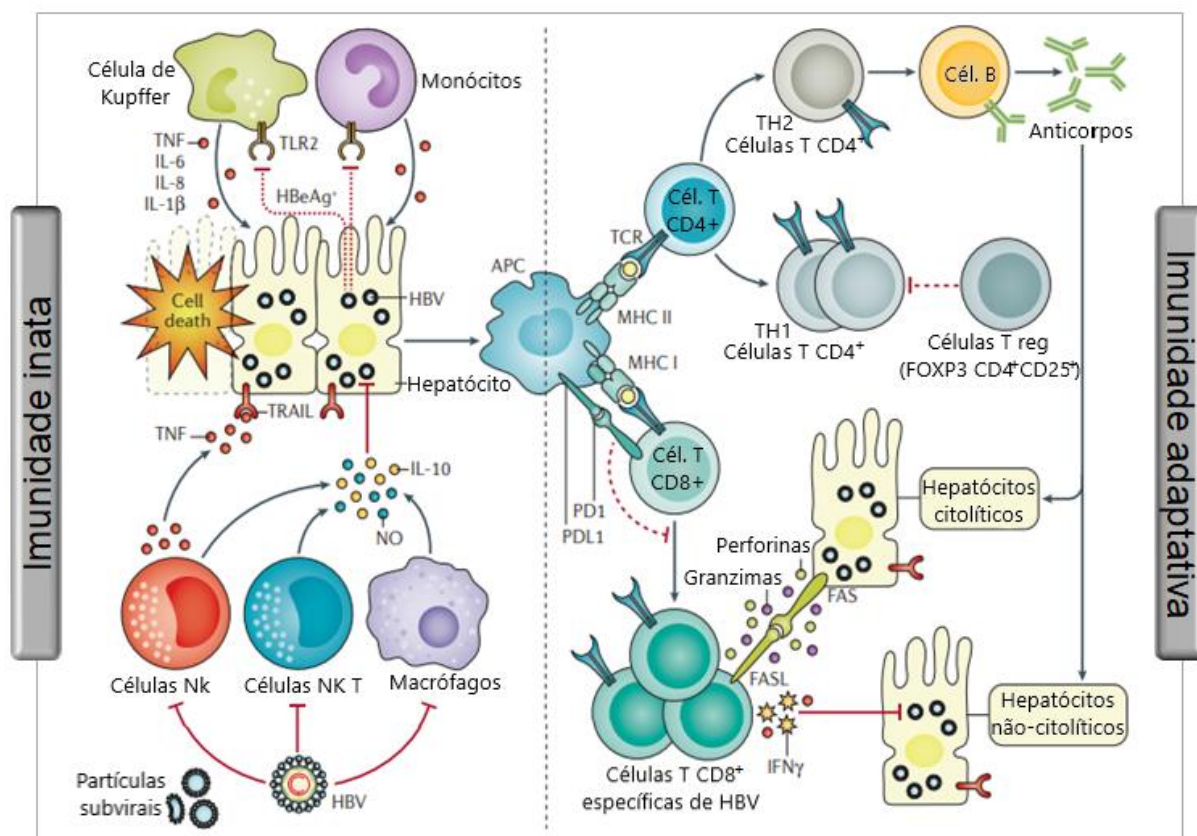


Figura 4. Representação esquemática da resposta imunológica contra vírus.

Fonte: Adaptado de Man-Fung Yuen (48)

A desregulação dessa resposta imunológica desencadeia um processo de inflamação hepática crônica levando a um processo fibrótico, onde o fígado torna-se incapaz de se regenerar, conseqüentemente formas mais graves como cirrose hepática e o HCC tendem a manifestar-se (49,50).

A proteína do HDAg ativa o fator de transcrição de NF-κB através do ácido hidrofosfórico oxidase-4 levando a um estado de estresse oxidativo dos hepatócitos que contribui para o processo de necroinflamação grave na infecção por HDV e sua progressão para HCC (4,51). O L-HDAg pode estimular a produção da citocina TGF-β que, por sua vez, induz a transformação das células estreladas em miofibroblastos, este processo leva a perda da microvilosidade da matriz extracelular ocasionando a fibrose. As células de Kupffer induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase que possibilita a toxicidade celular e conseqüentemente o estresse oxidativo e morte dos hepatócitos (4,52).

2.2.3.1. Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, atua na resposta imune inata e adaptativa, seu gene está localizado na posição 6p21.3, sendo uma região considerada altamente polimórfica, possui um peso molecular de aproximadamente 17Kd (53) (**Figura 5**).

O TNF- α tem como sua principal função o recrutamento de neutrófilos e mastócitos para a região infectada, além de promover inflamação e apoptose sobre as células do endotélio vascular e leucócitos. Em processos infecciosos agudos a produção de TNF- α é aumentada, ocorrendo a expressão de moléculas de adesão, além do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Além disso, células endoteliais e macrófagos que secretam quimiocinas que estimulam a ação de quimiotaxia e recrutamento de leucócitos (54).

Os polimorfismos associados ao gene TNF- α estão diretamente relacionados ao seu nível de produção, impactando diretamente na resposta inflamatória desenvolvida pelo indivíduo. Os polimorfismos mais investigados do gene TNF- α encontram-se nas posições -308G/A (rs1800629) e -238G/A (rs361525) (53,55).

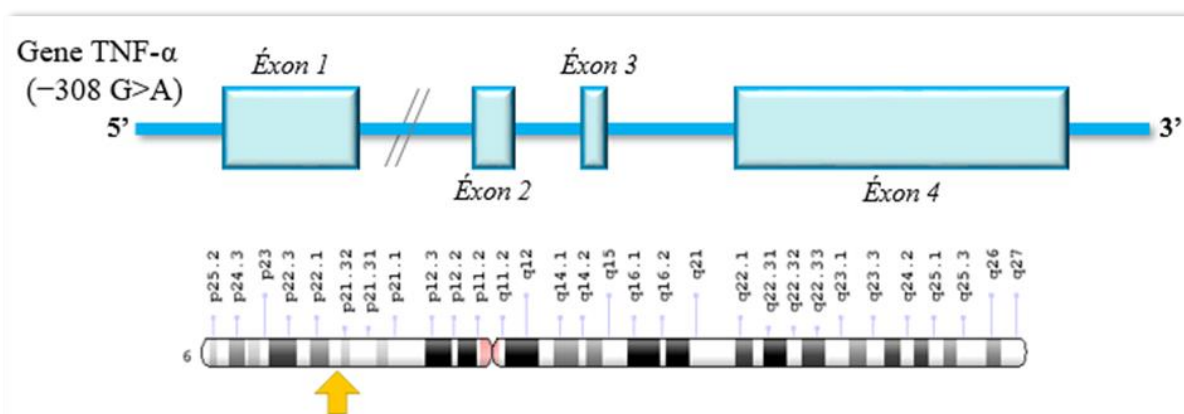


Figura 5. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800629 do gene TNF- α .

Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124 e ghr.nlm.nih.gov/gene/TNF#location

Estudos demonstram que o polimorfismo no gene *TNFA* -308G/A no HBV pode estar relacionado a diversos fatores como, por exemplo, o controle da infecção, susceptibilidade à infecção crônica pelo vírus da hepatite B ou ainda podendo ser associado com a progressão de doença hepática. O alelo -308A no gene TNF- α pode estar associado a quadros mais graves, como a progressão da fibrose e aumento na atividade necroinflamatória (56–58). No HCV este alelo também está pode estar associado a fibrose hepática avançada ou o risco de cirrose em infecção crônica pelo vírus (59).

A associação entre o polimorfismo genético do *TNF α* -308G/A e a suscetibilidade a outras patologias crônicas também foram relatadas (60–65). Em um estudo de revisão sistemática foi demonstrado que a variante homozigoto -308 A/A está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer do colo do útero (60). Os níveis elevados de TNF- α associados ao SNP rs1800629 foram observados em pacientes com cardiomiopatia dilatada indicando papel importante na patogênese da doença (61). A doença celíaca também demonstra ser influenciada pelo polimorfismo do gene *TNF α* -308G/A onde foram observadas associações significativas em quatro modelos genéticos (variante A vs. G; variante homozigoto A/A vs. G/G; recessivo A/A vs. G/G; e dominante A/A + A/G vs. G/G) (65).

2.2.3.2. Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica, participa na promoção da síntese de proteínas de fase aguda em hepatócitos e caracteristicamente possui propriedades pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, é produzida por diferentes tipos celulares, principalmente por linfócitos T, macrófagos e monócitos. Esta citocina contribui para a defesa do hospedeiro durante a infecção, lesão tecidual, inflamação e hematopoese (66).

Seu gene codificador está situado na posição 7p15, possuindo 5 éxons. Dentro desta região promotora já foram descritos vários polimorfismos que são relacionados a níveis alterados de transcrição do gene, bem como o rs1800795 (-174G/C), o rs1800796 (-572G/C), e rs1800797 (-597C/A). Os genótipos -174G/G e -174G/C foram relacionados aos níveis elevados de IL-6, enquanto o genótipo -174C/C foi relacionado como um baixo produtor de IL-6 (67,68).

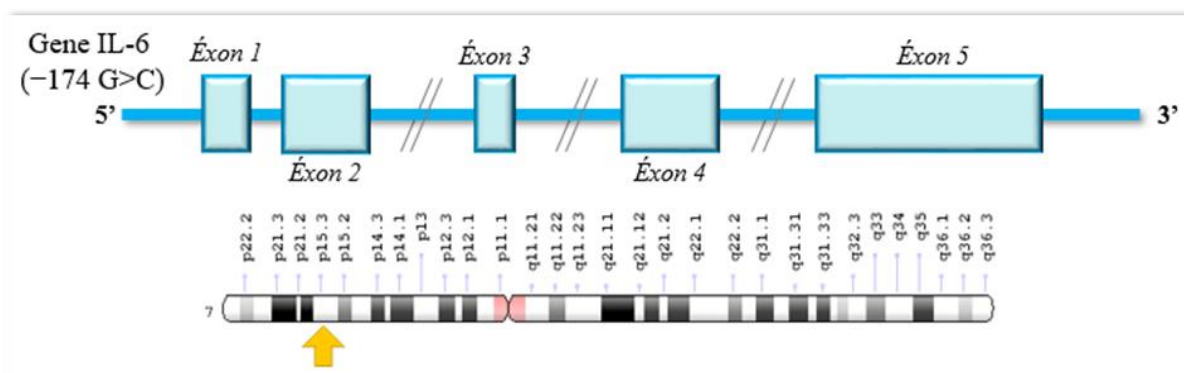


Figura 6. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800795 do gene IL-6.

Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569 e ghr.nlm.nih.gov/gene/IL6#location

Este polimorfismo foi descrito pela primeira vez em 1998, em pacientes com artrite crônica juvenil de início sistêmico, onde foi examinado a região flanqueadora 5' do gene da IL-6 em busca de polimorfismos, sendo então detectado na posição -174. Este estudo demonstrou que o alelo C estava relacionado a níveis significativamente mais baixos de IL-6 plasmática atribuindo função protetora contra o desenvolvimento da doença ao contrário do que aconteceria com os genótipos G/G ou G/C (69).

A associação entre o polimorfismo genético da IL-6 na posição -174G/C na região promotora também foi relacionado a outras patologias, como diabetes tipo 2 (70), cardiopatias (71), obesidade (72), linfoma de Hodgkin (73), em diferentes tipos de câncer (74–76), doença de Alzheimer (77), derrame (78) e complicações após transplantes ou enxertos de órgãos (79).

Há descrito na literatura que o polimorfismo na posição -174G/C na região promotora do gene IL-6 pode estar envolvido na modulação da atividade inflamatória, bem como na progressão da fibrose em indivíduos infectados com HCV (80,81). Em estudo realizado por Barret et al. o genótipo C/C observado neste polimorfismo se caracteriza a uma menor produção de IL-6, estando associado com a depuração do HCV, enquanto que a presença dos genótipos G/C ou G/G estar relacionada a uma maior produção da citocina (82).

Um estudo conduzido por Giannitrapani e colaboradores com portadores de polimorfismo na região promotora -174G/C (*rs1800795*) da IL-6 possuem predisposição genética para produzir níveis mais altos de IL-6, que pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento do CHC em pacientes cirróticos (83).

2.2.3.3. Interleucina-10 (IL-10)

O gene interleucina-10 (IL-10), cujo gene codificador está localizado no cromossomo 1 (1q31-1q32), é responsável pela citocina imunorreguladora produzida por células do perfil Th2, pode ser produzida por uma variedade de células imunes adaptativas, incluindo macrófagos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), Células T CD4, CD8 e células B, podendo tanto estimular quanto suprimir a resposta imune. Possui 5 éxons e aproximadamente 5,2 Kb. Dentro desta região promotora já foram descritos vários polimorfismos -1082A/G (*rs1800896*), -819C/T (*rs1800871*) e -592C/A (*rs1800872*) chamados de bialélicos (84,85).

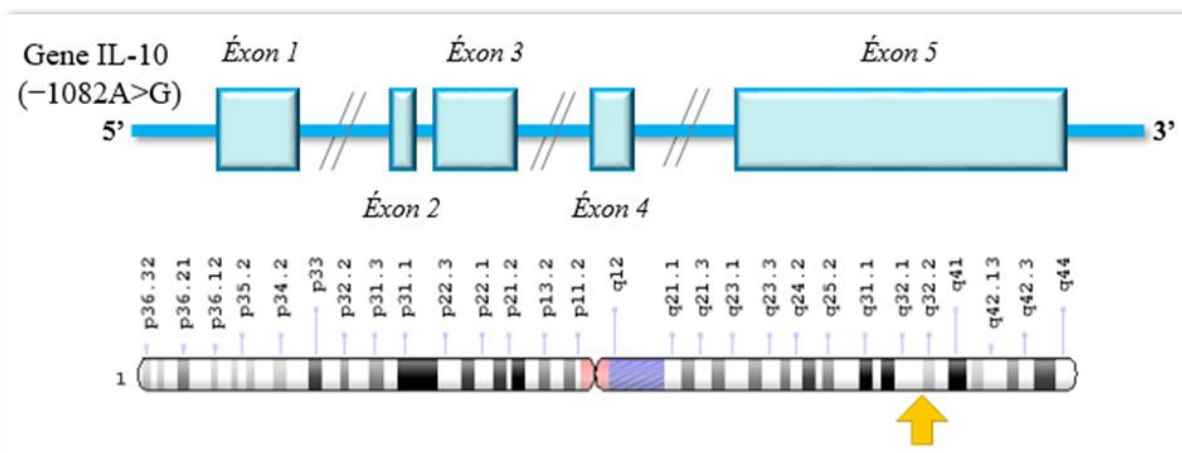


Figura 7. Representação esquemática da localização do polimorfismo rs1800896 do gene IL-10.
Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586 e ghr.nlm.nih.gov/gene/IL10#location

É comum que a IL-10 atue como um regulador á respostas inflamatórias, embora seu efeito antiviral dependa das particularidades do vírus, do local da infecção, tempo de resposta e assim por diante. Os polimorfismos existentes na região promotora -1082, expressam genótipos A/A, A/G e G/G, que correspondem a níveis baixos, intermediários e altos na produção de citocinas, respectivamente. Em infecções persistentes, como as hepatites a IL-10 atua inibindo a ativação das células T CD4⁺ e CD8⁺, fenômeno chamado esgotamento (ou exaustão) de células T, ou seja, perdem a capacidade de produzir citocinas antivirais, eliminar as células infectadas e proliferar em resposta à estimulação do antígeno (86,87).

É relatado que os polimorfismos relacionados ao gene *IL10* -1082A/G estão relacionados a infecção a longo prazo da hepatite B crônica. Alguns estudos demonstram que o polimorfismo na região promotora -1082 pode estar associado a progressão da fibrose hepática e na suscetibilidade à cirrose nos indivíduos infectados por HBV ou HCV (88–90). No estudo de Gao et al. foi relatado que o genótipo A/A do polimorfismo no gene *IL10* -1082A/G está associado a risco aumentado de persistência viral, enquanto o genótipo A/G foi associado a um menor risco de persistência da infecção tanto por HBV quanto por HCV (88).

A relação entre o polimorfismo no gene *IL10* -1082A/G e a suscetibilidade a outras patologias também foram descritas, incluindo a predisposição genética ao lúpus eritematoso sistêmico (LES) onde foi observada uma tendência de predisposição genética para o LES para o genótipo IL10 -1082 G/G, aumentou significativamente o risco de desenvolver LES (91); suscetibilidade à diabetes mellitus tipo 2, cujo os pacientes portadores do genótipo -1082 G/G apresentaram risco significativamente aumentado de

diabetes mellitus tipo 2 (92); suscetibilidade ao câncer de mama onde a associação entre o genótipo G/G e o aumento do risco de câncer de mama foi mais significativa (93).

Diante do exposto este trabalho se propõe em compreender a influência dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) nos genes da citocina Fator De Necrose Tumoral α (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) em pacientes com Hepatite Delta no Estado do Amazonas e seus desdobramentos sobre o curso da doença.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Avaliar a influência dos polimorfismos nos genes das interleucinas Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), da Interleucina 6 (IL-6) e da Interleucina 10 (IL-10) em pacientes com Hepatite Delta.

3.2. ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência dos SNPs das citocinas *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* em pacientes com Hepatite Delta e no grupo controle;
- Investigar a associação dos SNPs das citocinas *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* em pacientes com Hepatite Delta com as alterações laboratoriais e clínicas;
- Associar os polimorfismos nos genes das citocinas *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* ao perfil de citocinas de pacientes com Hepatite Delta, buscando descrever possíveis associações com a progressão da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo do tipo caso-controle, transversal e retrospectivo realizado em pacientes com Hepatite Delta, atendidos no ambulatório de hepatologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). O presente estudo constitui subprojeto de um projeto maior da linha de pesquisa sobre Hepatites virais intitulado: “*Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não invasivos na região Norte do Brasil*”.

4.2. Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas em parceria com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), centro de referência no ensino, pesquisa e assistência às doenças tropicais, infecciosas e parasitárias no Estado do Amazonas.

4.3. População de Estudo

A população de estudo foi composta por setenta e sete (77) pacientes diagnosticados com Hepatite Delta que foram incluídos no estudo os pacientes que foram convocados a comparecerem no ambulatório de hepatologia da FMT-HVD, no período de janeiro a março de 2016, e cento e trinta e sete (137) doadores de sangue elegíveis para o estudo que compõem o grupo controle. O software Quantum Geographic Information Systems (QGIS) versão 2.18 (OSGeo, Beaverton, OR, EUA) foi utilizado para construção do mapa de distribuição da população do grupo HDV de acordo com o local de nascimento.

4.4. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico de hepatite D confirmados com testes sorológicos, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, em tratamento com análogos de nucleosídeos, com e sem a presença de fibrose ($\leq F2$ e $>F2$), que procurarem atendimento na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) e aceitaram participar do projeto, mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

Foram excluídos indígenas, pacientes com história de uso de drogas ilícitas nos últimos sete anos, pacientes com relato de consumo diário de bebida alcoólica, pacientes com distúrbios psiquiátricos, pacientes renais crônicos, pacientes com síndrome plurimetabólica e pacientes grávidas. Além dos pacientes que apresentarem co-infecção com os vírus da hepatite C (anti-HCV), vírus da imunodeficiência adquirida-HIV (anti-HIV-1 e 2), HTLV (anti-HTLV I e II), confirmados por RT-PCR e Teste de Ácido nucleico (NAT).

Para o grupo controle, foram selecionados doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 a 65 anos e residentes em Manaus, que não apresentaram reatividade para Hepatite B (anti-HBc, HBsAg), HCV (anti-HCV), HIV (anti-HIV-1 e 2), HTLV (anti-HTLV I e II), doença de Chagas (teste ELISA), sífilis (VDRL).

4.5. Aspectos Éticos

Este trabalho foi julgado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). As amostras do grupo HDV foram obtidas a partir do projeto intitulado “*Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não invasivos na região Norte do Brasil*” aprovado sob o número de CAAE 46865015.8.3001.5262.

As amostras do grupo controle utilizadas neste estudo foram obtidas a partir dos projetos “*Identificação e Seleção de Peptídeos Miméticos Reativos aos soros de pacientes HCV+ e sua influência no desenvolvimento da fibrose hepática in vitro*” aprovado sob o número de CAAE 49652815.8.0000.0009 e “*Avaliação o perfil celular humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus*” aprovado sob o número de CAAE 0024.0.112.000-10.

4.6. Coleta de Material Biológico

As amostras para este estudo foram coletadas por punção venosa. O volume total de 10 mL de sangue periférico foram distribuídos em dois tubos, onde 5 mL em tubo PPT (Plasma Preparation Tube, Vacuntainer BD) para procedimentos referentes à determinação do polimorfismo das citocinas propostos, e 5 mL em um tubo sem anticoagulante, no qual foi reservado para dosagem de citocinas previstas pelos projetos.

As amostras foram processadas no Laboratório Multidisciplinar da Fundação Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, os quais soro e plasma foram separados por centrifugação a 1400 g por 5 minutos (rpm), e, juntamente com a fração celular. O material biológico foi congelado à -80 °C até o momento de serem realizados os procedimentos. As análises bioquímicas (TGO, TGP) e hematológicas (Hemograma) foram processadas no Laboratório de Análises Clínicas da Fundação Hemoam.

4.7. Extração de DNA

A extração do DNA das amostras foi realizada a partir de 200µL de sangue total utilizando-se o Kit Brazol® (Cat. N° 13-BR188, LGC Biotecnologia) e seguindo as instruções do fabricante (94).

As amostras foram inicialmente lisadas em solução de Brazol a 4°C sob agitação vigorosa. Após a homogeneização, adicionou-se 100 µL de clorofórmio a 4°C nas amostras, sob agitação vigorosa e, em seguida, centrifugou-se as mesmas por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Posteriormente, observou-se que o produto resultante apresentou duas fases visíveis. Retirou-se cuidadosamente a fase superior contendo DNA genômico e transferiu-se para tubos de 1,5 mL previamente identificados. O DNA extraído foi precipitado através da adição de 500 µL de etanol 100% a 4°C, seguido de centrifugação por 15 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante.

A etapa de precipitação foi repetida, seguida de centrifugação por 12 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente e descarte do sobrenadante. Removeu-se o etanol residual em banho seco a 56°C por 10 minutos. Por fim, o precipitado foi hidratado em 100 µL de água ultrapura e armazenado em freezer a -20 °C.

4.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As regiões genômicas de interesse dos genes IL-6, TNF e IL-10 foram amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, PCR, Polymerase Chain Reaction) sob condições uniformes, seguida por análise dos polimorfismos do comprimento do fragmento de restrição (RFLP). A amplificação foi realizada utilizando o termociclador da Applied Biosystems (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA), os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese a 100 V por 45 min em gel de agarose com tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X) (estoque TAE 40 - trisase 1,6 M, acetato de sódio 0,8 M e sal dissódico do ácido etilenodiaminotetraacético 40 mM / 1000 mL de água desionizada) contendo brometo

de etídeo e posteriormente foram visualizados pelo transiluminador de luz UV ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad), conforme descrita por Tarragô e colaboradores (95).

4.2. Genotipagem dos Polimorfismos nos Genes Fator De Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10)

O sítio polimórfico G/A na posição -308 da região promotora do gene da citocina TNF- α (147pb), C/G na posição -174 da região promotora da citocina IL-6(169pb), e G/A na posição -1082 da região promotora da citocina IL-10 (125pb), seguiram as referências para a realização da genotipagem dos SNPs, conforme especificado na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos polimorfismos.

Polimorfismo	Sequência 5' → 3'	Enzima de Restrição	Alelos e Fragmentos (bp)
TNF- α (rs1800629)	5' GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT 3' 5' GGGACACACAAGCATCAAG 3'	<i>Nco I</i>	147, 126, 21pb G/A 126, 21pb G/G 147pb A/A
IL-6 (rs1800795)	5' AAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCT 3' 5' ATCTTTGTTGGAGGGTGAGG 3'	<i>Nla III</i>	169, 87pb C/G 87, 88pb C/C 169pb G/G
IL-10 (rs1800896)	5' TCTGAAGAAGTCCTGATGTC 3' 5' CTCTTACCTATCCCTACTTCC 3'	<i>Mnl I</i>	125, 93, 65pb A/G 125, 65pb A/A 93, 65pb G/G

*rs: Sequência de referência; *bp: Pares de bases

4.3. Dosagem de Citocinas Plasmáticas por CBA (Cytometric Bead Array)

A dosagem de citocinas das amostras de plasma dos pacientes com hepatite Delta e do grupo controle foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando o kit Th1, Th2 e Th17 *BD*, *Cytometric Bead Array* (CBA) com o Kit *BDTM Human Th1/Th2/Th17 Cytokine* (*BD@Biosciences, San Diego, CA, USA*), de acordo com as especificações descritas pelo fabricante. Foram quantificadas as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL17A.

