



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA



AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E FREQUÊNCIA DO
POLIMORFISMO DE TNF- α - 308 EM PACIENTES COM HEPATITE C

SORIANE DE SOUZA CRUZ

MANAUS - AMAZONAS
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA

SORIANE DE SOUZA CRUZ

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E FREQUÊNCIA DO
POLIMORFISMO DE TNF- α - 308 EM PACIENTES COM HEPATITE C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Flamir da Silva Victoria

MANAUS - AMAZONAS
2013

SORIANE DE SOUZA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE E FREQUÊNCIA DO
POLIMORFISMO DE TNF- α - 308 EM PACIENTES COM HEPATITE C**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”

APROVADA EM: 17 / 09 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Malheiro, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Ricardo Ishak, membro externo
Universidade Federal do Pará

Prof^a. Dr^a. Cristina Melo Rocha, membro interno
Universidade do Estado do Amazonas



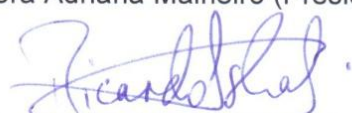
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata da Defesa de Dissertação
da aluna **Soriane de Souza
Cruz**, realizada em 17 de
setembro de 2013.

Aos dezessete dias do mês de setembro do ano de dois mil e treze, às nove horas, na Sala 10, do Bloco E, da Fundação HEMOAM, a aluna deste Programa, **Soriane de Souza Cruz**, apresentou à banca examinadora a sua Dissertação de Mestrado intitulada "*Avaliação da resposta imune e frequência do polimorfismo de TNF-alfa -308 em pacientes com hepatite C*". A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Professora Doutora Adriana Malheiro (Presidente), Professor Doutor Ricardo Ishak (Membro), Professora Doutora Cristina Melo Rocha (Membro), decidiu, após a apresentação e arguição, pela aprovação (X) ou não aprovação () de sua dissertação.


Profª Doutora Adriana Malheiro (Presidente)


Prof. Doutor Ricardo Ishak (Membro)


Profª Doutora Cristina Melo Rocha (Membro)

Aos meus queridos e amados
pais, ***Maria Izabel*** e ***Mário Jorge***
pelo amor, dedicação e incentivo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por sempre me conduzir pelos caminhos corretos e me proporcionar oportunidades maravilhosas.

Aos meus queridos e amados pais, **Maria Izabel** e **Mário Jorge** pelo amor, dedicação, incentivo e por me ensinarem os valores da vida.

Aos meus queridos irmãos **Suziane, Júnior e Soraya** por toda paciência e ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu querido irmão **Augusto César** e sua família, minha sobrinha **Yasmin** e cunhada **Juliana**, por todo acolhimento e apoio recebido durante meu processo de formação.

A minha querida amiga **Giselle**, por todo carinho, atenção e ajuda nos momentos mais difíceis.

A minha orientadora **Dra. Adriana Malheiro**, pela oportunidade e ensinamentos, por contribuir no meu processo de amadurecimento, formação e expandir o meu desejo pela pesquisa.

Ao meu co-orientador, **Dr. Flamir Victoria**, por todos os ensinamentos e momentos de reflexão que me projetam na pesquisa e profissão.

A pesquisadora **Dra. Marilu Victoria** por todo apoio e contribuição no desenvolvimento do projeto.

Ao amigo **Júlio** por toda colaboração, paciência e por compartilhar seus conhecimentos.

Aos pesquisadores **Andrea Tarragô, Allyson Guimarães e João Paulo** por todos os ensinamentos, paciência e atenção, os quais foram essenciais nesta etapa de formação.

Às alunas de iniciação científica **Ericka Pires** e **Lorene Araújo** por contribuírem nos experimentos e compartilharem comigo momentos de ensino e aprendizagem.

Aos amigos da Naep- Hemoam, **Nadja, Nilberto, Walter, Andrielle, Péricles, Iaci, Elisa** por todos os momentos de solidariedade e descontração.

A **Dra. Aya Sadahiro** e **Dr. Mauricio Oguska** por sempre mostrarem solidariedade e dispor espaço em seu laboratório para alguns experimentos.

A todos os indivíduos envolvidos nesta pesquisa, ***pacientes*** da ***Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado*** e a todos ***os candidatos a doadores de sangue*** da ***Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas*** por entenderem e aceitarem participar deste projeto.

A ***Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas*** pelo espaço oferecido no laboratório e núcleo de ensino.

A ***Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado*** por ceder as amostras biológicas e parceria junto a Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

A ***Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (Fapeam)*** e ***conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)*** pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro.

Ao ***Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)*** pela oportunidade de capacitação e qualificação profissional.

A ***Universidade Federal do Amazonas*** pela oportunidade oferecida através do Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

Introdução: A infecção pelo *vírus da hepatite C* (VHC) é a principal causa de doença hepática em todo mundo. Aproximadamente 170 milhões de pessoas estão infectadas com o vírus. A resposta imune contra o VHC conduz a secreção de citocinas e ativação e proliferação de células T efetoras para atuarem nos hepatócitos infectados e assim iniciam o processo inflamatório no fígado. **Objetivo:** o estudo teve como objetivo caracterizar a resposta imune e estimar a frequência do polimorfismo do TNF- α -308 G/A em pacientes com hepatite C crônica atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. **Material e Métodos:** Foram utilizadas amostras de 30 de pacientes com hepatite C e 28 amostras de indivíduos não infectados com o VHC. As análises dos linfócitos T e moléculas de adesão foram realizadas por citometria de fluxo. As citocinas séricas foram analisadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA. A caracterização do polimorfismo de TNF- α - 308 foi obtida por PCR-RFLP. A fibrose foi determinada após análise histológica de biópsia hepática de acordo com o escore METAVIR. **Resultados:** Os pacientes com hepatite C apresentaram porcentagem de linfócitos T regulatórios (T regs) e citocinas aumentadas quando comparados ao grupo controle. Na fibrose $\geq$ F3 (N=10) foi caracterizada relevante frequência (100%) de indivíduos com alta produção de IL-2 e baixa frequência (50%) de indivíduos com alta produção de IL-10 e na fibrose $\leq$ F2 foi caracterizada relevante frequência (85%) de indivíduos com alta produção de IL-4 e frequência (55%) de indivíduos com alta produção de IL-10. **Conclusão:** Os linfócitos T efetores são regulados pelos linfócitos T regs. Na fibrose $\geq$ F3 foi caracterizado um perfil de citocinas Th1 enquanto na fibrose $\leq$ F2 um perfil de citocinas Th2. A baixa produção de IL-10 foi associada com uma atividade fibrogênica aumentada em pacientes com hepatite C.

Palavras- chave: Resposta imune, polimorfismo genético, Hepatite C

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C virus (HCV) infection is the major cause of liver disease worldwide. Approximately 170 million more people are infected with the virus. The immune response against HCV leads to secretion of cytokines and activation and proliferation of effector T cells to act in infected hepatocytes and thus initiate the inflammatory process in the liver. **Objective:** This study aimed to characterize the immune response and to estimate the frequency of polymorphism of TNF- α -308 G / A in patients with chronic hepatitis C treated at the Tropical Medicine Foundation Dr. Heitor Vieira Dourado. **Material and Methods:** In this study we used samples from 30 patients with hepatitis C virus infection and 28 samples from individuals not infected with HCV. The analysis of T lymphocyte and adhesion molecules were performed by flow cytometry. The cytokine levels were assessed by flow cytometry using the CBA kit. The characterization of TNF- α -308 polymorphism was obtained by PCR-RFLP. The fibrosis was determined after histological analysis of liver biopsy according to the METAVIR score. **Results:** Our data revealed that percentage of regulatory T lymphocytes (T regs) and cytokines are increased in patients with hepatitis C when compared to the control group. Patients with fibrosis $\geq$ F3 (N = 10) was characterized relevant frequency (100%) of individuals with high production of IL-2 and low frequency (50%) of individuals with high production of IL-10 and patients with fibrosis $\leq$ F2 was characterized relevant frequency (85%) of individuals with high production of IL-4 and frequency (55%) of individuals with high production of IL-10. **Conclusion:** The effector T cells are regulated by T lymphocytes regs. In the fibrosis $\geq$ F3 was characterized Th1 cytokine profile while in fibrosis $\leq$ F2 was characterized TH2 cytokine profile. The low IL-10 production was associated an increased fibrogenic activity in patients with hepatitis C.