O Kit *BDTM CBA* utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada a um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE) conjugado a anticorpos que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a

bead. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da citometria de fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo BD FACS Canto II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do HEMOAM.

Para o cálculo das concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina foi utilizado o software *FCAP-ArrayTM* (v3.0.1).

4.4. Avaliação do Estadiamento da Doença Hepática

O grau de acometimento hepático pode ser estabelecido por meio da avaliação da biópsia hepática (padrão ouro), elastografia hepática transitória e também por meio da aplicação de índices APRI (AST to Platelet Ratio Index) e FIB-4 (Fibrosis-4). O APRI e o FIB-4 são métodos não invasivos, recomendados pela Organização Mundial de Saúde desde 2014 e podem ser obtidos por meio do cálculo matemático simples utilizando os resultados de exames laboratoriais (96,97).

O APRI é calculado a partir da fórmula:

$$\text{APRI} = \frac{\frac{\text{Valor de AST (UI/L)}}{\text{Limite Superior Normal de AST (UI/L)}}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)}} \times 100$$

O FIB-4 é calculado a partir da fórmula:

$$\text{FIB4} = \frac{\text{Idade (anos)} \times \text{AST (UI/L)}}{\text{Contagem de Plaquetas (10}^9\text{)} \times \sqrt{\text{ALT (UI/L)}}}$$

Os resultados de fibrose ausente/inicial ou avançada, são obtidos por meio de pontos de corte preestabelecidos conforme observados no Quadro 01.

METAVIR	APRI (Baixo corte)	APRI (Alto corte)	FIB-4 (Baixo corte)	FIB-4 (Alto corte)
METAVIR F2 (Fibrose moderada)	0,5	1,5	1,45	3,25
METAVIR F4 (Cirrose)	1,0	2,0	-	-

Quadro 1. Detecção de cirrose e fibrose moderada conforme valores de APRI e FIB-4.
Fonte: BRASIL (97)

4.5. Análise Estatística

Os resultados deste estudo foram tabulados e armazenados por meio do Software Microsoft Excel® (versão 2017 para Windows). O software Graphpad Prism v.5 (San Diego, CA, EUA) foi utilizado para análise comparativa de citocinas circulantes entre os genótipos dos SNPs estudados. As variáveis contínuas foram analisadas pelos testes não paramétricos de Mann-Whitney/Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunns para comparar pares. O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados, sendo aplicadas nos dois grupos, através do site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

5. RESULTADOS

5.1. Dados demográficos e características clínicas

Foram incluídos neste estudo 214 indivíduos, dos quais 137 doadores de sangue (grupo controle) e 77 eram pacientes diagnosticados com HDV. Dentre os indivíduos inclusos neste estudo, observou-se maior predomínio do sexo masculino, tanto no grupo controle (69%) quanto em pacientes HDV (53%). O sexo feminino demonstrou frequência de 31% para o grupo controle e 47% em pacientes HDV.

A mediana de idade observada para os indivíduos constituintes do grupo controle foi de 30 [22 – 39] anos e para os pacientes HDV foi de 45 [38 – 53]. As informações demográficas encontram-se resumidas na tabela 2.

Tabela 2. Dados demográficos de indivíduos submetidos ao estudo.

Grupo	Sexo		Idade (Mediana [IQR])
	Feminino	Masculino	
Controle (n = 137)	42 (31%)	95 (69%)	30 [22 – 39]
HDV (n = 77)	36 (47%)	41 (53%)	45 [38 – 53]

M- mediana; IQR- amplitude interquartil

Distribuímos os 77 indivíduos que compuseram o grupo HDV por naturalidade tendo como base as calhas dos principais rios da região, sendo que 11 indivíduos (12%) declararam sua naturalidade de outros estados brasileiros, como Acre, Roraima e Maranhão. Pode-se observar alta prevalência na população nascida na área do vale do rio Juruá (38%), seguida do vale do Purus (20%), médio Solimões (14%), alto Solimões (11%) (**Figura 8**).

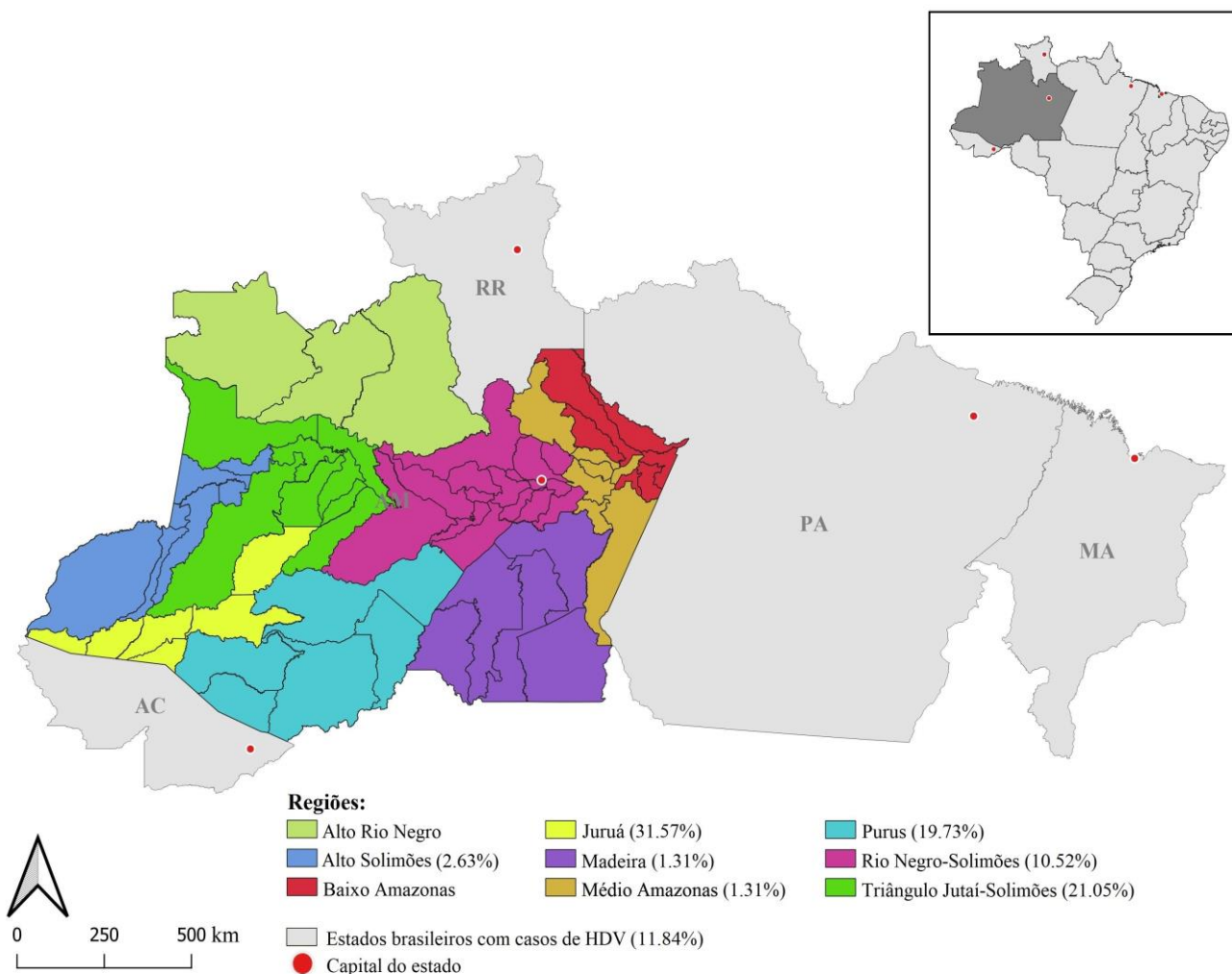


Figura 8. Distribuição da população do grupo HDV segundo a naturalidade.

Fonte: Próprio autor.

Em relação ao perfil hematológico, os valores do hematócrito (Hct) ($p < 0,0012$) e dos eritrócitos (RBC) ($p < 0,0001$) apresentaram valores médios aproximados entre os dois grupos, embora tenham sido estatisticamente significativos. Em relação à faixa de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), o grupo HDV também apresentou valores estatisticamente superiores ao grupo controle ($p < 0,0001$) (**Tabela 3**).

A contagem global do número de leucócitos totais (WBC) também demonstrou significância estatística ($p < 0,0001$) entre os grupos, onde o grupo HDV (4,5 [3,5 - 6,4]) apresentou mediana menor que o grupo controle (6,9 [5,8 - 8]). Na contagem diferencial de cada tipo de célula para os dois grupos, foram analisados os valores de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos, onde apenas linfócitos e eosinófilos se mostraram estatisticamente significativos ($p < 0,0002$ e $p < 0,0079$, respectivamente). Os linfócitos mostraram uma mediana significativamente menor em pacientes com HDV (24,8 [19,7 - 31,6]) quando comparados ao

grupo controle (30,1 [25,2 - 34,7]), enquanto a mediana de eosinófilos estava significativamente aumentada em indivíduos do grupo HDV (4 [2,1 - 7,1]) quando comparado ao grupo de controle (2,7 [1,7 - 7,1]) (**Tabela 3**).

Em relação à contagem de plaquetas, o grupo HDV (104 [39,5 - 152]) apresentou mediana inferior em comparação ao grupo controle (313 [264 - 368]) ($p < 0,0001$). Contudo, o volume médio plaquetário (VPM) não apresentou diferença significativa ($p < 0,1542$) entre os grupos (**Tabela 3**).

O perfil hematológico do grupo HDV também foi analisado de acordo com a gravidade de doença hepática através do FIB-4 score, onde os pacientes foram classificados como $\leq F2$ e $> F2$. O valor de WBC no grupo HDV $> F2$ apresentou média estatisticamente menor do que o grupo HDV $\leq F2$ ($p < 0,0001$). Por outro lado, os valores de VCM ($p < 0,0492$) e RDW ($p < 0,0036$) demonstraram ser estatisticamente maior no grupo HDV $> F2$ quando comparado com o grupo HDV $\leq F2$. Na contagem diferencial de tipo celular para o grupo HDV $\leq F2$ e HDV $> F2$ demonstrou diferença estatística significativa apenas para linfócitos ($p < 0,0243$) e monócitos ($p < 0,0295$). O plaquetograma também apresentou valores estatisticamente menores para o número de plaquetas ($p < 0,0001$) e para o Volume Plaquetário Médio (VPM) ($p < 0,0101$) em pacientes HDV $> F2$ quando comparados com o grupo de pacientes HDV $\leq F2$ (**Tabela 3**).

Os marcadores hepáticos, transaminase glutâmico-oxaloacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), mostraram maiores concentrações no grupo HDV ($p < 0,0001$) quando comparados ao grupo controle ($p < 0,0001$), ambos sendo estatisticamente significantes (**Tabela 4**).

O grupo HDV também foi analisado de acordo com a gravidade de doença hepática através do FIB-4 score, onde os pacientes foram classificados como $\leq F2$ e $> F2$. Onde o grupo HDV $\leq F2$ ($p < 0,0001$) e $> F2$ ($p < 0,0001$) demonstraram ser estatisticamente significantes (**Tabela 4**).

Tabela 3. Características clínicas da população de estudo.

Variáveis hematológicas	Controle (n=137) (M ±DP)	HDV (n=77) (M ±DP)	P	Score FIB-4 (grupo HDV)		p
				≤F2 (n = 39)	>F2 (n = 38)	
Hemograma						
Hb (g/dl)	14.3 [12.2 – 15.3]	13.9 [12.2 – 15.1]	0.0764	13.9 [12.8 – 15.4]	13.7 [11.8 – 15]	0.5821
Hct (%)	44.4 [40.8 – 47.1]	41.3 [36.8 – 46.2]	< 0.0012	41.3 [38.3 – 45.8]	41.2 [34.8 – 46.3]	0.6948
RBC (μl)	4.9 [4.6 – 5.3]	4.5 [4 – 5]	< 0.0001	4.6 [4.1 – 5.2]	4.4 [3.8 – 4.7]	0.1239
WBC (μl)	6.9 [5.8 – 8]	4.5 [3.5 – 6.4]	< 0.0001	6.7 [4.9 – 7.2]	3.7 [2.9 – 4.4]	< 0.0001
MCV (fL)	89.1 [86.5 – 91.6]	91.9 [83.5 – 94.7]	0.0824	89.4 [82.2 – 92.8]	92.6 [86.9 – 98.4]	< 0.0492
MCH (pg)	28.8 [28 – 29.8]	30.8 [28.6 – 32.2]	< 0.0001	30.2 [28.4 – 31.4]	31.3 [29 – 32.6]	0.0988
MCHC (g/dL)	32.4 [31.8 – 32.8]	31.7 [30.5 – 33.2]	0.0313	32 [31.1 – 34]	31.5 [30.2 – 32.4]	0.0932
RDW (%)	13.2 [12.7 – 13.8]	14.9 [13.9 – 15.9]	< 0.0001	14.6 [13.5 – 15.1]	15.5 [14.4 – 16.5]	< 0.0036
Leucograma						
Neutrófilos (%/mm3)	58.2 [52.6 – 63.4]	56.7 [47.4 – 64.5]	0.4890	56.6 [46.2 – 63.5]	56.7 [47.6 – 64.5]	0.9878
Linfócitos (%/mm3)	30.1 [25.2 – 34.7]	24.8 [19.7 – 31.6]	0.0002	27.9 [23 – 32.6]	23.1 [17.3 – 28]	< 0.0243
Monócitos (%/mm3)	5.7 [5 – 6.7]	6 [5.3 – 7.9]	0.0779	5.7 [5.1 – 6.7]	6.2 [5.4 – 8.7]	< 0.0295
Eosinófilos (%/mm3)	2.7 [1.7 – 7.1]	4 [2.1 – 7.1]	0.0079	3.1 [1.9 – 5.5]	4.7 [2.8 – 10]	0.0779
Plaquetograma						
PLT (/mm3)	313 [264 – 368]	104 [39.5 – 152]	< 0.0001	149 [116 – 182]	41.5 [29 – 66]	< 0.0001
MPV (fL)	8.4 [7.4 – 9.5]	8 [7.3 – 9]	0.1542	7.8 [7.1 – 8.4]	8.4 [7.5 – 9.9]	< 0.0101

O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para obter o p-valor; M- média; DP- desvio padrão

Tabela 4. Características bioquímicas dos marcadores de dano hepático.

Variáveis bioquímicas	Controle (n = 137) (M ±DP)	HDV (n = 77) (M ±DP)	p	Score FIB-4 (grupo HDV)		p
				≤F2 (n = 39)	>F2 (n = 38)	
Marcadores hepáticos						
TGO (U/L)	24.10 ±23.81	54.16 ±34.63	< 0.0001	32.87 ±16.40	76.00 ±34.92	< 0.0001
TGP (U/L)	25.20 ±22.85	47.68 ±31.79	< 0.0001	36.36 ±27.94	59.29 ±31.64	< 0.0001

O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para obter o p-valor; M- média; DP- desvio padrão

5.2. Frequências alélicas e genotípicas

Os grupos populacionais foram submetidos ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para este estudo (para *TNFA* -308G/A p(HWE)= 0.4583; *IL6* -174G/C p(HWE)= 0.8407; *IL10* -1082A/G p(HWE) = 0.4727), onde foram comparadas as frequências alélicas e genotípicas para os SNPs TNF- α , IL-6 e IL-10 entre os grupos controle e grupo HDV (**Tabela 05**).

Com relação ao gene *TNFA* -308G/A, a maior frequência genotípica observada foi G/G tanto para o grupo controle (94.2%) quanto para o grupo HDV (84.4%), seguido do genótipo G/A no grupo HDV (15,6%) quando comparado ao grupo controle (5.8%). O cruzamento entre as variantes dos genótipos G/G vs. G/A (p<0.0187) demonstrou resultado estatístico significativo (**Tabela 5**).

Quando segregamos o grupo HDV de acordo com o grau de fibrose observamos que o genótipo G/G foi mais frequente tanto para HDV ≤F2 (82%) quanto para HDV >F2 (86.8%). O cruzamento entre as variantes dos genótipos e alelos G vs. A não demonstrou resultado estatístico significativo (**Tabela 5**).

Quanto ao gene *IL6* -174G/C a frequência do genótipo G/G no grupo controle e HDV foi de 81.8% e 66.2%, respectivamente. A presença do genótipo heterozigoto G/C apresentou frequência de 16.8% para o grupo controle e 29.9% para o grupo HDV, enquanto o genótipo C/C demonstrou baixa frequência tanto no grupo controle 1.5% quanto no grupo HDV 3.9%. A associação entre os genótipos G/G vs. G/C (p<0.0191) e G/G vs. G/C+C/C (p<0.0106) demonstraram ser estatisticamente significantes, bem como o cruzamento alélico G vs. C (p<0.0082) (**Tabela 5**).

A frequência do genótipo G/G no grupo HDV \leq F2 e $>$ F2 foi de 74.3% e 57.8%, respectivamente. Para o genótipo G/C a frequência foi de 25.6% para HDV \leq F2 e 34.2% para HDV $>$ F2. O genótipo C/C foi observado apenas no grupo HDV $>$ F2 (7.8%). Apenas a associação entre os alelos G vs. C demonstrou ser estatisticamente significativo ($p < 0.05326$) (**Tabela 5**).

Para o gene *IL10 -1082A/G* a frequência genotípica de A/A foi de 54% para o grupo controle e 49,4% para o grupo HDV. O genótipo heterozigoto A/G apresentou frequência de 40.1% para o grupo controle e 44.2% para o grupo HDV, enquanto o genótipo G/G foi de 5.8% para o grupo controle e 6.5% para o grupo HDV. As associações dos genótipos não apresentaram resultados estatísticos significantes (**Tabela 5**).

A frequência do genótipo A/A no grupo HDV \leq F2 e $>$ F2 foi de 51.2% e 47.3%, respectivamente. Para o genótipo A/G a frequência foi de 41% para HDV \leq F2 e 47.3% para HDV $>$ F2. A frequência do genótipo G/G foi 7.6% para HDV \leq F2 e 5.2% para HDV $>$ F2. A associação dos genótipos não apresentaram resultados estatísticos significantes (**Tabela 5**).

Quanto a frequência alélica observada para os genes *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* foram os alelos G, G e A, respectivamente (**Tabela 5**).

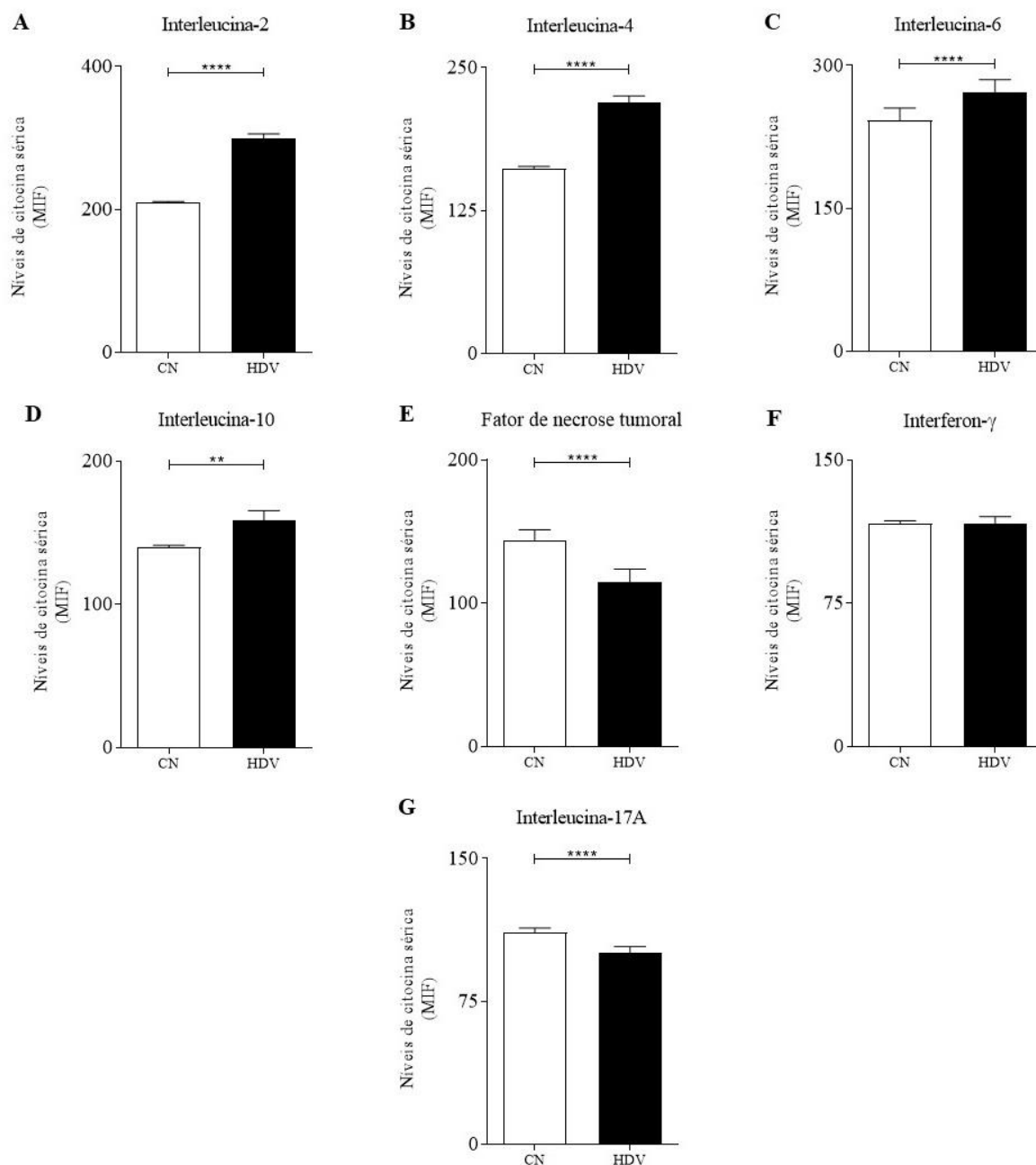
Tabela 5. Distribuição das frequências genótípicas e alélicas nos genes das citocinas TNF α -308G/A, IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G.

Perfil Genotípico e Alélico	Controle (n=137)	HDV (n=77)	OR (CI 95%)	P	HDV		OR (CI 95%)	p	
					≤F2 (n=39)	>F2 (n=38)			
<i>TNFα -308G/A (rs1800629)</i>									
G/G	129 (94.2%)	65 (84.4%)	2.977 (1.159 - 7.645)	0.0187	32 (82%)	33 (86.8%)	0.693 (0.216-2.357)	0.56227	G/G vs. G/A
G/A	8 (5.8%)	12 (15.6%)			7 (17.9%)	5 (13.1%)			
A/A	-	-			-	-			
G	266 (97%)	142 (92%)	2.810 (1.122 - 7.035)	0.0219	71 (91%)	71 (93,4%)	0.714 (0.216-2.357)	0.57927	G vs. A
A	8 (3%)	12 (8%)			7 (8.9%)	5 (6.5%)			
<i>IL6 -174G/C (rs1800795)</i>									
G / G	112 (81.8%)	51 (66.2%)	2.196 (1.128 - 4.276)	0.0191	29 (74.3%)	22 (57.8%)	1.714 (0.635-4.627)	0.28582	G/G vs. G/C
G / C	23 (16.8%)	23 (29.9%)	2.284 (1.203 - 4.336)		0.0106	10 (25.6%)			
C / C	2 (1.5%)	3 (3.9%)	3.294 (0.534 - 20.322)	0.1757	-	3 (7.8%)	9.178 (0.451-186.854)	0.05491	G/G vs. C/C
G	247 (90%)	125 (81%)	2.122 (1.204 - 3.741)	0.0082	68 (87.1%)	57 (75%)	2.267 (0.976-5.265)	0.05326	G vs. C
C	27 (10%)	29 (19%)			10 (12.8%)	19 (25%)			
<i>IL10 -1082A/G (rs1800896)</i>									
A / A	74 (54%)	38 (49.4%)	1.204 (0.6743 - 2.149)	0.5302	20 (51.2%)	18 (47.3%)	1.250 (0.495-3.158)	0.63683	A/A vs. A/G
A / G	55 (40.1%)	34 (44.2%)	1.206 (0.6892 - 2.109)	0.5121	16 (41%)	18 (47.3%)	1.170 (0.478-2.860)	0.73128	A/A vs. A/G+G/G
G / G	8 (5.8%)	5 (6.5%)	1.217 (0.3724 - 3.977)	0.7447	3 (7.6%)	2 (5.2%)	0.741 (0.1111-4.948)	0.75616	A/A vs. G/G
A	203 (74%)	110 (71%)	1.144 (0.7351 - 1.779)	0.5514	56 (71.7%)	54 (71%)	1.037 (0.515-2.087)	0.91881	A vs. G
G	71 (26%)	44 (29%)			22 (28.2%)	22 (28.9%)			

1 **5.3. Análise das citocinas séricas Th1, Th2 e Th17**

2 O perfil de citocinas do grupo controle e do grupo HDV, foi traçado com a análise das
3 citocinas IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A obtidas a partir da média de
4 intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina (**Figura 9**).

5 Ao analisar a concentração de citocinas séricas do grupo controle e grupo HDV
6 observamos que as citocinas IL-2 ($p < 0.0001$), IL- 4 ($p < 0.0001$), IL- 6 ($p < 0.0001$), IL-10
7 ($p < 0.0031$) encontram-se significativamente aumentadas no grupo HDV, ao contrário do que
8 foi observado para as citocinas TNF ($p < 0.0001$) e IL-17A ($p < 0.0001$) cujo os níveis séricos
9 aumentados foram observados no grupo controle. A citocina IFN- γ ($p < 0.0529$) não
10 apresentou diferença estatística significativa entre os grupos analisados.



11

12 **Figura 9.** Associação das médias de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2 (A), IL4 (B), IL-6
 13 (C), IL-10 (D), TNF (E), IFN- γ (F) e IL17A (G) no grupo controle (□), grupo HDV (■). As citocinas foram
 14 quantificadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados apresentados
 15 através da média e desvio padrão dos analitos. O teste utilizado para avaliar a significância estatística foi o teste
 16 de Mann-Whitney. Diferença estatística significativa foi considerada quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e ****
 17 $< 0,0001$.

18

19

20 **5.4. Concentrações de citocinas associadas aos genótipos dos marcadores TNF- α -**
21 **308G/A, IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G**

22 Foi observado a associação entre os genótipos dos polimorfismos estudados e as
23 concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A no soro dos
24 indivíduos do grupo controle e grupo HDV.

25 Ao fazer a associação do polimorfismo do gene da citocina TNF- α -308G/A com o
26 perfil de citocinas analisadas foi observado que indivíduos com o genótipo G/G apresentaram
27 níveis séricos de citocinas mais elevados para IL-2, IL-4, IL-6, TNF e IL-17A, exceto apenas
28 em IFN- γ que apresentou níveis elevados para indivíduos com o genótipo G/A. Na análise
29 entre os genótipos G/G vs. G/A para as citocinas IL-2 ($p < 0,9906$), IL-4 ($p < 0,9971$), IL-6
30 ($p < 0,9911$), IL-10 ($p < 0,7557$), TNF ($p < 0,4138$), IFN- γ ($p < 0,5945$) e IL-17A ($p < 0,9289$) não
31 observou-se diferença estatística significativa para nenhum dos testes não paramétricos
32 empregados (**Figura 10**).

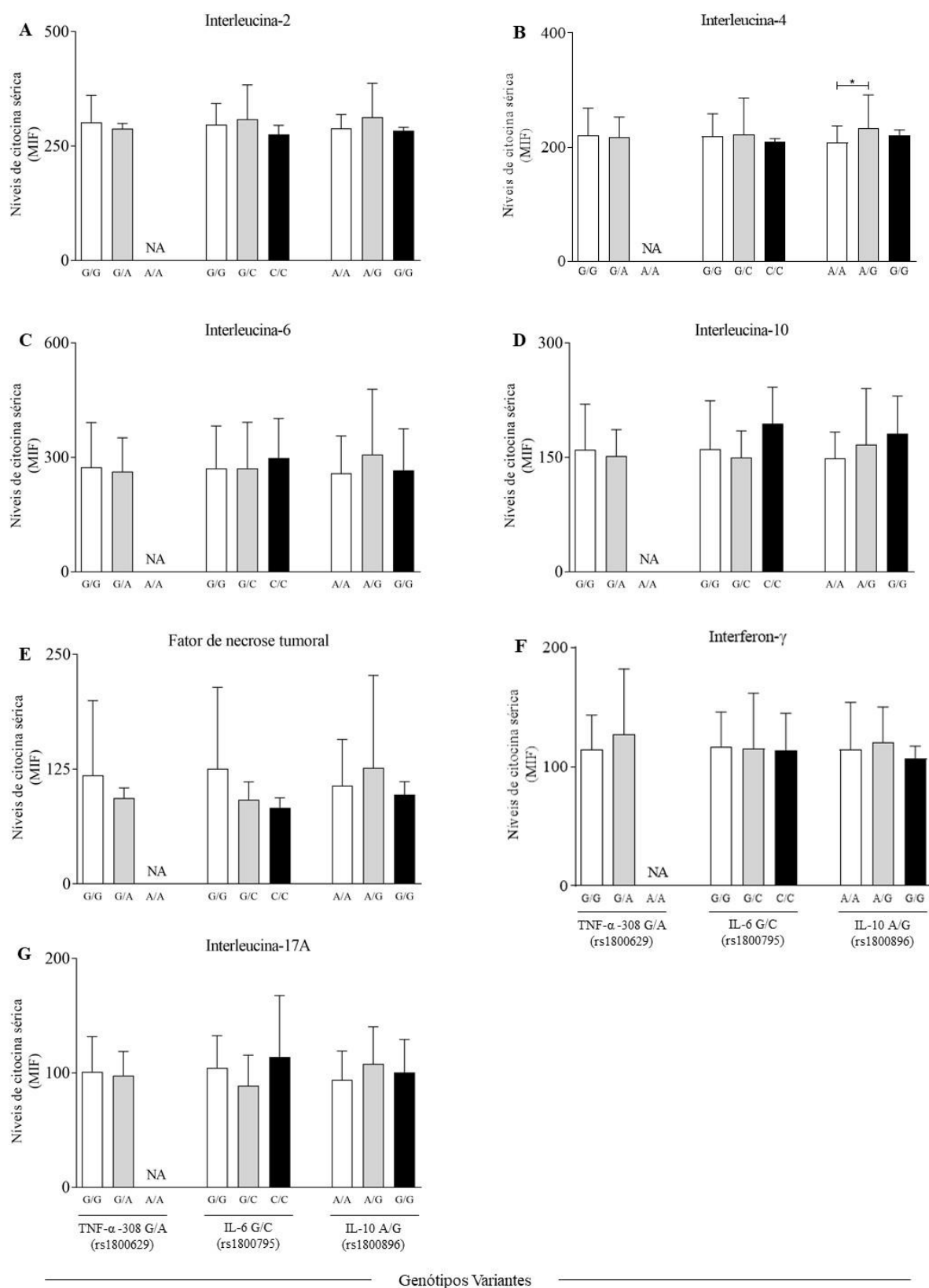
33 A associação do polimorfismo do gene da citocina IL-6 -174G/C para as citocinas
34 propostas, foi observado um padrão variado de perfil de citocinas, onde níveis mais elevados
35 de TNF e IFN- γ foram observados nos indivíduos de genótipo G/G. Para as citocinas IL-2 e
36 IL-4 foram observados níveis séricos mais elevados nos indivíduos de genótipo G/C enquanto
37 as citocinas IL-6, IL-10 e IL-17A demonstraram ser mais elevadas nos indivíduos de genótipo
38 C/C.

39 No entanto, as análises entre os genótipos G/G vs. G/C para as citocinas IL-2
40 ($p < 0,0714$), IL-4 ($p < 0,7107$), IL-6 ($p < 0,9304$), IL-10 ($p < 0,4582$), TNF ($p < 0,1485$), IFN- γ
41 ($p < 0,6379$) e IL-17A ($p < 0,1109$), G/G vs. C/C para as citocinas IL-2 ($p < 0,5343$), IL-4
42 ($p < 0,7943$), IL-6 ($p < 0,6587$), IL-10 ($p < 0,1167$), TNF ($p < 0,0531$), IFN- γ ($p < 0,9209$) e IL-17A
43 ($p < 0,7693$) e G/C vs. C/C para as citocinas IL-2 ($p < 0,1564$), IL-4 ($p < 0,7482$), IL-6
44 ($p < 0,5613$), IL-10 ($p < 0,1438$), TNF ($p < 0,1870$), IFN- γ ($p < 0,6917$) e IL-17A ($p < 0,9190$) não
45 demonstraram diferenças estatísticas significativas (**Figura 10**).

46 Para a análise do polimorfismo do gene da citocina IL-10 -1082A/G também se
47 observou um padrão variado de perfil de citocinas. As concentrações séricas das citocinas IL-
48 2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ e IL-17A nos indivíduos de genótipo A/G apresentaram-se elevadas
49 quando comparadas com os dois outros genótipos. A citocina IL-10 foi a única que a
50 expressão mais elevada fora nos indivíduos de genótipo G/G. As citocinas associadas ao
51 genótipo A/A, no geral, permaneceram em baixas concentrações.

52 A análise entre os cruzamentos dos genótipos A/A vs A/G para as citocinas IL-2
53 ($p < 0,2990$), IL-6 ($p < 0,3301$), IL-10 ($p < 0,3976$), TNF ($p < 0,7861$), IFN- γ ($p < 0,1427$) e IL-17A
54 ($p < 0,1956$), apenas IL-4 demonstrou ter concentrações séricas significativamente maiores
55 ($p < 0,0395$) em indivíduos que carregam o genótipo A/G comparados aos indivíduos que
56 carregam genótipo A/A, o cruzamentos dos genótipos A/A vs G/G para as citocinas IL-2
57 ($p < 0,5604$), IL-4 ($p < 0,0659$), IL-6 ($p < 0,8608$), IL-10 ($p < 0,2054$), TNF ($p < 0,8660$), IFN- γ
58 ($p < 0,8577$) e IL-17A ($p < 0,7991$) e o cruzamento entre os genótipos A/G vs A/A para as
59 citocinas IL-2 ($p < 0,5664$), IL-4 ($p < 0,5334$), IL-6 ($p < 0,6985$), IL-10 ($p < 0,2754$), TNF
60 ($p < 0,5963$), IFN- γ ($p < 0,2847$) e IL-17A ($p < 0,5078$) não demonstraram diferenças estatísticas
61 significativas (**Figura 10**).

62



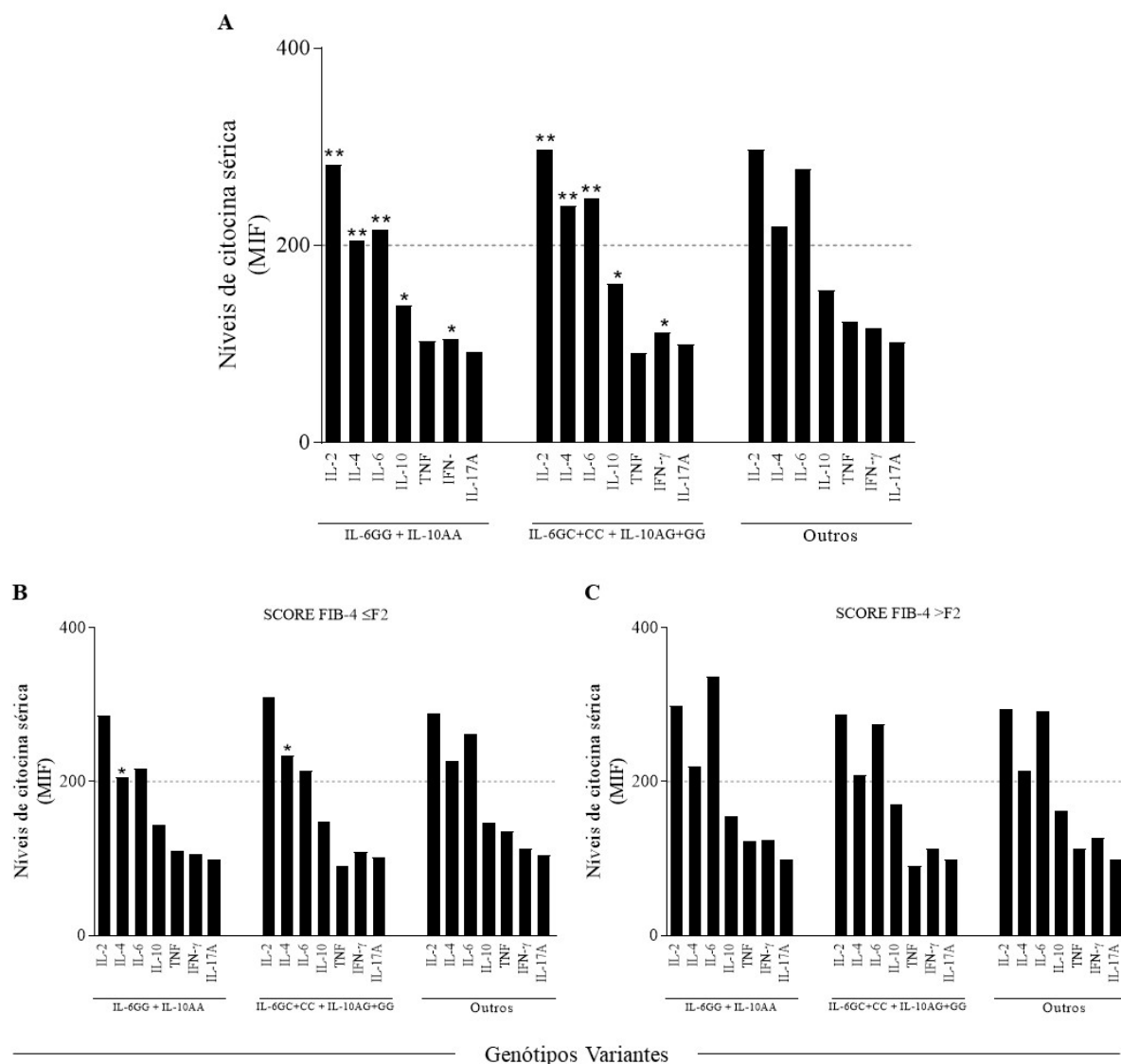
63 **Figura 10.** Associação da média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2 (A), IL4 (B), IL-6 (C),
 64 IL-10 (D), TNF- α (E), IFN- γ (F) e IL17A (G) entre os genótipos variantes do SNP TNF α -308G/A, IL6 -174G/C
 65 e IL10 -1082A/G entre os genótipos categorizados em homocigoto selvagem (□), heterocigoto (▒) e
 66 homocigoto mutante (■). Os testes utilizados para avaliar a significância estatística foram Kruskal-
 67 Wallis/Mann-Whitney. Diferença estatística significativa foi considerada quando * p < 0,05, ** p < 0,01 e ****
 68 < 0,0001. NA = Não Aplicável.

70 **5.5. Relação entre os níveis séricos de citocinas e associação dos genótipos de**
71 **pacientes com Hepatite Delta**

72 Ao avaliarmos os níveis séricos de citocinas dos indivíduos do grupo HDV sem a
73 presença dos alelos polimórficos para os polimorfismos de IL-6 e IL-10 (IL-6G/G+IL-
74 10A/A), com presença dos alelos polimórficos de IL-6 e IL-10 (IL-6G/C+CC + IL-
75 10A/G+G/G), pode-se notar que o grupo com a presença dos alelos polimórficos expressou
76 níveis mais elevados das citocinas IL-2 ($p<0.0066$), IL-4 ($p<0.0053$), IL-6 ($p<0.0076$), IL-10
77 ($p<0.0309$) e IFN- γ ($p<0.0199$), quando comparados com o grupo sem a presença dos alelos
78 polimórficos (**Figura 11**).

79 Quando segregamos os indivíduos do grupo HDV de acordo com o grau de gravidade
80 da doença (Score FIB-4 \leq F2 ou $>$ F2) observamos que o subgrupo com Score FIB-4 \leq F2 os
81 indivíduos com a combinação IL-6G/C+CC + IL-10A/G+G/G apresentam níveis séricos mais
82 elevados de IL-4 ($p<0.0209$) em indivíduos que carregam a combinação IL-6G/G + IL-10A/A
83 quando comparados aos indivíduos que carregam o genótipo sem a presença do alelo mutado.
84 Nota-se também um aumento nas concentrações de IL-2 e IFN- γ , embora não tenham
85 apresentado resultados estatísticos significantes (**Figura 11**).

86



87

88 **Figura 11.** Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2, IL4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e
 89 IL17A entre os genótipos variantes do SNP IL6 -174G/C e IL10 -1082A/G (barras pretas). (A) Os indivíduos
 90 com HDV foram segregados em subgrupos de acordo com a combinação de genótipos IL-6G/G+IL-10A/A, IL-
 91 6G/C+CC + IL-10A/G+G/G e Outros. (B) Indivíduos com HDV formaram subgrupos de acordo com a
 92 combinação de genótipos IL-6G/G+IL-10A/A, IL-6G/C+CC + IL-10A/G+G/G e Outros classificados com score
 93 FIB-4 \leq F2. (C) Indivíduos com HDV formaram subgrupos de acordo com a combinação de genótipos IL-
 94 6G/G+IL-10A/A, IL-6G/C+CC + IL-10A/G+G/G e Outros classificados com score FIB-4 >F2. O teste utilizado
 95 para avaliar a significância estatística foi Kruskal-Wallis Diferença estatística significativa foi considerada
 96 quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

97

98

99

100

101 **6. DISCUSSÃO**

102 No presente estudo foi observado maior prevalência da infecção pelo HDV em
103 indivíduos do sexo masculino com média de idade de 45 anos, estes dados corroboram com
104 estudos anteriores realizados na região amazônica com indivíduos positivos para hepatite B
105 (98–101). Todavia, um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (102) com indivíduos
106 diagnosticados com hepatite Delta demonstraram idade precoce, entre 12 e 31 anos de idade,
107 considerando a transmissão horizontal intrafamiliar como principal via de infecção.

108 Em relação a região de procedência dos indivíduos do grupo HDV, neste estudo foram
109 registrados 25 municípios do estado do Amazonas, onde os municípios situados nas calhas do
110 vale do Juruá e vale do Purus apresentaram maiores números de casos registrados. Nossos
111 dados vão de encontro a estudos anteriores que descrevem que as regiões situadas nas bacias
112 dos rios Juruá, Solimões e Purus são localidades consideradas, durante anos, áreas de grande
113 endemicidade deste vírus (25,102).

114 Quanto aos resultados das análises das variáveis hematológicas, foi observado que os
115 indivíduos do grupo HDV apresentam um discreto aumento de monócitos e eosinófilos, além
116 de apresentar quadro de plaquetopenia quando comparados com o grupo controle. Não foram
117 encontrados estudos recentes que relacione a hepatite viral com o aumento de monócitos e
118 eosinófilos apesar de infecções virais, como infecção por citomegalovírus (CMV) e infecção
119 viral do trato respiratório serem causas comuns de monocitose (103,104). Contudo, um estudo
120 demonstrou que pacientes infectados com hepatite B crônica apresentaram linfócitos em
121 grande quantidade no sangue periférico (105).

122 Quadros de plaquetopenia foram observados na população deste estudo, a análise geral
123 do grupo HDV mostrou leve diminuição das plaquetas circulantes. Por outro lado, indivíduos
124 do grupo HDV classificados como >F2 apresentaram quadros de plaquetopenia moderados.
125 Esta condição, é comumente observada em portadores do vírus da hepatite C, sendo associada
126 ao desenvolvimento das formas mais graves de doença hepática, embora também esteja
127 presente em portadores de hepatite B crônica e, conseqüentemente, hepatite D, uma vez que
128 essas alterações hematológicas podem estar associadas a vários fatores relacionados
129 principalmente a anticorpos antinucleares/ antifosfolipídios/ anticardiolipina/ antiplaquetários,
130 além de doença linfoproliferativa e, principalmente, hiperesplenismo (106–109).

131 O hiperesplenismo, condição médica caracterizada pelo aumento do baço
132 (esplenomegalia), que outrora foi relatada como uma característica consistente e peculiar
133 presente na infecção crônica por HDV, posteriormente foi relacionada a uma condição de
134 necro-inflamação hepática, levando a hipertensão portal (110). No entanto, já foram
135 registrados na literatura que os quadros de trombocitopenia são persistentes mesmo após
136 esplenectomia ou após a descompressão portal, sendo provável que outros fatores devem ser
137 levados em consideração como redução da liberação de trombopoietina pelo fígado,
138 trombocitopenia autoimune, terapia antirretroviral ou supressão da medula óssea (111–114).

139 Um estudo coreano, realizado com 122.200 pacientes portadores de HBV, com
140 ausência de cirrose hepática e esplenomegalia, destacou outros mecanismos desencadeantes
141 de trombocitopenia, como idade (indivíduos com 40 anos ou mais), sexo (homem) e peso
142 (obesos), tornando estes indivíduos mais predispostos a terem níveis mais baixos de glóbulos
143 brancos (WBC), neutrófilos, plaquetas e altos níveis de TGO e TGP do que em indivíduos
144 saudáveis (107).

145 Estas características que definem um pior prognóstico podem, em parte, ser explicada
146 pela imunossenescência e "envelhecimento da inflamação" (do inglês, Inflammaging), que se
147 referem, respectivamente, à diminuição natural da resposta do sistema imune causado pelo
148 envelhecimento e reformulação do padrão de expressão de citocinas (com IL-6, IL-10, IFN- γ ,
149 TNF- α e IL-1 α) levando a um fenótipo pró-inflamatório do organismo e que contribuem
150 significativamente ao surgimento de diversas patologias relacionadas à idade (115–117).
151 Fatores hormonais também devem ser levados em conta, com por exemplo, o estradiol em
152 concentrações fisiológicas normais pode produzir um efeito benéfico na progressão de
153 doenças crônicas no fígado uma vez que inibe a secreção espontânea de citocinas pró-
154 inflamatórias (118).

155 Na região amazônica o HDV é a principal causa de cirrose hepática em crianças e
156 adultos jovens. O carcinoma hepatocelular (CHC) é uma complicação substancial da cirrose
157 hepática, sendo o câncer primário no fígado mais comum e está relacionado a infecções
158 crônicas (119). Tendo em vista o curso clínico acelerado do HDV, o qual colabora para a
159 progressão de fibrose para cirrose em anos, a razão dos marcadores bioquímicos de dano
160 hepático TGO/TGP vem sendo utilizada há vários anos como um método não invasivo para a
161 avaliação da gravidade de doenças hepáticas crônicas (120).

162 Em nosso estudo as análises bioquímicas dos marcadores de dano hepático
163 demonstraram altos níveis no grupo HDV, cujo os valores de referência para TGO e TGP foi
164 de 38 U/L e 44 U/L, respectivamente (98). Este achado encontra-se de acordo com os já
165 descritos na literatura que relatam que níveis de TGO e TGP são persistentemente elevados na
166 maioria dos pacientes (121). Resultados semelhantes foram descritos na literatura, onde um
167 estudo comparativo de coorte de HCV, HBV e HDV relatou que indivíduos com HDV
168 apresentaram TGO e TGP mais altos quando comparados com as outras duas coortes (120).

169 Nosso estudo buscou também estabelecer os valores para os marcadores de dano
170 hepático de acordo com o grau de gravidade de doença hepática, onde indivíduos pertencentes
171 do grupo HDV \leq F2, sem lesões hepáticas, apresentaram resultados normais, ao contrário dos
172 indivíduos pertencentes do grupo HDV $>$ F2. Um estudo realizado com 209 indivíduos
173 infectados cronicamente com HBV, dos quais 19 indivíduos apresentaram coinfeção com
174 HDV, 9 foram classificados como F0 – F1 (\leq F2) e 10 com F2 – F4 ($>$ F2) onde os indivíduos
175 F2 – F4 apresentaram resultados bioquímicos discrepantes quando comparados com os
176 indivíduos F0 – F1 (122).

177 As citocinas são moléculas imunomoduladoras capazes de conferir proteção contra
178 vírus, os SNPs presentes na região moduladora dessas moléculas tendem a afetar sua
179 produção causando grande desequilíbrio imunológico (123). Nosso estudo buscou analisar os
180 polimorfismos em regiões promotoras presentes nos genes das citocinas de *TNF α -308G/A*,
181 *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G*, sendo estes responsáveis pelo risco aumentado de progressão
182 de fibrose hepática como citado anteriormente.

183 Em relação ao polimorfismo no gene *TNF α -308G/A*, nossos resultados demonstraram
184 maior predominância do genótipo G/G para ambos os grupos estudados, seguido dos
185 genótipos G/A e A/A. Nossos dados reforçam os achados de estudos anteriores realizado na
186 região Amazônica com pacientes infectados cronicamente com HBV e HCV demonstraram
187 que as proporções genotípicas e alélicas estão em concordância com os nossos resultados
188 encontrados, sendo o genótipo G/G e o alelo G os mais frequente e o genótipo mutante A/A e
189 o alelo A os menos frequentes (95,124).

190 Abraham & Kroeger (125) descreveram em seu estudo que que o genótipo G/G está
191 presente na maior parte da população, sendo considerando o genótipo selvagem e o genótipo
192 A/A o mutante, sendo o alelo A associado a maior produção de citocinas e a maiores níveis de

193 transcrição genica quando comparado ao alelo G, resultando em altas concentrações de TNF-
194 α .

195 Um estudo realizado por Jeng e colaboradores (126) descreveu que o alelo A do gene
196 *TNFA -308G/A* é fortemente associado com o risco de desenvolvimento de fibrose hepática
197 significativa além de ser um fator de risco relacionado ao surgimento do cirrose e CHC, sendo
198 este alelo também responsável por aumentar a expressão de TNF- α . Mais tarde, um estudo
199 realizados com pacientes infectados com HCV que apresentaram quadros de cirrose e CHC
200 expressaram frequência elevada do genótipo G/A e A/A demonstrando também níveis séricos
201 elevados de TNF- α . Nossos resultados mostraram que indivíduos com o genótipo G/A
202 apresentaram maior concentração de TNF- α em relação aos indivíduos do grupo controle
203 (127).

204 Em relação ao polimorfismo no gene *IL6 -174G/C* foi observado que o genótipo G/G
205 apresentou maior frequência frente aos outros genótipos, G/C e C/C tanto no grupo controle,
206 quanto no grupo HDV. O Alelo G mostrou-se mais frequente nessa população em relação ao
207 Alelo C. Fishiman e colaboradores (68) descreveu em seu estudo que os genótipos G/G e G/C
208 expressam altos níveis de IL-6 circulantes quando comparados com o genótipo C/C.

209 Resultados semelhantes foram obtidos em estudo com um grupo de 62 pacientes com
210 hepatite B crônica no qual foi observado que o genótipo G/G apresentou maior frequência
211 entre os genótipos encontrados, seguidos de G/C e C/C, foi relatado ainda que não há
212 associação entre o polimorfismo na posição -174 na região promotora do gene de IL-6 e o
213 desenvolvimento da infecção crônica pelo HBV, embora seja relacionado diretamente na
214 capacidade de produção da IL-6 no plasma (128). Posteriormente, resultados controversos
215 foram relatados, no qual descrevem que a correlação entre a presença dos genótipos altos
216 produtores de IL-6 (G/G) e a piora na evolução da doença hepática crônica (129).

217 Estes mesmos perfis genotípicos foram relatados em pacientes cronicamente
218 infectados com HCV em estudo realizado na região Amazônica, onde foi descrito alta
219 frequência do genótipo G/G e alelo G seguido dos genótipos G/C e C/C, não sendo
220 observados diferenças significativas nas frequências genotípicas entre o grupo HCV e grupo
221 controle. O autor também descreve que esses pacientes apresentaram altos níveis de citocina
222 IL-6 circulantes do que os controles saudáveis (95).

223 Os estudos citados anteriormente relatam que altos níveis de IL-6 circulantes no curso
224 da infecção tanto para HBV quanto para HCV ocasionado especialmente pela presença do

225 alelo G, logo esta exposição contínua a níveis elevados de IL-6 circulante pode resultar em
226 lesões hepáticas graves chegando ao CHC (130).

227 Diferentes estudos buscam descrever a relação dos polimorfismos localizados na
228 região promotora do gene *IL10 -1082A/G* com a progressão da fibrose hepática e a
229 susceptibilidade ao desenvolvimento de cirrose tanto para indivíduos infectados pelo HBV e
230 HCV (90,131).

231 Para este estudo foi avaliado o polimorfismo no gene *IL10 -1082A/G* sendo observado
232 que o genótipo A/A apresentou maior frequência frente aos outros genótipos, A/G e G/G tanto
233 no grupo controle, quanto no grupo HDV. O Alelo A mostrou-se mais frequente em relação
234 ao Alelo G. Os genótipos associados ao polimorfismo desse gene G/G, A/G e A/A estão
235 relacionados, respectivamente, a alta, média e baixa produção de IL-10 (84).

236 Um estudo realizado por Ramos e colaboradores (132) em uma população de 178
237 indivíduos infectados com hepatite C, onde 161 indivíduos estavam infectados cronicamente,
238 observou-se maior frequência no genótipo A/A seguidos dos genótipos A/G e G/G. Os 17
239 indivíduos que apresentavam infecção aguda também demonstraram maior frequência dos
240 genótipos A/A, A/G e G/G. Ainda, conforme descrito pelo autor os baixos níveis séricos de
241 IL-10 e levando a uma deficiência na resposta imunológica contra vírus e a produção
242 exacerbada de IL-10 pode estar associada a depuração viral espontânea .

243 No estudo de Conde e colaboradores (124), realizado com 53 indivíduos infectados
244 cronicamente por HBV também apresentaram frequência genotípica e alélica similares as que
245 foram descritas em nosso estudo, sendo A/A, A/G e G/G, ainda que não fosse possível
246 estabelecer diferenças significativas para as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos
247 estudados.

248 Como mencionado anteriormente, as citocinas exercem papel importante na iniciação
249 e regulação da resposta imunológica do hospedeiro (133). Estudos demonstram que citocinas
250 de perfil Th1 estão relacionadas com a atividade inflamatória levando a lesão hepática
251 progressiva, uma vez que citocinas de perfil Th2 estão relacionadas a persistência viral
252 (123,134).

253 Citocinas de perfil Th1 que desempenham papel pró-inflamatório já estão bem
254 definidos na infecção crônica por HCV onde encontram-se aumentadas. Os fatores genéticos
255 do hospedeiro também têm demonstrado ser responsáveis pelo desequilíbrio de citocinas pró-

256 inflamatórias e citocina regulatória alterando significativamente os resultados clínicos e de
257 gravidade dos pacientes (135).

258 As citocinas de perfil Th2 estão relacionadas à proliferação e diferenciação de células
259 B, bem como a produção de anticorpos. Essas citocinas exercem papel importante na resposta
260 imunológica humoral, especialmente por secretar IL-4. Quando a resposta do perfil Th1
261 encontra-se diminuída pela resposta de Th2 o hospedeiro tem sua capacidade antiviral
262 reduzida. Este distúrbio do equilíbrio Th1/Th2 pode refletir diretamente no tipo de infecção a
263 ser desenvolvida. Pacientes infectados por HBV que demonstraram perfil Th1 dominante
264 desenvolveram hepatite fulminante autolimitada ou aguda, no entanto, quando o perfil Th2
265 mostrou-se mais elevado os pacientes desenvolveram hepatite crônica (136).

266 Nosso estudo demonstrou que citocinas de perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ), Th2
267 (IL-4) e a citocina regulatória IL-10 estão em maiores concentrações no soro dos indivíduos
268 do grupo HDV quando comparados com indivíduos do grupo controle. Este perfil de citocinas
269 pode estar relacionado diretamente com os genótipos identificados nesta população de estudo,
270 onde o genótipo G/G do SNP no gene *IL6 -174G/C* apresentou maior frequência levando esta
271 população a expressar níveis de IL-6 séricos mais elevados.

272 Sabe-se que níveis elevados de IL-6 modulam a resposta inflamatória aguda levando a
273 produção do antagonista do receptor de IL-1 (IL1-Ra) receptor solúvel do fator de necrose
274 tumoral p55 (sTNF-R55), que suprime a citocina TNF- α (117). A citocina IL-10 suprime as
275 ações da IL-6, TNF- α e IL-8 (137,138) e nossa população de estudo representa
276 aproximadamente 6% dos indivíduos portadores do genótipo G/G que está relacionado a altos
277 níveis de IL-10 o que torna favorável a alta expressão de IL-6.

278 Alguns estudos corroboram com nossos resultados, segundo Cacciarelli e
279 colaboradores (135) pacientes infectados por HCV apresentaram níveis séricos de citocinas
280 Th1 (IFN- γ e IL-2) Th2 (IL-4) e a regulatória (IL-10) aumentados quando comparados com
281 os pacientes do grupo controle, no entanto, o perfil Th2 se sobressaiu ao perfil Th1. Do
282 mesmo modo o estudo de conduzido por Fan e colaboradores (139) demonstrou que há o
283 predomínio do perfil Th2 em pacientes com hepatite C. O estudo realizado por Spanakis e
284 colaboradores (140) descreveram uma diminuição de IL-4 (Th2), enquanto no estudo de
285 Zhang e colaboradores (141) relataram a diminuição de IL-2 (Th1) no soro de indivíduos
286 infectados por HCV. Desse modo a análise desses estudos sugere que as características

287 imunológicas podem estar associadas a fatores genéticos e ambientais particulares do
288 hospedeiro como mencionado anteriormente.

289 A citocina de perfil Th17 (IL-17A) induz a produção de citocinas pró-inflamatórias
290 (IL-6, TGF- β , IL-22 e IL-23) e tem sido visto que esta resposta contribui para a progressão da
291 fibrose hepática em pacientes crônicos infectados pelo HBV (142). Nosso estudo demonstrou
292 que os níveis séricos de IL-17A em indivíduos do grupo controle foi mais elevado do que nos
293 indivíduos do grupo HDV.

294 Dados publicados na literatura evidenciaram que as concentrações IL-17A aumentada
295 na hepatite B crônica e na indução da progressão da fibrose hepática. Isso sugere que a IL-
296 17A pode não apenas induzir a inflamação, mas também pode contribuir para a progressão da
297 doença e cronicidade em pacientes com infecção crônica. Níveis séricos diminuídos dessa
298 citocina foram relatados após pacientes serem submetidos a tratamento com telbivudina por
299 48-52 semanas, sugerindo que essa citocina induz respostas excessivas e inespecíficas
300 envolvidas na patogênese da inflamação hepática crônica e do dano hepatocelular associados
301 ao HBV (143,144).

302 O rigor na categorização dos pacientes de acordo com seu grau de fibrose pode variar
303 (\leq F2 ou $>$ F2), o que pode levar a divergências nos resultados obtidos. No estudo descrito por
304 Soriane e colaboradores (145) foram analisados citocinas no soro do grupo controle, fibrose
305 moderada \leq F2 e fibrose grave \geq F3, onde não foi evidenciado altos produtores de citocinas no
306 grupo controle, enquanto no grupo de fibrose moderada (\leq F2), há uma frequência elevada de
307 altos produtores de citocinas com concentrações particularmente altas de IL-4, seguidas por
308 TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- γ e IL-10, sugerindo que um papel importante da IL-4 no
309 controle do desenvolvimento de lesões hepáticas no grupo de fibrose moderada, enquanto a
310 IL-2 pode contribuir para o desenvolvimento de fibrose grave.

311 Ainda de acordo com o estudo citado acima pacientes com HCV com fibrose
312 moderada (\leq F2), foram caracterizados principalmente por um aumento de IL-4 e IL-10,
313 enquanto pacientes com fibrose grave (\geq F3) foram caracterizados por um aumento da IL-2 e
314 diminuição da IL-10, reforçando a hipótese proposta sobre o efeito protetor das citocinas
315 reguladoras.

316 Em nosso estudo realizamos combinações com as variantes dos genótipos dos
317 polimorfismos nos genes das citocinas *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* que podem afetar a
318 síntese de citocinas levando a níveis séricos distintos nesses indivíduos. Nossos achados

319 demonstraram que pacientes HDV com presença dos alelos polimórficos (IL-6G/C+CC + IL-
320 10A/G+G/G) apresentaram um proeminente perfil pró-inflamatório mediado por níveis mais
321 altos de IL-2, IL-6 e IFN- γ , enquanto para os indivíduos com Score FIB-4 \leq F2 os indivíduos
322 com a combinação IL-6G/C+CC + IL-10A/G+G/G apresentam níveis séricos mais elevados
323 de IL-4.

324 Dados na literatura demonstram que os níveis séricos das citocinas IL-6 e IL-10
325 podem auxiliar na investigação clínica como potenciais biomarcadores para o CHC e estão
326 fortemente associados ao tamanho do tumor (146). Em um estudo realizado com pacientes
327 com HCV crônicos que possuíam diversos polimorfismos nas regiões promotoras nos genes
328 das citocinas IL-6 e IL-10 e que produziam estas citocinas exacerbadamente estavam mais
329 susceptíveis a desenvolverem o CHC e complicações do que aqueles pacientes que
330 apresentaram níveis séricos diminuídos (147).

331 Esses achados corroboram achados anteriores que descrevem que fatores genéticos e
332 ambientais contribuem para alterações no perfil imunológico e no histórico genético do
333 hospedeiro. Estudos que correlacionam mais tipos de alterações polimórficas que interagem
334 entre si podem determinar melhor as alterações no perfil de citocinas e na gravidade da
335 doença (95).

336

337

338

339 **7. CONCLUSÃO**

340 Os resultados deste trabalho demonstraram achados relevantes sobre a influência dos
341 polimorfismos no gene do *TNF α -308G/A*, *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* em pacientes com
342 Hepatite Delta sobre o perfil de citocinas, apontando que:

- 343 • A frequência genotípica dos polimorfismos nos genes das citocinas *TNF α -308G/A*,
344 *IL6 -174G/C* e *IL10 -1082A/G* foi mais prevalente em indivíduos homozigotos
345 selvagens; *TNF-308G/A* e *IL6 -174G/C* podem predispor indivíduos a infecção por
346 hepatite D.
- 347 • Há um padrão misto de citocinas no séricas tanto pro-inflamatórias, como anti-
348 inflamatórias e reguladoras nos pacientes com hepatite Delta podendo ser influenciado
349 pela presença dos polimorfismos analisados, sobretudo na concentração sérica de IL-4
350 dos pacientes que carregam os genótipos A/G do polimorfismo no gene da citocina IL-
351 10;
- 352 • A presença dos genótipos combinados de *IL-6G/C+CC* + *IL-10A/G+G/G* altera o
353 perfil das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN- γ dos pacientes em diferentes fases de
354 comprometimento hepático. No entanto, estudos adicionais com maior tamanho
355 amostral devem ser considerados para validar esses resultados.

356

357

358 **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

359 1. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al.
360 Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated
361 cirrhosis type B. *Gut*. 2000;46(3):420–6.

362 2. Brasil. Ministério da Saúde. A B C D E do diagnóstico para as hepatites Virais. 1st ed.
363 Brasília; 2009. 24 p.

364 3. Abbas Z, Abbas M, Abbas S, Shazi L. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma.
365 *World J Hepatol*. 2015;7(5):777–86.

366 4. Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J*
367 *Hepatol*. 2013;5(12):666–75.

368 5. Buti M, Homs M, Rodriguez-Frias F, Funalleras G, Jardí R, Sauleda S, et al. Clinical
369 outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: A long-term follow-up study. *J*
370 *Viral Hepat*. 2011;18(6):434–42.

371 6. Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A Population-based study of hepatitis D virus as
372 potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*.
373 2012;104(10):790–2.

374 7. Alvarado-Mora M V., Rebello Pinho JR. Epidemiological update of hepatitis B, C and
375 delta in Latin America. *Antivir Ther*. 2013;18(3 PARTB):429–33.

376 8. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite
377 B e Coinfecções. Brasília; 2017. 120 p.

378 9. Ferreira CT, Silveira TR da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da
379 prevenção. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(4):473–87.

380 10. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*.
381 2008;134(6):1655–69.

382 11. Castera L, Yuen Chan HL, Arrese M, Afdhal N, Bedossa P, Friedrich-Rust M, et al.
383 EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver
384 disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63(1):237–64.

385 12. Fonseca JCF da. Hepatite D. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(2):181–90.

- 386 13. Abbas Z, Abbas M. Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic options.
387 World J Gastroenterol. 2015;21(32):9461–5.
- 388 14. Dény P, Zoulim F. Virus de l'hépatite B: du diagnostic au traitement. Pathol Biol.
389 2010;58(4):245–53.
- 390 15. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8+ T
391 Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B
392 Virus Infection. J Virol. 2003;77(1):68–76.
- 393 16. Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: A
394 mini-review. Dig Liver Dis. 2009;41(1):67–70.
- 395 17. Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis
396 B. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):426–39.
- 397 18. Winer BY, Ploss A. Determinants of hepatitis B and delta virus host tropism. Curr
398 Opin Virol. 2015;13(609):109–16.
- 399 19. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis
400 D: Update and challenges ahead. Nat Rev Gastroenterol Hepatol [Internet].
401 2010;7(1):31–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2009.205>
- 402 20. Rizzetto, Mario; Ciancio A. Epidemiology of hepatitis D. In: Seminars in liver disease.
403 Thieme Medical Publishers; 2012. p. 211–9.
- 404 21. Alves C, Branco C, Cunha C. Hepatitis delta virus: A peculiar virus. Adv Virol.
405 2013;2013.
- 406 22. MOLINET F, TAVARES-NETO J, VIANA S, MATTEONI L, LOBATO C,
407 OLIVEIRA AD, et al. Hdv Genotypes in the Western Brazilian Amazon Region: a
408 Preliminary Report. Am J Trop Med Hyg [Internet]. 2006;75(3):475–9. Available
409 from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2006.75.475>
- 410 23. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais - 2019. Bol
411 Epidemiológico da Secr Vigilância em Saúde [Internet]. 2019;50:76. Available from:
412 [http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-](http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2019/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais-2019)
413 2019
- 414 24. Braga WSMBLMSRAB de; MMS de; RMDGCM da CFJCF da. Prevalência da

- 415 infecção pelos vírus da hepatite B (VHB) e da hepatite Delta (VHD) em Lábrea, Rio
416 Purus, Estado do Amazonas. *Epidemiol e Serviços Saúde* [Internet]. 2004;13(1):35–46.
417 Available from: <http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v13n1/v13n1a05.pdf>
- 418 25. Crispim MAE, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MMA, Kiesslich D.
419 Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the
420 Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):1–9.
- 421 26. Taylor JM. Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus. *World J*
422 *Gastroenterol*. 2014;20(11):2971.
- 423 27. Mentha N, Clément S, Negro F, Alfaiate D. A review on hepatitis D: From virology to
424 new therapies. *J Adv Res* [Internet]. 2019;17:3–15. Available from:
425 <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.009>
- 426 28. Alfaiate D, Dény P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical
427 aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral Res* [Internet].
428 2015;122:112–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.009>
- 429 29. Gerlich WH. Medical Virology of Hepatitis B: How it began and where we are now.
430 *Viol J*. 2013;10(1):239.
- 431 30. Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, et al. Molecular Determinants of
432 Hepatitis B and D Virus Entry Restriction in Mouse Sodium Taurocholate
433 Cotransporting Polypeptide. *J Virol* [Internet]. 2013;87(14):7977–91. Available from:
434 <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.03540-12>
- 435 31. Hu HH, Liu J, Lin YL, Luo WS, Chu YJ, Chang CL, et al. The rs2296651 (S267F)
436 variant on NTCP (SLC10A1) is inversely associated with chronic hepatitis B and
437 progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis
438 B. *Gut*. 2016;65(9):1514–21.
- 439 32. Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos ADO, Salcedo JMV, Vieira DS.
440 Hepatitis delta: Virological and clinical aspects. *Viol J*. 2017;14(1):1–15.
- 441 33. Tseng CH, Lai MMC. Hepatitis delta virus RNA replication. *Viruses*. 2009;1(3):818–
442 31.
- 443 34. Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J Hepatol*
444 [Internet]. 2016;64(1):S102–16. Available from:

- 445 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>
- 446 35. Aragona M, Caredda F, Lavarini C, Farci P, Macagno S, Crivelli O, et al.
447 SEROLOGICAL RESPONSE TO THE HEPATITIS DELTA VIRUS IN HEPATITIS
448 D. *Lancet* [Internet]. 1987 Feb;329(8531):478–80. Available from:
449 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687920903>
- 450 36. Grabowski, Jan; Wedemeyer H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical
451 challenges. *Dig Dis*. 2010;28(1):133–8.
- 452 37. Kumar A et al. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virology*.
453 2014;11(1):22.
- 454 38. Balmasova IP, Yushchuk ND, Mynbaev OA, Alla NR, Malova ES, Shi Z.
455 Imunopatogênese da hepatite B crônica Abstrato Vírus da Hepatite B : ESTRUTURA e
456 replicação. 2014;20(39):14156–71.
- 457 39. Boehme KW, Compton T. Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors. *J Virol*
458 [Internet]. 2004 Aug 1;78(15):7867–73. Available from:
459 <https://jvi.asm.org/content/78/15/7867>
- 460 40. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update
461 on Toll-like receptors. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 May 20;11(5):373–84. Available
462 from: <http://www.nature.com/articles/ni.1863>
- 463 41. Ma Y-J, He M, Han J-A, Yang L, Ji X-Y. A Clinical Study of HBsAg-Activated
464 Dendritic Cells and Cytokine-Induced Killer Cells During the Treatment for Chronic
465 Hepatitis B. *Scand J Immunol* [Internet]. 2013 Oct;78(4):387–93. Available from:
466 <http://doi.wiley.com/10.1111/sji.12097>
- 467 42. Tu H-JLN-CZCH-XYACT-YLZ-K. The Role of Immune Cells in Chronic HBV
468 Infection. *J Clin Transl Hepatol* [Internet]. 2015 Dec 15;3(4):277–83. Available from:
469 [http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2F](http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2FJCTH.2015.00026)
470 [JCTH.2015.00026](http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2FJCTH.2015.00026)
- 471 43. Jeulin H et al. Clinical impact of hepatitis B and C virus envelope glycoproteins. *World*
472 *J Gastroenterol*. 2013;19(5):654.
- 473 44. Lopes TGSL, Schinoni MI. Aspectos gerais da hepatite B. *Rev Ciências Médicas e*
474 *Biológicas*. 2011;10(3):337.

- 475 45. Ramezani A et al. The influence of human leukocyte antigen and IL-10 gene
476 polymorphisms on hepatitis B virus outcome. *Hepat Mon.* 2012;12(5):320.
- 477 46. Webster GJ et al. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and
478 nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B:
479 implications for immunotherapy. *J Virol.* 2004;78(11):5707–19.
- 480 47. Bertoletti, Antonio; Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus
481 infection. *J Gen Virol.* 2006;87(6):1439–49.
- 482 48. Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, Janssen HLA, Lau DTY, Locarnini SA, et al.
483 Hepatitis B virus infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018;4:1–21. Available from:
484 <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>
- 485 49. Li H, Zhai N, Song H, Yang Y, Cui A, Li T, et al. The Role of Immune Cells in
486 Chronic HBV Infection. *J Clin Transl Hepatol* [Internet]. 2015;3(4):277–83. Available
487 from:
488 <http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2F>
489 [JCTH.2015.00026](http://www.xiahepublishing.com/ArticleFullText.aspx?sid=2&jid=1&id=10.14218%2F)
- 490 50. Stauffer JK, Scarzello AJ, Jiang Q, Wilttrout RH. Chronic inflammation, immune
491 escape, and oncogenesis in the liver: A unique neighborhood for novel intersections.
492 *Hepatology* [Internet]. 2012 Oct;56(4):1567–74. Available from:
493 <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.25674>
- 494 51. Shirvani-Dastgerdi E. Molecular interactions between hepatitis B virus and delta virus.
495 *World J Virol* [Internet]. 2015;4(2):36. Available from: [http://www.wjgnet.com/2220-](http://www.wjgnet.com/2220-3249/full/v4/i2/36.htm)
496 [3249/full/v4/i2/36.htm](http://www.wjgnet.com/2220-3249/full/v4/i2/36.htm)
- 497 52. Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease.
498 *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(10):2515. Available from:
499 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i10/2515.htm>
- 500 53. Makhatadze NJ. Tumor necrosis factor locus: Genetic organisation and biological
501 implications. *Hum Immunol.* 1998;59(9):571–9.
- 502 54. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular.* 8th ed. Elsevier, editor.
503 Vol. 7^a ed., Elsevier Medicina. Rio de Janeiro; 2008. 125–130 p.
- 504 55. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, Kim CY, Park MH, Kim LH, et al. Association of TNF- α

- 505 promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol*
506 *Genet.* 2003;12(19):2541–6.
- 507 56. Basturk B, Karasu Z, Kilic M, Ulukaya S, Boyacioglu S, Oral B. Association of TNF- α
508 -308 polymorphism with the outcome of hepatitis B virus infection in Turkey. *Infect*
509 *Genet Evol.* 2008;8(1):20–5.
- 510 57. Wang B, Wang J, Zheng Y, Zhou S, Zheng J, Wang F, et al. A study of TNF- α -238
511 and -308 polymorphisms with different outcomes of persistent hepatitis B virus
512 infection in China. *Pathology.* 2010;42(7):674–80.
- 513 58. Ferreira S da C, Chachá SGF, Souza FF, Teixeira AC, de Carvalho Santana R,
514 Deghaide NHS, et al. IL-18 , TNF , and IFN- γ alleles and genotypes are associated
515 with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury. *J Med*
516 *Virol* [Internet]. 2015 Oct;87(10):1689–96. Available from:
517 <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.24225>
- 518 59. Dai CY, Chuang WL, Lee LP, Chen SC, Hou NJ, Lin ZY, et al. Associations of tumour
519 necrosis factor alpha promoter polymorphisms at position -08 and -238 with clinical
520 characteristics of chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2006;13(11):770–4.
- 521 60. Liu L, Yang X, Chen X, Kan T, Shen Y, Chen Z, et al. Association between TNF- α
522 polymorphisms and cervical cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep* [Internet].
523 2012 Mar 14;39(3):2683–8. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/s11033-](http://link.springer.com/10.1007/s11033-011-1022-9)
524 [011-1022-9](http://link.springer.com/10.1007/s11033-011-1022-9)
- 525 61. Zhang Y, Cao Y, Xin L, Gao N, Liu B. Association between rs1800629 polymorphism
526 in tumor necrosis factor- α gene and dilated cardiomyopathy susceptibility. *Medicine*
527 (Baltimore) [Internet]. 2018 Dec;97(50):e13386. Available from:
528 <http://journals.lww.com/00005792-201812140-00031>
- 529 62. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Florczak M, Dabrowska-Zamojcin E, Dutkiewicz
530 G, et al. IL-2 and TNF- α Promoter Polymorphisms in Patients With Acute Kidney
531 Graft Rejection. *Transplant Proc* [Internet]. 2005 Jun;37(5):2041–3. Available from:
532 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134505003301>
- 533 63. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, et al. An association
534 between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet*
535 [Internet]. 2006 Aug 25;51(8):677–85. Available from:

- 536 <http://www.nature.com/articles/jhg2006103>
- 537 64. ZHANG S, WANG C, XI B, LI X. Association between the tumour necrosis factor-
538 α -308G/A polymorphism and chronic obstructive pulmonary disease: An update.
539 Respirology [Internet]. 2011 Jan;16(1):107–15. Available from:
540 <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1843.2010.01879.x>
- 541 65. Khan S, Mandal RK, Jawed A, Dar SA, Wahid M, Panda AK, et al. TNF- α -308 G
542 > A (rs1800629) Polymorphism is Associated with Celiac Disease: A Meta-analysis
543 of 11 Case-Control Studies. Sci Rep [Internet]. 2016 Dec 6;6(1):32677. Available
544 from: <http://www.nature.com/articles/srep32677>
- 545 66. El-Maadawy EA, Talaat RM, Ahmed MM, El-Shenawy SZ. Interleukin-6 promotor
546 gene polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B virus in Egyptians. Hum
547 Immunol [Internet]. 2019;80(3):208–14. Available from:
548 <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.12.009>
- 549 67. Sutherland GR, Baker E, Callen DF, Hyland VJ, Wong G, Clark S, et al. Interleukin 4
550 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. Hum Genet. 1988;79(4):335–7.
- 551 68. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The
552 effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription
553 and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic
554 arthritis. J Clin Invest. 1998;102(7):1369–76.
- 555 69. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The
556 effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription
557 and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic
558 arthritis. J Clin Invest [Internet]. 1998 Oct 1;102(7):1369–76. Available from:
559 <http://www.jci.org/articles/view/2629>
- 560 70. Ahmed IH, Ghali ZH. Transversion and transition mutations of interleukin-6 gene -174
561 (G/C) in patients with type-2 diabetes mellitus. Gene Reports [Internet]. 2019
562 Dec;17:100478. Available from:
563 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452014419301207>
- 564 71. González-Castro TB, Hernández-Díaz Y, Pérez-Hernández N, Tovilla-Zárate CA,
565 Juárez-Rojop IE, López-Narvaez ML, et al. Interleukin 6 (RS1800795) gene
566 polymorphism is associated with cardiovascular diseases: A meta-analysis of 74 studies

- 567 with 86,229 subjects. EXCLI J. 2019;18(1):331–55.
- 568 72. Rodrigues KF, Pietrani NT, Bosco AA, Campos FMF, Sandrim VC, Gomes KB. IL-6,
569 TNF- α , and IL-10 levels/polymorphisms and their association with type 2 diabetes
570 mellitus and obesity in Brazilian individuals. Arch Endocrinol Metab [Internet]. 2017
571 Feb 16;61(5):438–46. Available from:
572 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972017000500438&lng=en&tlng=en)
573 [39972017000500438&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2359-39972017000500438&lng=en&tlng=en)
- 574 73. Hohaus S, Giachelia M, Di Febo A, Martini M, Massini G, Vannata B, et al.
575 Polymorphism in cytokine genes as prognostic markers in Hodgkin’s lymphoma. Ann
576 Oncol [Internet]. 2007 Aug;18(8):1376–81. Available from:
577 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419428974>
- 578 74. Sławińska M, Zabłotna M, Gleń J, Lakomy J, Nowicki RJ, Sobjanek M. STAT3
579 polymorphisms and IL-6 polymorphism are associated with the risk of basal cell
580 carcinoma in patients from northern Poland. Arch Dermatol Res [Internet]. 2019 Nov
581 24;311(9):697–704. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/s00403-019-](http://link.springer.com/10.1007/s00403-019-01952-7)
582 [01952-7](http://link.springer.com/10.1007/s00403-019-01952-7)
- 583 75. Pooja S, Chaudhary P, Nayak L V., Rajender S, Saini KS, Deol D, et al. Polymorphic
584 variations in IL-1 β , IL-6 and IL-10 genes, their circulating serum levels and breast
585 cancer risk in Indian women. Cytokine [Internet]. 2012 Oct;60(1):122–8. Available
586 from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466612004863>
- 587 76. Jafari-Nedooshan J, Dastgheib SA, Kargar S, Zare M, Rae-Ezzabadi A, Heiranizadeh
588 N, et al. Association of IL-6 –174 G>C Polymorphism with Susceptibility to
589 Colorectal Cancer and Gastric Cancer: a Systematic Review and Meta-Analysis. Acta
590 Medica (Hradec Kral Czech Republic) [Internet]. 2019;62(4):137–46. Available from:
591 <https://actamedica.lfhk.cuni.cz/62/4/0137/>
- 592 77. Sawkulycz X, Bradburn S, Robinson A, Payton A, Pendleton N, Murgatroyd C.
593 Regulation of Interleukin 6 by a polymorphic CpG within the frontal cortex in
594 Alzheimer’s disease. Neurobiol Aging [Internet]. 2020 Apr; Available from:
595 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197458020301275>
- 596 78. Grocott HP, White WD, Morris RW, Podgoreanu M V., Mathew JP, Nielsen DM, et al.
597 Genetic Polymorphisms and the Risk of Stroke After Cardiac Surgery. Stroke

- 598 [Internet]. 2005 Sep;36(9):1854–8. Available from:
599 <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.0000177482.23478.dc>
- 600 79. Müller-Steinhardt M, Härtel C, Müller B, Kirchner H, Fricke L. The interleukin-6 -
601 174promoter polymorphism is associated with long-term kidney allograft survival.
602 *Kidney Int* [Internet]. 2002 Nov;62(5):1824–7. Available from:
603 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815487411>
- 604 80. Cussigh A, Falleti E, Fabris C, Bitetto D, Cmet S, Fontanini E, et al. Interleukin 6
605 promoter polymorphisms influence the outcome of chronic hepatitis C.
606 *Immunogenetics* [Internet]. 2011 Jan 12;63(1):33–41. Available from:
607 <http://link.springer.com/10.1007/s00251-010-0491-7>
- 608 81. Falleti E, Fabris C, Vandelli C, Colletta C, Cussigh A, Smirne C, et al. Genetic
609 polymorphisms of interleukin-6 modulate fibrosis progression in mild chronic hepatitis
610 C. *Hum Immunol* [Internet]. 2010;71(10):999–1004. Available from:
611 <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.06.006>
- 612 82. Barrett S, Collins M, Kenny C, Ryan E, Keane CO, Crowe J. Polymorphisms in tumour
613 necrosis factor- α , transforming growth factor- β , interleukin-10, interleukin-6,
614 interferon- γ , and outcome of hepatitis C virus infection. *J Med Virol*. 2003;71(2):212–
615 8.
- 616 83. Giannitrapani L, Soresi M, Giacalone A, Campagna ME, Marasà M, Cervello M, et al.
617 IL-6-174G/C polymorphism and IL-6 serum levels in patients with liver cirrhosis and
618 hepatocellular carcinoma. *Omi A J Integr Biol*. 2011;15(3):183–6.
- 619 84. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson I V. An
620 investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J*
621 *Immunogenet*. 1997;24(1):1–8.
- 622 85. Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkinst NA, Tariq A. Structure of the mouse IL-
623 10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes . J M Kim , C I
624 Brannan , N G Copeland , N A Jenkins , T A Khan and K W Moore Why The JI ?
625 Submit online . • No Triage ! Every submission reviewed by practicing sc. 2019;
- 626 86. Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RGJ, Huizinga TWJ.
627 Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad*
628 *Sci U S A*. 1998;95(16):9465–70.

- 629 87. Ribeiro CSS, Visentainer JEL, Moliterno RA. Association of cytokine genetic
630 polymorphism with hepatitis B infection evolution in adult patients. *Mem Inst*
631 *Oswaldo Cruz*. 2007;102(4):435–40.
- 632 88. Gao QJ, Liu DW, Zhang SY, Jia M, Wang LM, Wu LH, et al. Polymorphisms of some
633 cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J Gastroenterol*.
634 2009;15(44):5610–9.
- 635 89. Gao QJ, Zhang S, Wu L, Jia M, Mi Y, Liu D. Association of IL-10-1082 and IL-10-
636 592 polymorphisms with chronic hepatitis B and/or hepatitis C virus infection among
637 plasma donors in a rural area of Hebei Province, China. *Wei Sheng Yan Jiu* [Internet].
638 2011;40(6):709—713. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/22279662>
- 639 90. Srivastava M, Ranjan A, Choudhary JK, Tripathi MK, Verma S, Dixit VK, et al. Role
640 of proinflammatory cytokines (Interferon Gamma) and anti-inflammatory cytokine
641 (Interleukin-10) gene polymorphisms in chronic hepatitis B Infection: An Indian
642 Scenario. *J Interf Cytokine Res*. 2014;34(7):547–51.
- 643 91. Manolova I, Miteva L, Ivanova M, Kundurzhiev T, Stoilov R, Stanilova S. The
644 Synergistic Effect of TNFA and IL10 Promoter Polymorphisms on Genetic
645 Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. *Genet Test Mol Biomarkers*
646 [Internet]. 2018 Feb;22(2):135–40. Available from:
647 <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2017.0169>
- 648 92. Bai H, Jing D, Guo A, Yin S. Association between interleukin 10 gene polymorphisms
649 and risk of type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *J Int Med Res* [Internet].
650 2014 Jun 23;42(3):702–10. Available from:
651 <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060513505813>
- 652 93. Zhu Z, Liu J-B, Liu X, Qian L. Association of interleukin 10 rs1800896 polymorphism
653 with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. *J Int Med Res* [Internet]. 2020 Apr
654 29;48(4):030006052090486. Available from:
655 <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300060520904863>
- 656 94. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid
657 guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on.
658 *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Aug 27;1(2):581–5. Available from:
659 <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.83>

- 660 95. TarragÔ AM, da Costa AG, Pimentel JPD, Gomes STM, Freitas FB, Lalwani P, et al.
661 Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis
662 factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian
663 HCV-infected patients. *Hum Immunol*. 2014;75(11):1075–83.
- 664 96. Wai C. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in
665 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* [Internet]. 2003 Aug;38(2):518–26.
666 Available from: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2003.50346>
- 667 97. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite
668 C e Coinfecções. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde -
669 Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. 2015. 0–88 p.
- 670 98. Couto I, Victoria M, Veloso VG, Rodrigues L, Grinsztejn B, Lacerda M, et al.
671 Prevalence and predictors for compensated Advanced Chronic Liver Disease (c-
672 ACLD) in patients with chronic Hepatitis Delta Virus (HDV) infection. *PLoS One*.
673 2017;12(3):1–15.
- 674 99. da Silva Victoria F, de Oliveira CMC, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LCL.
675 Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian
676 Amazonia. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;12(1):27–37.
- 677 100. Castilho MDC, De Oliveira CMC, De Lima Gimaque JB, Di Tommaso Leão J, Braga
678 WSM. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus infection in
679 isolated villages in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*.
680 2012;87(4):768–74.
- 681 101. Braga WSM, De Oliveira CMC, De Araújo JR, Castilho MDC, Rocha JM, Gimaque
682 JBDL, et al. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage - A case
683 series of HDV-3 patients. *J Hepatol* [Internet]. 2014;61(6):1205–11. Available from:
684 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.041>
- 685 102. De Oliveira MS, Do Valle SDCN, Silva RPM, De Figueiredo EN. Hepatite B e a
686 superinfecção por vírus D em pacientes crônicos na Amazônia ocidental brasileira. *Rev*
687 *Epidemiol e Control Infecção*. 2015;5(2):72–8.
- 688 103. Bicer S, Giray T, Çöl D, Erdağ GÇ, Vitrinel A, Gürol Y, et al. Virological and clinical
689 characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr*
690 [Internet]. 2013;39(1):22. Available from:

- 691 <http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-39-22>
- 692 104. Min C-Y, Song JY, Jeong SJ. Characteristics and prognosis of hepatic cytomegalovirus
693 infection in children: 10 years of experience at a university hospital in Korea. *Korean J*
694 *Pediatr* [Internet]. 2017;60(8):261. Available from:
695 <http://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2017.60.8.261>
- 696 105. Vingerhoets J, Michielsen P, Vanham G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, et al. HBV-
697 specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis
698 B. *J Hepatol*. 1998;28(1):8–16.
- 699 106. Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, et al.
700 Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B
701 with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J Gastroenterol*.
702 2010;45(8):876–84.
- 703 107. Joo EJ, Chang Y, Yeom JS, Lee YG, Ryu S. Hepatitis B infection is associated with an
704 increased incidence of thrombocytopenia in healthy adults without cirrhosis. *J Viral*
705 *Hepat*. 2017;24(3):253–8.
- 706 108. LIMA DS, MURAD JÚNIOR AJ, BARREIRA MA, FERNANDES GC, COELHO
707 GR, GARCIA JHP. Liver Transplantation in Hepatitis Delta: South America
708 Experience. *Arq Gastroenterol*. 2018;55(1):14–7.
- 709 109. Rajan SK, Espina BM, Liebman HA. Hepatitis C virus-related thrombocytopenia:
710 Clinical and laboratory characteristics compared with chronic immune
711 thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2005;129(6):818–24.
- 712 110. manesis1994.pdf.
- 713 111. Sanyal AJ, Freedman AM, Purdum PP, Shiffman ML, Luketic VA. The hematologic
714 consequences of transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Hepatology*.
715 1996;23(1):32–9.
- 716 112. Dou J, Lou Y, Wu J, Lu Y, Jin Y. Thrombocytopenia in patients with hepatitis B virus-
717 related chronic hepatitis: Evaluation of the immature platelet fraction. *Platelets*.
718 2014;25(6):399–404.
- 719 113. Doi T. Mechanisms for increment of platelet associated IgG and platelet surface IgG
720 and their implications in immune thrombocytopenia associated with chronic viral liver

- 721 disease. *Hepatol Res* [Internet]. 2002 Sep;24(1):23–33. Available from:
722 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386634602000104>
- 723 114. Lebensztejn DM, Kaczmarek M. Lamivudine-associated thrombocytopenia. *Am J*
724 *Gastroenterol* [Internet]. 2002 Oct;97(10):2687–8. Available from:
725 <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1572-0241.2002.06063.x>
- 726 115. Frasca D, Blomberg BB. Inflammaging decreases adaptive and innate immune
727 responses in mice and humans. *Biogerontology* [Internet]. 2016 Feb 29;17(1):7–19.
728 Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10522-015-9578-8>
- 729 116. Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related
730 Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Dec 7;8. Available from:
731 <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01745/full>
- 732 117. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and
733 Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol*
734 [Internet]. 2018 Apr 9;9. Available from:
735 <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00586/full>
- 736 118. Rhode PC, Froehlich-Grobe K, Hockemeyer JR, Carlson JA, Lee J. Assessing stress in
737 disability: Developing and piloting the Disability Related Stress Scale. *Disabil Health J*
738 [Internet]. 2012 Jul;5(3):168–76. Available from:
739 <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L473>
740 77132
- 741 119. Abbas Z, Qureshi M, Hamid S, Jafri W. Hepatocellular carcinoma in hepatitis D: Does
742 it differ from hepatitis B mono-infection. *Saudi J Gastroenterol*. 2012;18(1):18–22.
- 743 120. Takyar V, Surana P, Kleiner DE, Wilkins K, Hoofnagle JH, Liang TJ, et al.
744 Noninvasive markers for staging fibrosis in chronic delta hepatitis. *Aliment Pharmacol*
745 *Ther*. 2017;45(1):127–38.
- 746 121. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harb Perspect*
747 *Med*. 2014;4(11).
- 748 122. Myers RP, Tainturier MH, Ratziu V, Piton A, Thibault V, Imbert-Bismut F, et al.
749 Prediction of liver histological lesions with biochemical markers in patients with
750 chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 2003;39(2):222–30.

- 751 123. Saxena R, Kaur J. Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B
752 virus related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(11):1572–80.
- 753 124. Conde SR et al. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations
754 with the outcome of chronic hepatitis B. *Cytokine* [Internet]. 2013;61(3):940–4.
755 Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.01.004>
- 756 125. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the
757 transcriptional regulation of the TNF gene: Relevance to disease. *J Leukoc Biol.*
758 1999;66(4):562–6.
- 759 126. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, et al. Tumor necrosis
760 factor- α 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher
761 risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia.* 2007;9(11):987–92.
- 762 127. Radwan MI, Pasha HF, Mohamed RH, Hussien HIM, El-Khshab MN. Influence of
763 transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α genes polymorphisms on
764 the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C
765 patients. *Cytokine* [Internet]. 2012;60(1):271–6. Available from:
766 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.010>
- 767 128. Li C, Zhi-Xin C, Li-Juan Z, Chen P, Xiao-Zhong W. The association between cytokine
768 gene polymorphisms and the outcomes of chronic HBV infection. *Hepatol Res.*
769 2006;36(3):158–66.
- 770 129. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of
771 interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular
772 carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013;19(16):2449–55.
- 773 130. Xia C, Liu Y, Chen Z, Zheng M. Involvement of Interleukin 6 in Hepatitis B Viral
774 Infection. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(2):677–86.
- 775 131. Corchado S, Márquez M, Montes de Oca M, Romero-Cores P, Fernández-Gutiérrez C,
776 Girón-González JA. Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor
777 Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV
778 Coinfected Patients. *PLoS One.* 2013;8(6):1–8.
- 779 132. Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos ALA, Cabello PH, Ürményi TP, et al.
780 Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous

- 781 clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. *BMC Res Notes*.
782 2012;5:0–5.
- 783 133. Grünhage F, Nattermann J. Viral hepatitis: Human genes that limit infection. *Best Pract*
784 *Res Clin Gastroenterol* [Internet]. 2010;24(5):709–23. Available from:
785 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2010.07.009>
- 786 134. Gigi E, Raptopoulou-Gigi M, Kalogeridis A, Masiou S, Orphanou E, Vrettou E, et al.
787 Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in
788 patients with chronic hepatitis C and TH1-TH2 cytokine profile in subjects with self-
789 limited disease. *J Viral Hepat*. 2008;15(2):145–54.
- 790 135. Cacciarelli T V., Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM.
791 Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: Pre- and
792 posttreatment with interferon alfa. *Hepatology*. 1996;24(1):6–9.
- 793 136. Li X, Liu X, Tian L, Chen Y. Cytokine-Mediated Immunopathogenesis of Hepatitis B
794 Virus Infections. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2016;50(1):41–54.
- 795 137. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions
796 of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol*
797 [Internet]. 2011 Apr 23;29(1):71–109. Available from:
798 <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
- 799 138. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-
800 20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2008
801 May;121(5):1108–11. Available from:
802 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674908004107>
- 803 139. Fan X, Liu W, Li C. [Determination of serum cytokines in individuals with HCV
804 infection]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* [Internet]. 2000
805 Jun;14(2):145–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/11503046>
- 806 140. Spanakis NE, Garinis GA, Alexopoulos EC, Patrinos GP, Menounos PG, Sklavounou
807 A, et al. Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection. *J Clin Lab*
808 *Anal*. 2002;16(1):40–6.
- 809 141. Zhang, L., Miao, L., Han, F., & Dou XG. Cytokine levels in serum of patients with
810 chronic hepatitis C and its significance. *Chinese J Cell Mol Immunol* [Internet].

- 811 2011;27(3):301–3. Available from: <https://europepmc.org/article/med/21419051>
- 812 142. Cheng LS, Liu Y, Jiang W. Restoring homeostasis of CD4+ T cells in hepatitis-B-
813 virusrelated liver fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2015;21(38):10721–31.
- 814 143. Hao C, Wang J, Kang W, Xie Y, Zhou Y, Ma L, et al. Kinetics of Th17 cytokines
815 during telbivudine therapy in patients with chronic hepatitis b. *Viral Immunol*.
816 2013;26(5):336–42.
- 817 144. Zheng Y, Huang Z, Chen X, Tian Y, Tang J, Zhang Y, et al. Effects of telbivudine
818 treatment on the circulating CD4+ T-cell subpopulations in chronic hepatitis B patients.
819 *Mediators Inflamm*. 2012;2012.
- 820 145. De Souza-Cruz S, Victória MB, Tarragô AM, Da Costa AG, Pimentel JPD, Pires EF, et
821 al. Liver and blood cytokine microenvironment in HCV patients is associated to liver
822 fibrosis score: A proinflammatory cytokine ensemble orchestrated by TNF and tuned
823 by IL-10 Microbe-host interactions and microbial pathogenicity. *BMC Microbiol*
824 [Internet]. 2016;16(1):1–12. Available from: [http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-](http://dx.doi.org/10.1186/s12866-015-0610-6)
825 0610-6
- 826 146. Othman MS, Aref AM, Mohamed AA, Ibrahim WA. Serum Levels of Interleukin-6
827 and Interleukin-10 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients.
828 *ISRN Hepatol* [Internet]. 2013;2013:1–9. Available from:
829 <https://www.hindawi.com/archive/2013/412317/>
- 830 147. Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, et al.
831 Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma
832 in HCV infected patients. *Cytokine* [Internet]. 2017 Jan;89:62–7. Available from:
833 <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466616305440>
- 834 148. Crispim MAE, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MMA, Kiesslich D.
835 Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the
836 Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):1–9.
- 837
- 838
- 839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

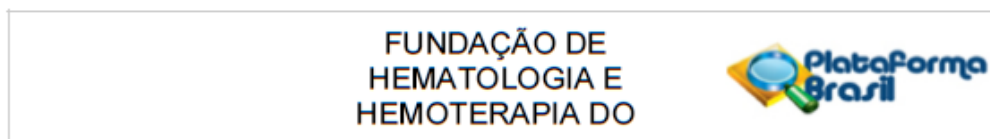
854

9. ANEXOS

855

856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884

• ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CAAE:
49652815.8.0000.0009



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO

Pesquisador: ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÔ

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49652815.8.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.982.466

Apresentação do Projeto:

Emenda apresentada ao Projeto de Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DE PEPÍDEOS MIMÉTICOS REATIVOS AOS SOROS DE PACIENTES HCV+ E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA IN VITRO.

Trata-se de um estudo descritivo, transversal constituindo subprojeto de um estudo maior da linha de pesquisa sobre Biotecnologia & Saúde intitulado: "Desenvolvimento de tecnologias aplicadas ao diagnóstico e terapia de doenças infecciosas tropicais", que será desenvolvido pelos grupos de Pesquisa "Virologia" da Universidade Federal do Pará – UFPA, em parceria com os grupos "Imunologia Básica e Aplicada" da Universidade Federal do Amazonas e "Nanotecnologia" da Universidade Federal de Uberlândia- UFU. Ainda apoiado das Universidade da Califórnia (UCDAVIS) e da Universidade de Miami(UM). Aprovado pelo Edital Pró-Amazônia n. 047/2012.

Objetivo da Pesquisa:

Determinar a reatividade em soro de indivíduos HCV+ para peptídeos miméticos ao HCV identificados pela técnica phage display e caracterizar o perfil de resposta imune celular no desenvolvimento de fibrose hepática em cultura de células.

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Pesq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE
HEMATOLOGIA E
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 1.082.466

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Risco de contaminação dos colaboradores da pesquisa com sangue contaminado com o vírus da Hepatite C.

Benefícios:

Conseguir desenvolver peptídeos que possam ser utilizados posteriormente em biossensores capazes de detectar proteínas presente em soro de pacientes que possam predizer e servir de biomarcadores para diagnóstico de fibrose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda apresentada ao projeto justificada pela necessidade de conhecer o perfil celular dos pacientes afim de entender seu papel no desenvolvimento da fibrose hepática.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos obrigatórios apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_789229 E1.pdf	05/08/2016 10:46:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Andrea_guarda_chuva.pdf	05/08/2016 10:39:15	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	carta_emenda_adendo.pdf	05/08/2016 10:24:31	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/09/2015 15:32:42	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/09/2015 15:30:02	ANDRÉA MONTEIRO TARRAGÓ	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.pdf	09/09/2015 15:21:14	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencias.docx	09/09/2015 14:46:19	ANDRÉA MONTEIRO	Aceito

Endereço: Av. Constantino Nery 4397 Bl.D Dir Ens Peaq
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3855-0114 **Fax:** (92)3855-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

- 886 • ANEXO 2: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CAAE:
887 0024.0.112.000-10.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
CAAE- 0024.0.112.000-10 - VERSÃO 002/10

IDENTIFICAÇÃO	
Título:	Avaliação do perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Instituição:	Fundação HEMOAM
Pesquisador:	Laura Patricia Viana Maia
Data da Reapresentação:	06.10.2010

OBJETIVOS	
Geral:	Avaliar o perfil celular, humoral e molecular em doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B (HBV) na cidade de Manaus.
Específico:	Avaliar a soroprevalência de doadores de sangue com sorologia reativa ao vírus da hepatite B, através dos marcadores HBsAg e/ou anti-HBc; Analisar o perfil celular dos linfócitos T CD3+/CD4+ e CD3+/CD8+; Analisar a sub-população de leucócitos ativadas através do marcador CD69+ (linfócitos, eosinófilos, basófilos e monócitos); Analisar a sub-população linfócitos T reguladores através do marcador CD25+; Avaliar o perfil de citocinas TH1 (IL12 e IFN- γ); citocinas Th2 (IL-4); citocina supressora (IL-10) e citocinas inflamatórias (IL-6, IL-8 e TNF - α); f – Caracterizar os genótipos virais na população de doadores e correlacionar com a resposta imune encontrada.

SUMÁRIO DO PROJETO	
Metodologia:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilístico que será realizado com doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc no período de novembro de 2010 a abril de 2011, com uma amostra de 123 doações reativas.
Caracterização da Amostra:	Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo não-probabilística que será realizado com todos os doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc do vírus da hepatite B no período de setembro de 2010 a setembro de 2011, totalizando 1.396 doadores (valor estimado).
Crítérios de Inclusão	Doadores de sangue com sorologia positiva para HBsAg e/ou anti-HBc, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e os que apresentarem

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS – HEMOAM
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
AV. CONSTANTINO NERY, 4397 – CHAPADA – CEP 69050-002 – MANAUS/AMAZONAS
FONE (92) 3655-0113 FAX (92) 3655-0112
E-mail: cep_hemoam@hotmail.com

888

889



	co-infecção (sífilis, doença de chagas, HCV, HIV e HTLV).
Crítérios de Exclusão	Doadores que apresentarem resultados negativos para ambos os marcadores da hepatite B na segunda amostra de sangue.

COMENTÁRIOS DO CEP FRENTE À RESOLUÇÃO CNS 196/96 E RESOLUÇÕES COMPLEMENTARES


Na análise do protocolo observou-se que os autores responderam aos questionamentos descritos no parecer anterior.

PARECER DO CEP

Projeto Aprovado. Conforme determinado pela resolução CNS 196/96 os pesquisadores deverão apresentar a este CEP relatórios parcial e/ou final, ficando determinado desde então, o prazo para apresentação de relatório: 27/04/2011. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem se apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. O termo de Consentimento deverá ser aplicado em duas vias sendo que uma delas ficará com o sujeito da pesquisa.

SITUAÇÃO	DATA DO PARECER
APROVADO	26.10.2010

- 891 • ANEXO 3: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CAAE:
892 46865015.8.3001.5262

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - IPEC / FIOCRUZ		
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Elaborado pela Instituição Coparticipante		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Estadiamento da fibrose hepática de pacientes infectados pelo vírus da Hepatite Delta por métodos não-invasivos na região Norte do Brasil		
Pesquisador: Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda		
Área Temática:		
Versão: 1		
CAAE: 46865015.8.3001.5262		
Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM		
Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 1.223.737		
Apresentação do Projeto:		
Estudo observacional de corte transversal realizado em cooperação entre as unidades: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) (Manaus, AM, Brasil). Os pacientes, estima-se a inclusão de 350, serão recrutados exclusivamente no FMT-HVD.		
Objetivo da Pesquisa:		
Objetivo Primário:		
O objetivo primário deste projeto será avaliar a prevalência transversal do estadiamento da fibrose hepática por métodos não-invasivos, assim como identificar os fatores de risco associados à presença de fibrose significativa (F2) e cirrose hepática (F=4) em pacientes com hepatite Delta.		
Objetivo Secundário:		
Os objetivos secundários deste projeto serão:		
1. Comparar o desempenho dos métodos não-invasivos (APRI, FibroTest e das sondas M e XL do Fibroscan) na avaliação da fibrose hepática;		
2. Estimar a sensibilidade e especificidade dos métodos não-invasivos utilizando modelo estatístico sem exame padrão-ouro (análise de classes latentes);		
3. Correlacionar os estágios de fibrose com fatores associado à doença hepática;		
Endereço: Avenida Brasil 4365		
Bairro: Manguinhos		CEP: 21.040-360
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)3865-9585	E-mail: cep@ipec.fiocruz.br	

Continuação do Parecer: 1.223.737

4. Quantificar a esteatose hepática por método não-invasivo (CAP).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Elastografia transitória é um método não invasivo isento de potenciais complicações. A coleta de sangue pode estar relacionada apenas um leve desconforto pode ocorrer associado à picada da agulha. Pode haver sensação momentânea de tontura ou pequena reação local, mas esses efeitos são passageiros.

Benefícios:

Os pacientes e médicos assistentes serão beneficiados com uma avaliação não-invasiva completa do estadiamento da fibrose hepática. Além disso, o projeto viabilizará a utilização de novos métodos na avaliação hepatopatias na região norte do país acometida por uma doença endêmica levando ao desenvolvimento científico e tecnológico da região. O uso de métodos não-invasivos na prática clínica poderá reduzir as possíveis complicações relacionadas à biópsia hepática e permitirá a implementação de medidas precoces a fim de prevenir complicações graves no acompanhamento a longo prazo nos pacientes portadores de hepatite Delta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Excelente projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências e nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

A aprovação do projeto será referendada na reunião deste CEP que será realizada em 16 de setembro de 2015.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE do projeto Fibro-Delta_v1_13-05-15 (1).doc	25/06/2015 16:59:18		Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

Research Article

Immunological Dynamics Associated with Direct-Acting Antiviral Therapies in Naive and Experienced HCV Chronic-Infected Patients

Grenda Leite Pereira,^{1,2} Andréa Monteiro Tarragô,^{1,2} Walter Luiz Lima Neves,^{1,2,3} Pedro Vieira da Silva Neto,^{1,2} Priscila Sarmento de Souza,^{1,2} Juliana dos Santos Affonso,^{2,4} Keyla Santos de Sousa,^{2,4} Jéssica Albuquerque da Silva,² Allyson Guimarães Costa,^{1,2,4,5} Flamir da Silva Victoria,^{4,5} Marilu Barbieri Victoria,^{4,5} and Adriana Malheiro^{1,2,5}

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

²Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil

³Instituto de Pesquisas Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ-Amazonia, Manaus, AM, Brazil

⁴Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil

⁵Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil

Correspondence should be addressed to Allyson Guimarães Costa; allyson.gui.costa@gmail.com and Adriana Malheiro; malheiroadriana@yahoo.com.br

Received 8 April 2019; Revised 9 August 2019; Accepted 4 September 2019; Published 4 November 2019

Academic Editor: Anshu Agrawal

Copyright © 2019 Grenda Leite Pereira et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The therapeutic strategies used in the treatment of hepatitis C are essentially based on the combination of direct-acting antiviral agents (DAAs). This therapy has been shown to be very effective in relation to patient adherence to treatment and has shown high rates of sustained virological response (SVR). However, the immunological dynamics of patients infected with HCV is poorly understood. This fact led us to investigate the immune system of naive and experienced patients, who we followed before the therapy and three months after the end of treatment. In this study, 35 naive and experienced Brazilian patients with chronic hepatitis C and 50 healthy donors (HD group) were studied. The analysis of the soluble immunological biomarkers was performed using the flow cytometry methodology. The SVR rate was >90% among the 35 patients. Before treatment, correlations in the naive HCV group demonstrated a mix of inflammatory response occurring with moderate correlations between chemokines, inflammatory cytokines, and Th2 profile, with a strong regulation between IL-10 and IL-17A. On the other hand, experienced patients demonstrated a poor interaction between cytokines, chemokines, and cells with a strong correlation between IL-10, IL-6, CXCL-10, and CD8⁺ besides the interactions between IFN- γ and IL-4. Furthermore, naive and experienced patients seem to have a distinct soluble biomarker profile; therefore, a long-term follow-up is needed to evaluate patients treated with DAAs.

1. Introduction

Hepatitis C is a chronic, inflammatory, slow-course, progressive, and asymptomatic liver disease caused by the hepatitis C virus (HCV). The global prevalence of chronic HCV infection has been estimated at 71 million people worldwide and can be regarded as a serious public health problem [1].

HCV infection causes deregulation of the host's immune response, favoring the chronicity of liver disease through altered and/or exacerbated signaling of proinflammatory cytokines and chemokines that may compromise the viral clearance and promote the development of hepatocellular carcinoma. In this context, it is noted that there is a great need to identify possible early biomarkers that help in the

900 ANEXO 5: ARTIGO A SER SUBMETIDO A REVISTA JOURNAL OF
901 IMMUNOLOGY RESEARCH (ISSN: 2314-7156)

902

903 **Combined influence of *IL6* and *IL10* polymorphism on cytokine**
904 **serum levels in Hepatitis Delta in the Brazilian Amazon region**

905 **Juliana dos Santos Affonso^{1,2}, Pedro Vieira da Silva Neto³, Keyla Santos de Sousa^{1,2},**
906 **Lilyane de Amorim Xabregas^{1,2}, Priscila dos Santos Sarmiento³, Maria Gabriela de**
907 **Almeida Rodrigues⁴, Allyson Guimarães da Costa^{1,2,3,4,5,6}, Ingrid Couto⁵, Hugo Perazzo⁷,**
908 **Flamir da Silva Victoria^{4,5}, Marilu Barbieri Victoria^{4,5}, Marcus Vinicius Guimarães**
909 **Lacerda^{1,4,5}, Adriana Malheiro Alle Marie^{1,2,3,6}, Andréa Monteiro Tarragô^{1,2,3,6}**

910 ¹ *Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do*
911 *Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil;*

912 ² *Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do*
913 *Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil;*

914 ³ *Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências*
915 *Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil;*

916 ⁴ *Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas*
917 *(UEA), Manaus, AM, Brazil;*

918 ⁵ *Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor*
919 *Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil;*

920 ⁶ *Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, Amazonas,*
921 *Brazil;*

922 ⁷ *Laboratório de Pesquisa Clínica em DST/AIDS (LAPCLIN-AIDS), Instituto Nacional de*
923 *Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil*

924

925 Correspondence should be addressed to: andrea_s_monteiro@hotmail.com and
926 malheiroadriana@yahoo.com

927

928 **Abstract**

929 **Background:** The hepatitis Delta virus is one of the main factors responsible for fulminant
930 hepatitis in cases of acute infection and causes the accelerated progression of liver disease in
931 chronic HBV carriers. The single-nucleotide variants located in the promoter regions of the
932 cytokines genes may be related to fibrosis progression. **Objective:** To evaluate the influence
933 of polymorphisms on the genes for Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α), Interleukin 6 (IL-
934 6) and Interleukin 10 (IL-10) genes in patients with Delta Hepatitis. **Study design:** The study
935 population consisted of seventy-seven (77) patients with hepatitis Delta and one hundred and
936 thirty-seven (137) eligible blood donors who make up the control group. The genomic regions
937 of interest of the IL6, TNF α and IL10 genes were amplified by PCR-RFLP. The measurement
938 of cytokines was performed by flow cytometry. **Results:** The G/A genotypes (TNF α -
939 308G/A) and G/C (IL6 -174G/C) appear to be risk factors for HDV infection. The analysis of
940 serum cytokine concentrations in the HDV group showed that cytokines IL-2 (p<0.0001), IL-

941 4 ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$), IL-10 ($p < 0.0031$) found significantly increased in the HDV
942 group. Serum cytokine levels for individuals in the HDV group IL-6G/C+C/C + IL-
943 10A/G+G/G demonstrated higher levels of cytokines IL-2 ($p < 0.0066$), IL-4 ($p < 0.0053$), IL-6
944 ($p < 0.0076$), IL-10 ($p < 0.0309$) and IFN- γ ($p < 0.0199$). **Conclusion:** Our findings demonstrate
945 relevance on the influence of the studied SNVs in patients with HDV on the cytokine profile.
946 TNF α -308G/A and IL6 -174G/C may predispose individuals to Hepatitis D infection. The
947 presence of the combined IL-6G / C + CC + IL-10A / G + G / G genotypes alters the profile
948 of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ . However, future studies must be carried
949 out to better elucidate the influence of these SNVs on the pathogenesis of Hepatitis Delta.

950 **Keywords:** Hepatitis D virus; Fibrosis; Polymorphisms; Cytokines.

951

952 **Introduction**

953 Hepatitis delta virus (HDV) infections remain a major health issue in endemic areas such as
954 the Middle East, Central Africa, and the western Amazon basin in South America (1). HDV
955 infection can occur simultaneously in patients with the hepatitis B virus (HBV) or in patients
956 with chronic hepatitis B, which are known as co-infection or superinfection, respectively
957 (2,3). HDV superinfection might lead to a more rapid progression of liver fibrosis to cirrhosis
958 and the development of hepatocellular carcinoma (HCC), when compared to those with HBV
959 mono-infection or HDV-HBV co-infections (4–6).

960 Historically, a liver biopsy has been used to identify the stage of liver fibrosis and/or to detect
961 advanced fibrosis/cirrhosis. However, this invasive method is costly, not well accepted by
962 patients and can be associated with potential complications and sampling error (7).
963 Fortunately, non-invasive tools have been described and validated to assess liver fibrosis
964 and/or to diagnose cirrhosis as an alternative to liver biopsy (5,8,9).

965 The immune response against the hepatitis D virus is not well understood, however, it is
966 assumed that an HDV infection induces a cellular immune response similar to the specific
967 immune response for an acute hepatitis caused by HBV (10,11). Associated with the host's
968 immune response, one can notice the presence of numerous cytokines that can act to
969 exacerbate the existing inflammation, such as tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin 6
970 (IL-6), or that can positively regulate the symptoms of inflammatory diseases, such as
971 interleukin 10 (IL-10) (12,13).

972 Single-nucleotide variants (SNVs) are located in promoting regions and can affect
973 transcription and translation and, as such, play an important role in the development of liver
974 cancer. They are also responsible for chronic inflammation combined with a high-production
975 of TNF- α , which contributes to the progression of fibrosis, liver cirrhosis, development of
976 hepatocellular carcinoma and increases the risk of death (12,13). Many studies still seek to
977 answer questions related to the profile of the immune response and genotypic profile of
978 individuals infected by HDV, since the answers to these questions are essential for generating
979 knowledge regarding immune response, the mechanisms involved in immunopathogenesis,
980 progression and the possible complications related to this infection.

981 In this context, this study seeks to generate further knowledge about the immunological
982 mechanisms and characteristics of individuals infected by HDV, the profile of the cytokines

983 and the polymorphisms that can interfere with the severity of liver damage and, consequently,
984 its most severe forms. The combination of IL-6 and IL-10 genotypes appears to alter the
985 cytokine profile in these patients.

986 **Materials and Methods**

987 *Patients and sampling*

988 The cryopreserved DNA samples were genotyped from 77 patients diagnosed with Hepatitis
989 D who attended the hepatology outpatient clinic at the Fundação de Medicina Tropical Doutor
990 Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD). The control group consisted of 137 samples of blood
991 donation candidates who attended to Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do
992 Amazonas (HEMOAM).

993 *Ethical approval*

994 The samples used in this study were obtained from projects approved by the Research Ethics
995 Committees of FMT-HVD and HEMOAM (process numbers: 46865015.8.3001.5262,
996 49652815.8.0000.0009 and 0024.0.112.000-10). All the patients signed an informed consent
997 form that was prepared in accordance with the guidelines established by the 466/12 resolution
998 of the Brazilian National Health Council and followed the guidelines of the Declaration of
999 Helsinki.

1000 *Biological sample collection and data*

1001 The total volume of 12 ml of peripheral blood was distributed in three tubes, 4 ml in each PPT
1002 tube (Plasma Preparation Tube™, Vacutainer®, BD) for procedures related to the
1003 determination of the cytokine polymorphism in question, 4 ml in a tube without anticoagulant,
1004 which was reserved for the measurement of cytokines, and 4ml in an EDTA tube for
1005 performing hematological tests. The samples were processed at the Multidisciplinary
1006 Laboratory at HEMOAM, where the serum and plasma were separated by centrifugation at
1007 1.400 g for 5 minutes and, together with the cell fraction, frozen at -80 ° C until time of use.
1008 Biochemical (aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT)) and
1009 hematological analyses were processed at the Clinical Analysis Laboratory at HEMOAM.

1010 The following mathematical formulas were used to define APRI and FIB-4: (i) $APRI = [AST$
1011 $(/ ULN)/platelet\ count] 100$; (ii) $FIB-4 = [(ageAST)/(platelet\ count [\sqrt{ALT}])]$ (14). The
1012 cut-off points used to define the degree of advanced fibrosis were defined by APRI 1.5 and
1013 FIB-4 3.25 (15,16).

1014 ***Evaluation of cytokine gene polymorphisms by PCR-RFLP***

1015 DNA samples were collected from all the study subjects in order to study the relationship
1016 between host genetic factors and HDV disease. DNA was extracted from peripheral blood
1017 leukocytes using a Brazol kit (LGC Biotechnologia, SP, Brazil) following the manufacturer's
1018 instructions (17). The PCR (Polymerase Chain Reaction) was performed according to the
1019 protocol described by Tarragô et al. (18). The genomic regions of interest of the *IL6*, *TNF α*
1020 and *IL10* genes were amplified using PCR under uniform conditions, followed by analysis of
1021 the polymorphisms of the length of the restriction fragment (RFLP). Amplification was
1022 performed using a thermocycler (Applied Biosystems, Veriti 96 Well Thermal Cycler,
1023 Carlsbad, USA), and the amplified products were electrophoresed at 100 V for 45 min in an
1024 agarose gel with Tris-Acetate-EDTA buffer (TAE 1X) (stock TAE 40 - 1.6 M tris, 0.8 M
1025 sodium acetate and 40 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt/deionized water)
1026 containing ethidium bromide and were later visualized using the UV light Gel Doc™ XR+
1027 System (Bio-Rad Corporation, Hercules, CA, USA).

1028 ***Determination of serum cytokines levels by flow cytometry***

1029 The serum levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A were determined by
1030 means of flow cytometry with a BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17
1031 Cytokine kit (BD Biosciences San Jose, CA), following the manufacturer's technical
1032 guidelines and protocols. A FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) at HEMOAM
1033 was used for sample acquisition, and FCAP-Array software (ver. 3.0.1) was used to calculate
1034 cytokine levels (pg/mL) and the mean fluorescence intensity (MFI) of each cytokine.

1035 ***Statistical and data analysis***

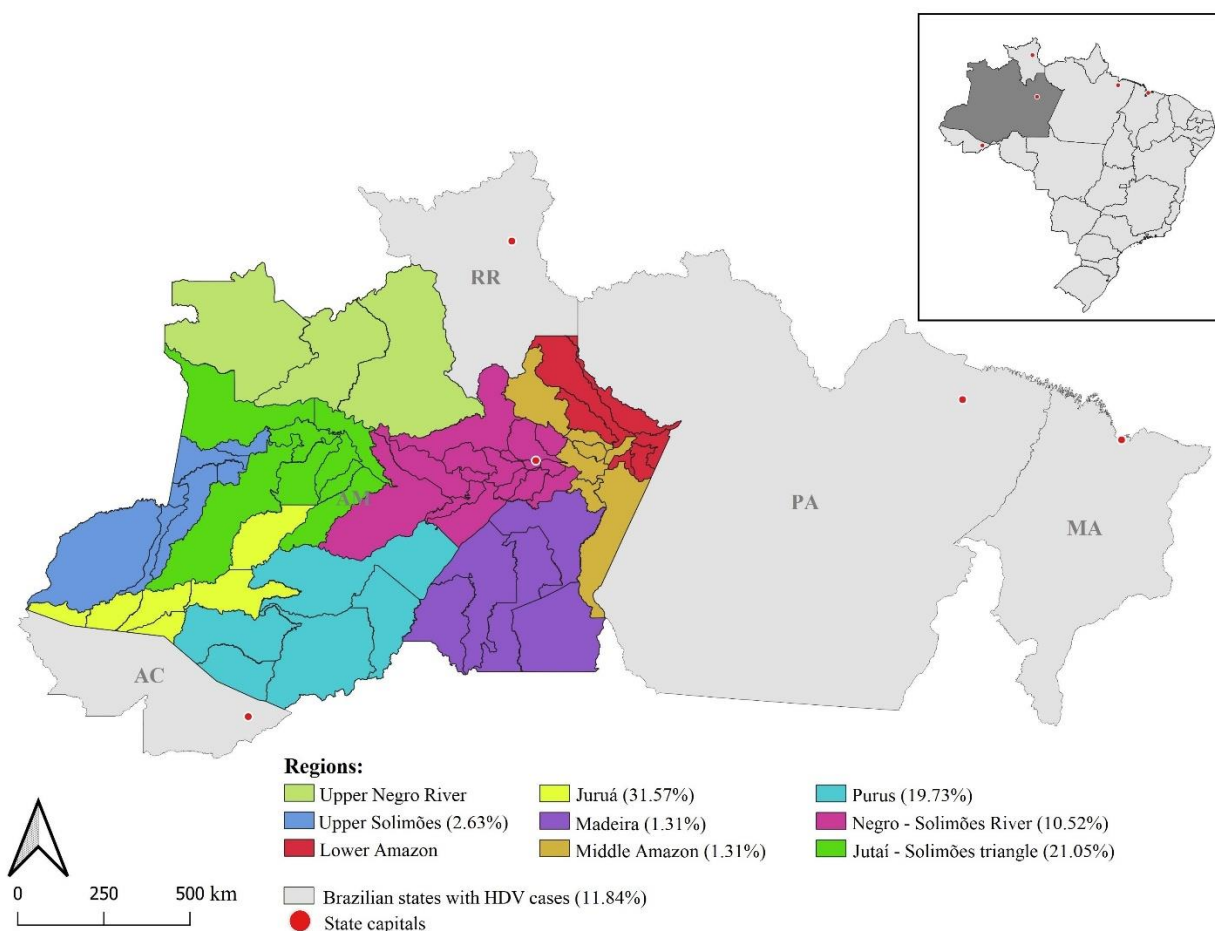
1036 Graphpad Prism v.5 software (San Diego, CA, USA) was used for comparative analysis of
1037 circulating cytokines between the genotypes of the studied SNVs. The continuous variables
1038 showed non-normal distribution and the data were analyzed using the Kruskal-Wallis non-
1039 parametric test, followed by the Dunn's multiple comparison post-test to compare pairs. A
1040 logistic regression analysis was performed to investigate the association of genotypes with the
1041 presence of HDV infection. The Hardy-Weinberg (HW) equilibrium was determined by
1042 comparing the observed and expected frequencies of the studied genotypes and alleles, and
1043 was applied in both groups via the website <https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.

1044 The Quantum Geographic Information Systems (QGIS) software version 3.16 (OSGeo,
 1045 Beaverton, OR, USA) was used for mapping the distribution of the population of the HDV
 1046 group according to place of birth.

1047 Results

1048 *Characterization, clinical and epidemiological baseline of the HDV patients*

1049 A total of 214 individuals were included in this study, of which 137 were candidates for blood
 1050 donation (control group) and 77 individuals made up the HDV group. Individuals from the
 1051 HDV group were grouped based on the names of the region's main rivers. Of the individuals,
 1052 09 (11%) declared birth in other Brazilian states (Acre, Roraima, Pará and Maranhão), as can
 1053 be seen in Figure 1. Among the individuals included in this study, there was a greater
 1054 predominance of males, both in the control group (69%) and in HDV patients (53%).
 1055 Individuals of the female sex showed a frequency of 31% for the control group and 47% in
 1056 HDV patients. The mean age observed for individuals in the control group was 30 [22 – 39]
 1057 years old and, for patients with HDV, the mean age was 45 [38 – 53] years old (**Table 1**).



1058
 1059

Figure 1. Distribution of the population of the HDV group according to place of birth.

1060 Regarding the hematological profile, the values for hematocrit (Hct) ($p < 0.0012$) and
1061 erythrocytes (RBC) ($p < 0.0001$) presented approximate mean values between the two groups,
1062 although they were statistically significant. Regarding the range of distribution of red blood
1063 cells (RDW), the HDV group also showed statistically higher values than the control group (p
1064 < 0.0001) (**Table 1**)

1065 The global count of the number of total leukocytes (WBC) also demonstrated statistical
1066 significance ($p < 0.0001$) between the groups, where the HDV group (4.5 [3.5 – 6.4]) had a
1067 lower median than the control group (6.9 [5.8 – 8]). In the differential counting of each cell
1068 type for both groups, the values of neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils were
1069 analyzed, and only differences in lymphocytes and eosinophils proved to be statistically
1070 significant ($p < 0.0002$ and $p < 0.0079$, respectively). The mean of the lymphocytes were
1071 significantly lower in patients with HDV (24.8 [19.7 – 31.6]) when compared to the control
1072 group (30.1 [25.2 – 34.7]), while the means for eosinophils were significantly increased in
1073 individuals in the HDV group (4 [2.1 - 7.1]) when compared to the control group (2.7 [1.7 -
1074 7.1]) (**Table 1**).

1075 With regard to platelet count, the HDV group (104 [39.5 – 152]) had a lower mean when
1076 compared to the control group (313 [264 – 368]) ($p < 0.0001$). However, the mean platelet
1077 volume (MPV) showed no significant difference ($p < 0.1542$) between the groups. (**Table 1**).

1078 The hematological profile of the HDV group was also analyzed according to the severity of
1079 liver disease using the FIB-4 score, by which patients were classified as $\leq F2$ and $> F2$. The
1080 RDW value in the HDV $> F2$ group showed a statistically lower value than that of the HDV
1081 group $\leq F2$ ($p < 0.0001$). On the other hand, the values of MCV ($p < 0.0492$) and RDW
1082 ($p < 0.0036$) proved to be statistically higher in the HDV group $> F2$ when compared with the
1083 HDV group $\leq F2$. In the differential cell type count for the HDV $\leq F2$ and HDV $> F2$ group,
1084 there was only a statistically significant difference for lymphocytes ($p < 0.0243$) and
1085 monocytes ($p < 0.0295$). The platelet count also showed statistically lower values for the
1086 number of platelets (PLT) ($p < 0.0001$) and for the mean platelet volume (MPV) ($p < 0.0101$) in
1087 HDV $> F2$ patients when compared with the HDV $\leq F2$ group (**Table 1**).

1088 The hepatic markers, AST and ALT, showed higher concentrations in the HDV group
1089 ($p < 0.0001$) when compared to the control group ($p < 0.0001$), and both were statistically
1090 significant. The HDV group was also analyzed according to the severity of liver disease using

1091 the FIB-4 score, by which patients were classified as \leq F2 and $>$ F2, and the HDV group \leq F2
1092 ($p<0.0001$) and $>$ F2 ($p<0.0001$) proved to be statistically significant (**Table 1**).

1093

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the study population

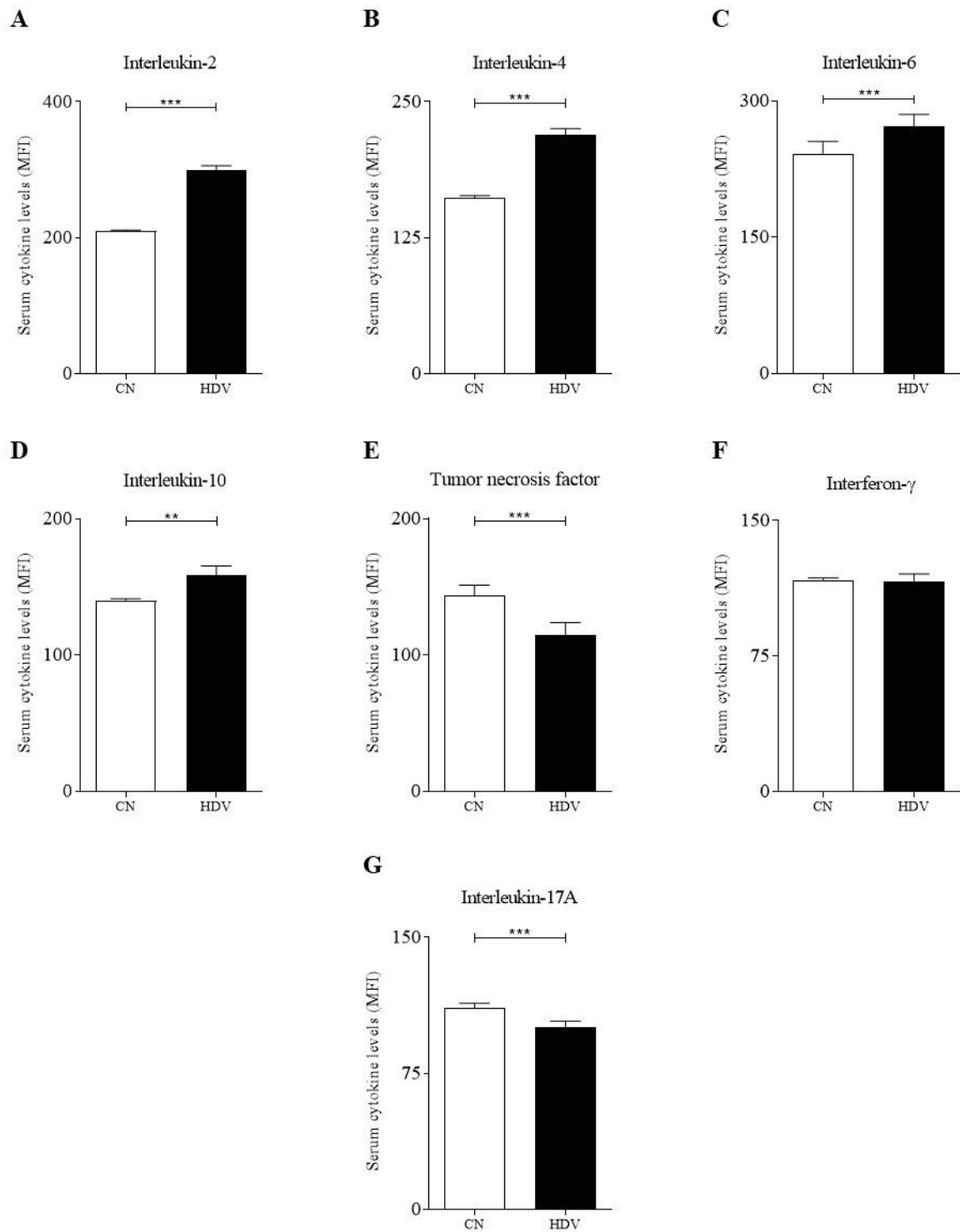
Demographic Characteristics						
Groups	Gender		P	Age (Mean [IQR])		
	Female	Male				
CN (n = 137)	42 (31%)	95 (69%)		30 [22 – 39]		
HDV (n = 77)	36 (47%)	41 (53%)		45 [38 – 53]		
Laboratory Analysis						
Hematological and Biochemical Variables	CN (n=137)	HDV (n=77)	P	Score FIB-4 (HDV patients)		
	(M [IQR])	(M [IQR])		≤F2 (n = 39)	>F2 (n = 38)	P
Blood count						
Hb (g/dl)	14.3 [12.2 – 15.3]	13.9 [12.2 – 15.1]	0.0764	13.9 [12.8 – 15.4]	13.7 [11.8 – 15]	0.5821
Hct (%)	44.4 [40.8 – 47.1]	41.3 [36.8 – 46.2]	< 0.0012	41.3 [38.3 – 45.8]	41.2 [34.8 – 46.3]	0.6948
RBC (μl)	4.9 [4.6 – 5.3]	4.5 [4 – 5]	< 0.0001	4.6 [4.1 – 5.2]	4.4 [3.8 – 4.7]	0.1239
WBC (μl)	6.9 [5.8 – 8]	4.5 [3.5 – 6.4]	< 0.0001	6.7 [4.9 – 7.2]	3.7 [2.9 – 4.4]	< 0.0001
MCV (fL)	89.1 [86.5 – 91.6]	91.9 [83.5 – 94.7]	0.0824	89.4 [82.2 – 92.8]	92.6 [86.9 – 98.4]	< 0.0492
MCH (pg)	28.8 [28 – 29.8]	30.8 [28.6 – 32.2]	< 0.0001	30.2 [28.4 – 31.4]	31.3 [29 – 32.6]	0.0988
MCHC (g/dL)	32.4 [31.8 – 32.8]	31.7 [30.5 – 33.2]	0.0313	32 [31.1 – 34]	31.5 [30.2 – 32.4]	0.0932
RDW (%)	13.2 [12.7 – 13.8]	14.9 [13.9 – 15.9]	< 0.0001	14.6 [13.5 – 15.1]	15.5 [14.4 – 16.5]	< 0.0036
Leukogram						
Neutrophils (%/mm ³)	58.2 [52.6 – 63.4]	56.7 [47.4 – 64.5]	0.4890	56.6 [46.2 – 63.5]	56.7 [47.6 – 64.5]	0.9878
Lymphocytes (%/mm ³)	30.1 [25.2 – 34.7]	24.8 [19.7 – 31.6]	0.0002	27.9 [23 – 32.6]	23.1 [17.3 – 28]	< 0.0243
Monocytes (%/mm ³)	5.7 [5 – 6.7]	6 [5.3 – 7.9]	0.0779	5.7 [5.1 – 6.7]	6.2 [5.4 – 8.7]	< 0.0295
Eosinophils (%/mm ³)	2.7 [1.7 – 7.1]	4 [2.1 – 7.1]	0.0079	3.1 [1.9 – 5.5]	4.7 [2.8 – 10]	0.0779
Plaquetogram						
PLT (/mm ³)	313 [264 – 368]	104 [39.5 – 152]	< 0.0001	149 [116 – 182]	41.5 [29 – 66]	< 0.0001
MPV (fL)	8.4 [7.4 – 9.5]	8 [7.3 – 9]	0.1542	7.8 [7.1 – 8.4]	8.4 [7.5 – 9.9]	< 0.0101
Liver markers						
AST (U/L)	19 [16 – 24]	41 [26 -74]	< 0.0001	28 [22 – 39]	71.5 [46.2 – 98.2]	< 0.0001
ALT (U/L)	18 [13 – 27]	39 [24 – 67.5]	< 0.0001	28 [17 – 52]	54.5 [35.2 – 80.5]	< 0.0001

The Mann-Whitney non-parametric test was used to obtain the p-value. IQR= Interquartile range. CN = Healthy donors.

1096 *Association between HDV disease and serum cytokine levels in HDV patients*

1097 The cytokine profile of the healthy donors and of the HDV group was plotted together with
1098 the analysis of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A obtained from
1099 the mean of fluorescence intensity (MFI) of each cytokine.

1100 When analyzing the concentration of serum cytokines in the control group and HDV group,
1101 we observed that the cytokines IL-2 ($p<0.0001$), IL-4 ($p<0.0001$), IL-6 ($p<0.0001$), IL-10
1102 ($p<0.0031$) were significantly increased in the HDV patients. In contrast, TNF ($p<0.0001$) and
1103 IL-17A ($p<0.0001$) serum levels were higher in the healthy patients (**Figure 2**).



1104

1105 **Figure 2.** Association of mean fluorescence intensity of serum cytokines IL-2 (A), IL4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D),
 1106 TNF (E), IFN- γ (F) and IL17A (G) in the control group (□), HDV group (■). Cytokines were quantified by
 1107 flow cytometry using the CBA kit (Cytometric bead array). The results are presented through the mean and
 1108 standard deviation of the analytes. The Mann-Whitney test was used to assess statistical significance. Significant
 1109 statistical difference was considered when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. CN = Healthy donors.

1110

1111 ***Association of genotypes and alleles of polymorphisms in patients with Hepatitis D***

1112 The population groups were submitted to the Hardy-Weinberg test and proved to be balanced,
1113 and the allelic and genotypic frequencies were compared for *TNF*, *IL6* and *IL10* SNVs among
1114 the control and HDV groups, as shown in Table 2.

1115 The genotype distributions for *TNF α -308G/A* and *IL6 -174G/C* were significantly different
1116 between the groups ($p = 0.0187$ and $p = 0.0191$, respectively). The G/A (*TNF α -308G/A*) and
1117 G/C (*IL6 -174G/C*) genotypes appear to be risk factors for HDV infection (*TNF α -308G/A*:
1118 G/G vs. G/A OR = 2.977 [95% CI: 1.159 - 7.645, $p = 0.0187$]; *IL6 -174G/C*: G/G vs. G/C
1119 OR = 2.196, [95% CI: 1.128 - 4.276, $p = 0.0191$]; *IL6 -174G/C*: G/G vs. G/C+C/C OR =
1120 2.284, [95% CI: 1.203 - 4.336, $p = 0.0106$]) (**Table 2**).

1121

Table 2. Distribution of genotypic frequencies of *TNFA*, *IL6* and *IL10* cytokine genes.

Genotypic and Allelic Profile	CN (n=137)	HDV (n=77)	OR (CI 95%)	p	HDV		OR (CI 95%)	P	
					≤F2 (n=39)	>F2 (n=38)			
<i>TNFA</i> -308G/A (rs1800629)									
G/G	129 (94.2%)	65 (84.4%)	2.977 (1.159 - 7.645)	0.0187	32 (82%)	33 (86.8%)	0.693 (0.216-2.357)	0.56227	G/G vs. G/A
G/A	8 (5.8%)	12 (15.6%)			7 (17.9%)	5 (13.1%)			
A/A	-	-			-	-			
G	266 (97%)	142 (92%)	2.810 (1.122 - 7.035)	0.0219	71 (91%)	71 (93,4%)	0.714 (0.216-2.357)	0.57927	G vs. A
A	8 (3%)	12 (8%)			7 (8.9%)	5 (6.5%)			
<i>IL6</i> -174G/C (rs1800795)									
G / G	112 (81.8%)	51 (66.2%)	2.196 (1.128 - 4.276)	0.0191	29 (74.3%)	22 (57.8%)	1.714 (0.635-4.627)	0.28582	G/G vs. G/C
G / C	23 (16.8%)	23 (29.9%)	2.284 (1.203 - 4.336)	0.0106	10 (25.6%)	13 (34.2%)	2.109 (0.803-5.536)	0.12667	G/G vs. G/C+C/C
C / C	2 (1.5%)	3 (3.9%)	3.294 (0.534 - 20.322)	0.1757	-	3 (7.8%)	9.178 (0.451-186.854)	0.05491	G/G vs. C/C
G	247 (90%)	125 (81%)	2.122 (1.204 - 3.741)	0.0082	68 (87.1%)	57 (75%)	2.267 (0.976-5.265)	0.05326	G vs. C
C	27 (10%)	29 (19%)			10 (12.8%)	19 (25%)			
<i>IL10</i> -1082A/G (rs1800896)									
A / A	74 (54%)	38 (49.4%)	1.204 (0.6743 - 2.149)	0.5302	20 (51.2%)	18 (47.3%)	1.250 (0.495-3.158)	0.63683	A/A vs. A/G
A / G	55 (40.1%)	34 (44.2%)	1.206 (0.6892 - 2.109)	0.5121	16 (41%)	18 (47.3%)	1.170 (0.478-2.860)	0.73128	A/A vs. A/G+G/G
G / G	8 (5.8%)	5 (6.5%)	1.217 (0.3724 - 3.977)	0.7447	3 (7.6%)	2 (5.2%)	0.741 (0.1111-4.948)	0.75616	A/A vs. G/G
A	203 (74%)	110 (71%)	1.144 (0.7351 - 1.779)	0.5514	56 (71.7%)	54 (71%)			A vs. G
G	71 (26%)	44 (29%)			22 (28.2%)	22 (28.9%)	1.037 (0.515-2.087)	0.91881	

1122

OR=Odds ratio. CI= Confidence interval. CN = Healthy donors.

Polymorphism in TNF α -308G/A, IL-6 -174G/C and IL-10 -1082A/G in influenced circulating cytokines

The influence between the marker genotypes and the concentrations of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL-17A was observed in the serum of individuals in the control group and in the HDV group.

When associating the *TNF α -308G/A* cytokine gene polymorphism with the cytokine profile analyzed, it was observed that individuals with the G/G genotype had higher serum levels of cytokines for IL-2, IL-4, IL -6, TNF and IL-17A. On the other hand, individuals who carried G/A genotype showed high levels of IFN- γ serum levels. In the analysis between the G/G vs. G/A genotypes, there were no statistically significant differences for any of the non-parametric tests used (**Figure 3**).

In the association of the *IL6 -174G/C* cytokine gene polymorphism for the proposed cytokines, a varied pattern of cytokine profile was observed, in which higher levels of TNF and IFN- γ were observed in individuals of G/G genotype. For the cytokines IL-2 and IL-4, higher serum levels were observed in individuals of genotype G/C, while the cytokines IL-6 IL-10 and IL-17A showed to be higher in individuals of genotype C/C. However, analyses between genotypes did not show statistically significant differences in any of the non-parametric tests used (**Figure 3**).

In the analysis of the *IL10 -1082A/G* cytokine gene polymorphism, a varied pattern of cytokine profile was also observed. Serum concentrations of cytokines IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ and IL-17A in individuals of genotype A/G were high when compared with the two other genotypes. The cytokine IL-10 was the only one with a high expression level in individuals with G/G genotype. The cytokines associated with the A/A genotype, in general, remained in low concentrations. However, individuals who carry the A/G genotype have higher serum concentrations of IL-4 ($p < 0.0395$) compared to individuals who carry the A/A genotype (**Figure 3**).

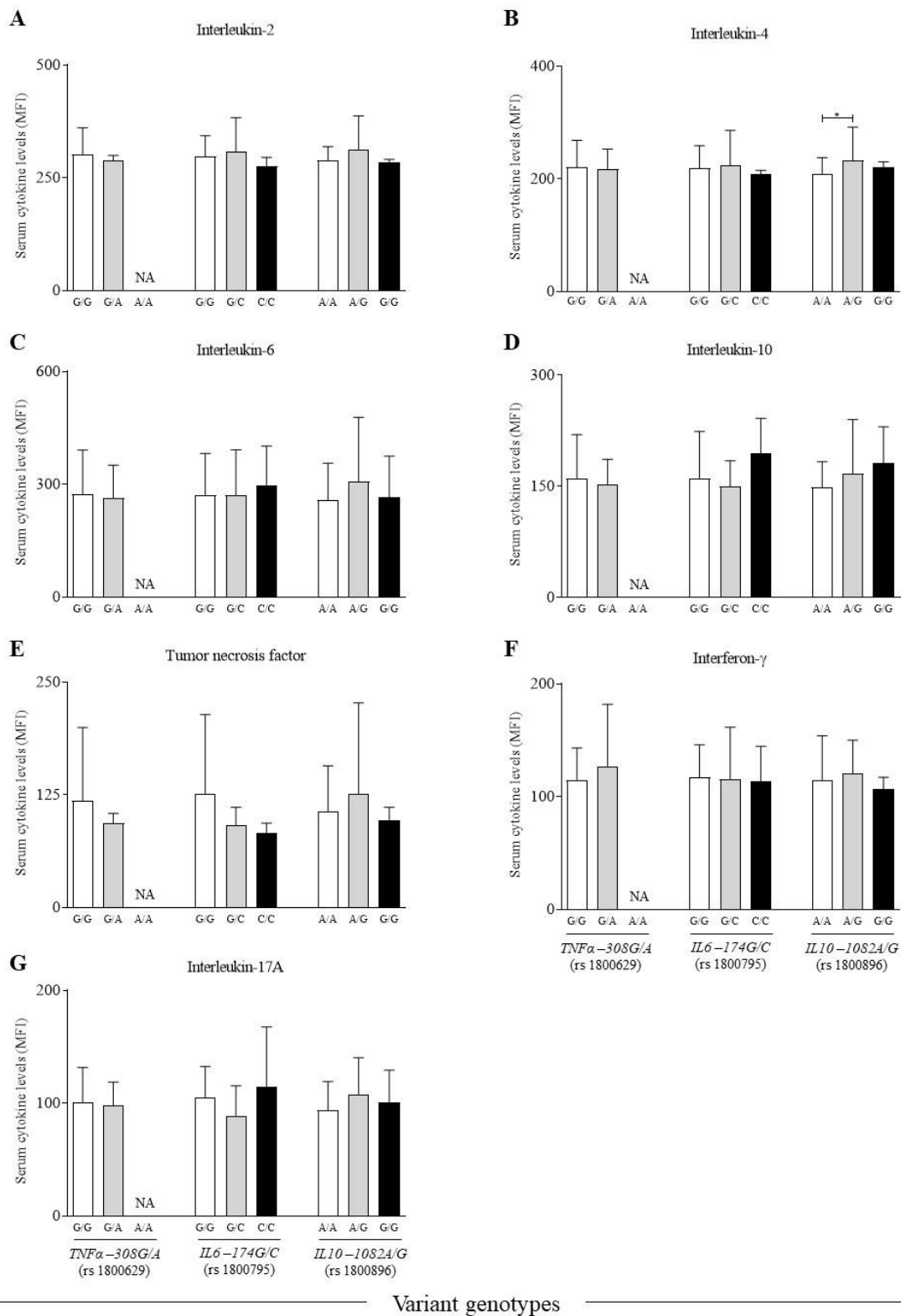


Figure 3. Association of mean fluorescence intensity of serum cytokines IL-2 (A), IL4 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), TNF (E), IFN- γ (F) and IL17A (G) among SNV variant genotypes TNF, IL-6 and IL-10 among genotypes categorized as homozygote (□), heterozygote (▒) and mutant homozygote (■). The results are presented by means and standard deviations. The Kruskal-Wallis/Mann-Whitney tests were used to assess statistical

significance. Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney test. Significant statistical difference was considered when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.0001$. NA = Not applicable.

The cytokine serum levels of HDV patients who carried the combined SNVs (IL-6G/C + C/C + IL-10A/G + G/G) expressed higher levels of cytokines IL-2 ($p < 0.0066$), IL-4 ($p < 0.0053$), IL-6 ($p < 0.0076$), IL-10 ($p < 0.0309$) and IFN- γ ($p < 0.0199$), when compared with the group without the presence of polymorphic alleles (IL-6G/G + IL-10A/A).

HDV patients were segregated according to the degree of severity of the disease (FIB-4 Score $\leq F2$ or $> F2$) and we observed that, in the subgroup with FIB-4 Score, $\leq F2$ individuals with the combination IL-6G/C + C/C + IL-10A/G + G/G have higher serum levels in individuals who carry the IL-6G/G + IL-10A/A combination in IL-4 ($p < 0.0209$) compared to individuals that carry the genotype without the presence of the mutated allele. In addition, there is also an increase in the concentration of IL-2 and IFN- γ , although they did not show significant statistical differences (**Figure 4**).

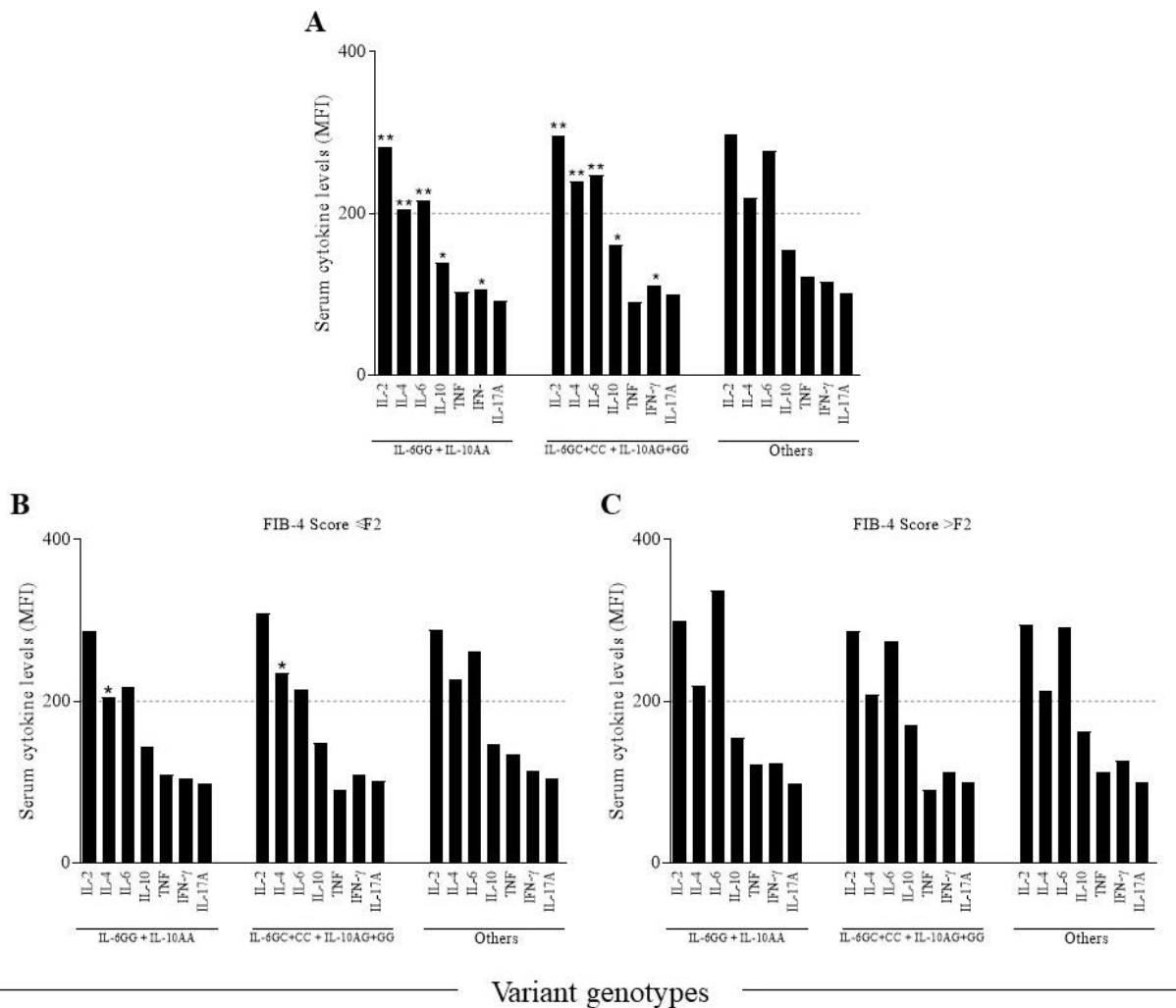


Figure 4. Mean fluorescence intensity of serum cytokines IL-2, IL4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ and IL17A among the SNV variant genotypes IL-6 and IL-10. (A) The individuals with HDV formed subgroups according to the combination of genotypes IL-6G/G + IL-10A/A, IL-6G/C + CC + IL-10A/G + G/G and Others. (B) Individuals with HDV formed subgroups according to the combination of IL-6G/G + IL-10A/A, IL-6G/C + CC + IL-10A/G + G/G genotypes and Others classified using FIB score -4 \leq F2. (C) Individuals with HDV formed subgroups according to the combination of IL-6G/G + IL-10A / A, IL-6G/C + CC + IL-10A/G + G/G genotypes and Others classified using FIB score -4 $>$ F2. The Kruskal-Wallis test was used to assess statistical significance. Significant statistical difference was considered when * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.0001.

Discussion

In the present study, a higher prevalence of HDV infection was observed in male individuals (mean age of 45 years). These data corroborate with previous studies carried out in the Amazon region with individuals with hepatitis B (14,19–21). In this study, twenty-five municipalities in the state of Amazonas were registered. Of these, the municipalities located in the Vale do Juruá and Vale do Purus had the highest number of HDV cases registered. This is in line with previous studies that describe the regions located in the basins of the Juruá, Solimões and Purus Rivers as being areas of great endemicity of this virus (22,23).

As for the results of the analysis of hematological variables, it was observed that HDV patients have a slight increase in monocytes and eosinophils, in addition to presenting a clinical picture of thrombocytopenia when compared with the healthy donors. No recent studies have been found that relate viral hepatitis to a decrease in monocytes and eosinophils, despite viral infections, such as cytomegalovirus (CMV) and respiratory infection, being common causes of monocytosis (24,25). However, one study demonstrated that patients infected with chronic hepatitis B had lymphocytes in large quantities in peripheral blood (26).

Thrombocytopenia was observed in the population of this study, and a general analysis of the HDV group showed a slight decrease in circulating platelets. On the other hand, HDV patients classified as > F2 exhibit moderate thrombocytopenia. This condition, commonly seen in patients with the hepatitis C virus, is associated with the development of more severe forms of liver disease, although it is also present in patients with chronic hepatitis B and, hepatitis D and the hematological changes may be associated with several factors mostly related to antinuclear antibodies, antiphospholipid/antinuclear/antiplatelet antibodies and hypersplenism (27–29).

A Korean study carried out with 122,200 patients with HBV, without liver cirrhosis and splenomegaly, highlighted other mechanisms that trigger thrombocytopenia, such as age (individuals aged 40 or over), gender (male) and weight (obese). The study reported them to be more predisposed to having lower levels of white blood cells (WBC), neutrophils, and platelets and high levels of AST and ALT when compared to healthy individuals (28).

These characteristics, which define a worse prognosis, can, in part, be explained by immunosenescence and inflammaging, which refer, respectively, to the natural reduction of the immune system response and is affected by aging and to the reforming of the pattern of

expression of cytokines (IL-6 , IL-10, IFN- γ , TNF- α and IL-1 α) that lead to a pro-inflammatory phenomenon in the organism and that contribute significantly to the appearance of several age-related pathologies (30–32).

In the Amazon region, HDV infection is the main cause of liver cirrhosis in children and young adults. Hepatocellular carcinoma (HCC) is a substantial complication in liver cirrhosis, and is the most common primary cancer in the liver and is related to chronic infections (33). In view of the accelerated clinical course of HDV, which contributes to the progression from fibrosis to cirrhosis over the years, the ratio of the biochemical markers of liver damage AST/ALT has been used for several years as a non-invasive method for assessing severity in chronic liver disease (34).

It is known that cytokines are immunomodulatory molecules capable of providing protection against pathogens, and the SNVs present in the modulating region of these molecules tend to affect their production, which causes great immune imbalance (35) and contributes to these being responsible for the increased risk of the progression of liver fibrosis (36).

The association of the -308G/A variant present in the promoter region of *TNF α* with hepatitis D in this study corroborated other observations of association and reinforces the findings of previous studies carried out in the Amazon region with patients chronically infected with HBV and HCV (18,37). Abraham and Kroeger (38) associated the A allele with greater production of cytokines and higher levels of genetic transcription when compared to the G allele, resulting in high concentrations of TNF, while Jeng et al. (39) associated greater production of cytokines and higher levels of genetic transcription with the risk of developing liver fibrosis. Radwan et al. (40) associated these events with cirrhosis and HCC in HCV patients.

The genotype G/G of the SNV *IL6* -174G/C was also associated with HDV infection. Together, these data confirm recent studies with HDV infection and suggest that IL-6 may play a key role in the development of chronic HBV infection and that it is directly related to the production capacity of IL-6 in plasma and worsening in the evolution of chronic liver disease (38,41–43).

Different studies have sought to describe the relationship of polymorphisms located in the promoter region of the *IL10* -1082A/G gene with the progression of liver fibrosis and the

susceptibility to the development of cirrhosis for both HBV and HCV infected individuals (44,45). However, low serum levels of IL-10 may lead to a deficiency in the immune response against viruses and the exacerbated production of IL-10 may be associated with spontaneous viral clearance (46). SNV in the *IL10 -1082A/G* gene was evaluated and it was observed that the A/A genotype had a higher frequency, followed by the A/G and G/G genotypes for both the control and HDV groups. The genotypes associated with the polymorphism of these G/G, A/G and A/A genes are related, respectively, to high, medium, and low IL-10 production (47).

The disturbance in the balance of inflammatory/anti-inflammatory cytokines can directly reflect on the type of infection to be developed. HBV-infected patients who showed a dominant inflammatory profile developed acute self-limited hepatitis and fulminant hepatitis. However, when the Th2 profile was higher, the patients developed chronic hepatitis (48).

The profile of inflammatory cytokines and the regulatory cytokines are in higher concentrations in the serum of individuals in the HDV group when compared with healthy donors. This cytokine profile may be directly related to the genotypes identified in this study population, since the G/G genotype in the *IL6 -174G/C* gene showed a higher frequency and lead this population to express higher serum IL-6 levels.

Elevated levels of IL-6 are known to modulate the acute inflammatory response and lead to the production of IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and tumor necrosis factor p55 (sTNF-R55), which suppress the TNF- α cytokine (32). The cytokine IL-10 suppresses the actions of IL-6, TNF- α and IL-8 (49,50) and our study population represents approximately 6% of individuals with the G/G genotype that is related to high levels of IL-10. As such, this fact makes the high expression of IL-6 favorable.

In our study, we performed combinations with the polymorphism genotype variants in the cytokine genes *IL6 -174G/C* and *IL10 -1082A/G*, which can affect cytokine synthesis and lead to distinct serum levels in these individuals. Our findings demonstrated that HDV patients with the presence of polymorphic alleles (IL-6G/C+C/C + IL-10A/G+G/G) had a prominent pro-inflammatory profile mediated by higher levels of IL-2, IL-6 and IFN- γ , while for individuals with an FIB-4 Score \leq F2, those with the combination IL-6G/G + IL-10A/A have higher serum levels of IL-4.

Data in the literature demonstrate that serum levels of the cytokines IL-6 and IL-10 can assist in clinical investigation when used as potential biomarkers for HCC and are strongly associated with tumor size (51). In a study carried out with patients with chronic HCV who had several polymorphisms in the promoter regions in the genes of the cytokines IL-6 and IL-10 and which produced these cytokines in an exacerbated manner, the patients were more likely to develop HCC and complications when compared to those patients who had decreased serum levels (52).

These findings corroborate previous findings that report that genetic and environmental factors contribute to changes in the immune profile and genetic background of the host. As such, studies that correlate more types of polymorphic changes that interact with each other can better determine changes in the profile of cytokines and thus disease severity (18).

This study has some limitations. The blood donors that comprised the control group served as a normal parameter for analysis purposes. Although the Amazon region is one of the main endemic areas, the sample size is small and can influence the levels of association with HDV infection and the severity of the disease, and this reason also interferes in the intra-comparison of the combination of genotypes when studied with the cytokine profile. However, it showed that the combinations of these polymorphisms seem to influence the severity of chronic liver disease, although further studies are needed to confirm this preliminary finding.

Conclusions

In conclusion, our findings on the influence of the polymorphisms studied in patients with hepatitis delta demonstrated them to be relevant to the cytokine profile. *TNFA* -308G/A and *IL6* -174G/C may predispose individuals to hepatitis D infection. The presence of the combined IL-6G/C+C/C + IL-10A/G+G/G genotypes alters the profile of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 and IFN- γ . Therefore, the results of this study add further knowledge and can serve as a basis for future studies to better elucidate the influence of these SNVs on the pathogenesis of hepatitis delta.

Data Availability

The data used to support the findings of this study can be obtained from the corresponding author upon request.

Conflicting Interests

The authors declare no commercial or other associations that might pose a conflict of interests.

Funding Statement

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program - 002/2008 and PAPAC Program - 005/2019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (process 404878/2016-4) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). JSA, KSS and LAX, have fellowship from FAPEAM (Master student). PVSN is research fellow from CAPES (PhD student). AM and MVGL are research fellows from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

1. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. *Gut*. 2000;46(3):420–6.
2. Buti M, Homs M, Rodriguez-Frias F, Funalleras G, Jardí R, Sauleda S, et al. Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: A long-term follow-up study. *J Viral Hepat*. 2011;18(6):434–42.
3. Ji J, Sundquist K, Sundquist J. A Population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2012;104(10):790–2.
4. Alvarado-Mora M V., Rebello Pinho JR. Epidemiological update of hepatitis B, C and delta in Latin America. *Antivir Ther*. 2013;18(3 PARTB):429–33.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite B e Coinfecções. Brasília; 2017. 120 p.
6. Ferreira CT, Silveira TR da. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. *Rev Bras Epidemiol*. 2004;7(4):473–87.
7. Bedossa P, Dargere D, Paradis V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003 Dec;38(6):ajhep09022.
8. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134(6):1655–69.
9. Castera L, Yuen Chan HL, Arrese M, Afdhal N, Bedossa P, Friedrich-Rust M, et al. EASL-ALEH Clinical Practice Guidelines: Non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis. *J Hepatol*. 2015;63(1):237–64.
10. Aragona M, Caredda F, Lavarini C, Farci P, Macagno S, Crivelli O, et al. SEROLOGICAL RESPONSE TO THE HEPATITIS DELTA VIRUS IN HEPATITIS D. *Lancet [Internet]*. 1987 Feb;329(8531):478–80. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687920903>
11. Grabowski, Jan; Wedemeyer H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. *Dig Dis*. 2010;28(1):133–8.
12. Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghrayeb J, Reimann KA, Purcell RH, et al. CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus Infection. *J Virol*. 2003;77(1):68–76.
13. Gitto S, Micco L, Conti F, Andreone P, Bernardi M. Alcohol and viral hepatitis: A mini-review. *Dig Liver Dis*. 2009;41(1):67–70.
14. Couto I, Victoria M, Veloso VG, Rodrigues L, Grinsztejn B, Lacerda M, et al. Prevalence and predictors for compensated Advanced Chronic Liver Disease (c-

- ACLD) in patients with chronic Hepatitis Delta Virus (HDV) infection. *PLoS One*. 2017;12(3):1–15.
15. Wai CT, Greenson JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003;38(2):518–26.
 16. Vallet-Pichard A, Mallet V, Nalpas B, Verkarre V, Nalpas A, Dhalluin-Venier V, et al. FIB-4: An inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection. Comparison with liver biopsy and FibroTest. *Hepatology*. 2007;46(1):32–6.
 17. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* [Internet]. 2006 Aug 27;1(2):581–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2006.83>
 18. Tarragô AM, da Costa AG, Pimentel JPD, Gomes STM, Freitas FB, Lalwani P, et al. Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian HCV-infected patients. *Hum Immunol* [Internet]. 2014 Nov;75(11):1075–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885914003978>
 19. da Silva Victoria F, de Oliveira CMC, Victoria MB, Victoria CB, Ferreira LCL. Characterization of HBeAg-negative chronic hepatitis B in western Brazilian Amazonia. *Brazilian J Infect Dis*. 2008;12(1):27–37.
 20. Castilho MDC, De Oliveira CMC, De Lima Gimaque JB, Di Tommaso Leão J, Braga WSM. Epidemiology and molecular characterization of hepatitis B virus infection in isolated villages in the western Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(4):768–74.
 21. Braga WSM, De Oliveira CMC, De Araújo JR, Castilho MDC, Rocha JM, Gimaque JB DL, et al. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage - A case series of HDV-3 patients. *J Hepatol* [Internet]. 2014;61(6):1205–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.041>
 22. De Oliveira MS, Do Valle SDCN, Silva RPM, De Figueiredo EN. Hepatite B e a superinfecção por vírus D em pacientes crônicos na Amazônia ocidental brasileira. *Rev Epidemiol e Control Infecção*. 2015;5(2):72–8.
 23. Crispim MAE, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MMA, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):1–9.
 24. Bicer S, Giray T, Çöl D, Erdağ GÇ, Vitrinel A, Gürol Y, et al. Virological and clinical characterizations of respiratory infections in hospitalized children. *Ital J Pediatr* [Internet]. 2013;39(1):22. Available from: <http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-39-22>
 25. Min C-Y, Song JY, Jeong SJ. Characteristics and prognosis of hepatic cytomegalovirus

infection in children: 10 years of experience at a university hospital in Korea. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2017;60(8):261. Available from: <http://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2017.60.8.261>

26. Vingerhoets J, Michielsen P, Vanham G, Bosmans E, Paulij W, Ramon A, et al. HBV-specific lymphoproliferative and cytokine responses in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol*. 1998;28(1):8–16.
27. Tejima K, Masuzaki R, Ikeda H, Yoshida H, Tateishi R, Sugioka Y, et al. Thrombocytopenia is more severe in patients with advanced chronic hepatitis C than B with the same grade of liver stiffness and splenomegaly. *J Gastroenterol*. 2010;45(8):876–84.
28. Joo EJ, Chang Y, Yeom JS, Lee YG, Ryu S. Hepatitis B infection is associated with an increased incidence of thrombocytopenia in healthy adults without cirrhosis. *J Viral Hepat*. 2017;24(3):253–8.
29. LIMA DS, MURAD JÚNIOR AJ, BARREIRA MA, FERNANDES GC, COELHO GR, GARCIA JHP. Liver Transplantation in Hepatitis Delta: South America Experience. *Arq Gastroenterol*. 2018;55(1):14–7.
30. Frasca D, Blomberg BB. Inflammaging decreases adaptive and innate immune responses in mice and humans. *Biogerontology* [Internet]. 2016 Feb 29;17(1):7–19. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10522-015-9578-8>
31. Frasca D, Blomberg BB, Paganelli R. Aging, Obesity, and Inflammatory Age-Related Diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Dec 7;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01745/full>
32. Rea IM, Gibson DS, McGilligan V, McNerlan SE, Alexander HD, Ross OA. Age and Age-Related Diseases: Role of Inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Apr 9;9. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00586/full>
33. Abbas Z, Qureshi M, Hamid S, Jafri W. Hepatocellular carcinoma in hepatitis D: Does it differ from hepatitis B monoinfection. *Saudi J Gastroenterol*. 2012;18(1):18–22.
34. Takyar V, Surana P, Kleiner DE, Wilkins K, Hoofnagle JH, Liang TJ, et al. Noninvasive markers for staging fibrosis in chronic delta hepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;45(1):127–38.
35. Saxena R, Kaur J. Th1/Th2 cytokines and their genotypes as predictors of hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol*. 2015;7(11):1572–80.
36. Xia C, Liu Y, Chen Z, Zheng M. Involvement of Interleukin 6 in Hepatitis B Viral Infection. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(2):677–86.
37. Conde SR et al. Association of cytokine gene polymorphisms and serum concentrations with the outcome of chronic hepatitis B. *Cytokine* [Internet]. 2013;61(3):940–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.01.004>

38. Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: Relevance to disease. *J Leukoc Biol.* 1999;66(4):562–6.
39. Jeng JE, Tsai JF, Chuang LY, Ho MS, Lin ZY, Hsieh MY, et al. Tumor necrosis factor- α 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia.* 2007;9(11):987–92.
40. Radwan MI, Pasha HF, Mohamed RH, Hussien HIM, El-Khshab MN. Influence of transforming growth factor- β 1 and tumor necrosis factor- α genes polymorphisms on the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients. *Cytokine [Internet].* 2012;60(1):271–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2012.05.010>
41. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest [Internet].* 1998 Oct 1;102(7):1369–76. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/2629>
42. Li C, Zhi-Xin C, Li-Juan Z, Chen P, Xiao-Zhong W. The association between cytokine gene polymorphisms and the outcomes of chronic HBV infection. *Hepatol Res.* 2006;36(3):158–66.
43. Giannitrapani L, Soresi M, Balasus D, Licata A, Montalto G. Genetic association of interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) with chronic liver diseases and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2013;19(16):2449–55.
44. Srivastava M, Ranjan A, Choudhary JK, Tripathi MK, Verma S, Dixit VK, et al. Role of proinflammatory cytokines (Interferon Gamma) and anti-inflammatory cytokine (Interleukin-10) gene polymorphisms in chronic hepatitis B Infection: An Indian Scenario. *J Interf Cytokine Res.* 2014;34(7):547–51.
45. Corchado S, Márquez M, Montes de Oca M, Romero-Cores P, Fernández-Gutiérrez C, Girón-González JA. Influence of Genetic Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha and Interleukin 10 Genes on the Risk of Liver Cirrhosis in HIV-HCV Coinfected Patients. *PLoS One.* 2013;8(6):1–8.
46. Ramos JA, Silva R, Hoffmann L, Ramos ALA, Cabello PH, Ürményi TP, et al. Association of IL-10, IL-4, and IL-28B gene polymorphisms with spontaneous clearance of hepatitis C virus in a population from Rio de Janeiro. *BMC Res Notes.* 2012;5:0–5.
47. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson I V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet.* 1997;24(1):1–8.
48. Li X, Liu X, Tian L, Chen Y. Cytokine-Mediated Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus Infections. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;50(1):41–54.

49. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 Apr 23;29(1):71–109. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-immunol-031210-101312>
50. Commins S, Steinke JW, Borish L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2008 May;121(5):1108–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091674908004107>
51. Othman MS, Aref AM, Mohamed AA, Ibrahim WA. Serum Levels of Interleukin-6 and Interleukin-10 as Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. *ISRN Hepatol* [Internet]. 2013;2013:1–9. Available from: <https://www.hindawi.com/archive/2013/412317/>
52. Sghaier I, Mouelhi L, Rabia NA, Alsaleh BR, Ghazoueni E, Almawi WY, et al. Genetic variants in IL-6 and IL-10 genes and susceptibility to hepatocellular carcinoma in HCV infected patients. *Cytokine* [Internet]. 2017 Jan;89:62–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466616305440>