Keywords: Immune response, Genetic polymorphism, Hepatitis C Virus

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Prevalência estimada da infecção pelo vírus da hepatite C	18
Figura 02: RNA genômico e proteínas estruturais do vírus da hepatite c.....	20
Figura 03: Genoma do vírus da hepatite C	21
Figura 04: O ciclo do vírus da hepatite C	23
Figura 05: Mecanismos das células imunes no reconhecimento e apresentação de antígenos do VHC para a estimulação e proliferação dos CTLs.	26
Figura 06: Expressão das moléculas de adesão na rolagem dos leucócitos	27
Figura 07: Localização do polimorfismo genético do TNF- α – 308	29
Figura 08: Fluxograma das análises realizadas nas amostras dos pacientes com hepatite C.....	33
Figura 09: Porcentagem e razão de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no sangue periférico de pacientes com hepatite C e grupo controle	42
Figura 10: Porcentagem de Linfócitos T regulatórios no sangue periférico de pacientes com hepatite C e grupo controle	43
Figura 11: Porcentagem de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no sangue periférico e tecido hepático de pacientes com hepatite C	43
Figura 12: Expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac- 1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ de pacientes com hepatite C e grupo controle.....	44
Figura 13: Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2 , IL-6, TNF- α e IFN- γ entre grupo controle e pacientes com hepatite C	45
Figura 14: Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL- 4, IL- 17 e IL-10 entre grupo controle e pacientes com hepatite C	46
Figura 15: Média de intensidade de fluorescência de citocinas IL-2 , IL-6, TNF- α e IFN- γ em sobrenadante de cultura de PBMC, entre grupo controle e pacientes com Hepatite C	47
Figura 16: Média de intensidade de fluorescência de citocinas IL-4, IL-17 , IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC entre grupo controle e pacientes com hepatite C	48
Figura 17: Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas do grupo controle e as dos pacientes com hepatite C de acordo com o grau de progressão da fibrose $\leq$ F2 e $\geq$ F3	49

Figura 18: Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas do grupo controle e as dos pacientes com hepatite C de acordo com o grau de progressão da fibrose $\leq F2$ e $\geq F3$	50
Figura 19: Digrama de frequência de indivíduos com alta produção de citocinas nos grupos controle, $\leq F2$ e $\geq F3$.....	51
Figura 20: Assinatura de citocinas sobrepostas entre o grupo controle e grupos de pacientes com hepatite c de acordo com o grau de progressão da fibrose ($\leq F2$ e $\geq F3$)	52
Figura 21: Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas entre os genótipos G/G e G/A do polimorfismos de TNF- α- 308 G/A.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Descrição dos <i>primers</i> , temperaturas de pareamento (Tp) para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).....	37
Tabela 02: Dados demográficos, características clínicas e epidemiológicas de pacientes com hepatite C e grupo controle	41
Tabela 03: Frequência do polimorfismo de TNF- α -308 G/A entre grupo controle e pacientes com Hepatite C	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CD81 – Cluster difentiation 81

cDNA - Ácido desoxiribonucleico complementar

CLDN – Claudina

CTL- Citolítico

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FHEMOAM- Fundação de hematologia e hemoterapia do Amazonas

FMTAM- Fundação de medicina tropical do Amazonas

Foxp3 – Forkhead Box P3

HLA - Antígeno Leucocitário Humano

HVR - Região hipervariável

ICAM - Molécula de adesão intracelular

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IRES- Sítio de entrada do ribossomo interno

IRF- 3 – Fator regulador de interferon- 3

ISG- Genes estimuladores de Interferon

JAK – Janus Kinase

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

LFA- 1 – antígeno associado à função do linfócito- 1

MAC- 1 - Antígeno do macrófago-1

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MIF- Média de intensidade de fluorescência

mL- mililitro

NK- Natural killer

NKT- Natural killer T

NS - Região não- estrutural

OMS- Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PKR – Proteína Kinase R

PPT - Plasma Preparation Tube

Primer - oligonucleotídeo iniciador

RE - Retículo Endoplasmático

RIG – I Gene indutível pelo ácido retinóico I

RNA - Ácido ribonucleico

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

NTR- região não traduzida

RFLP- Restrição de fragmentos polimórficos

RT - Transcriptase reversa

SOCS - supressores da sinalização da citocina

SR-BI - Receptor scavenger B tipo I

STAT - Transdutores de sinais e ativadores da transcrição

TGF- β - Fator de crescimento transformador – beta

Th - Células T helper

TNF- α - Fator de necrose tumoral- alfa

U.V – Ultra violeta

VHC - Vírus da Hepatite C

VLA- 4 Antígeno muito tardio 4

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Hepatite C.....	18
2.2 Estrutura do vírus da hepatite C	19
2.3 O ciclo do vírus da hepatite C	22
2.4 Imunopatogênese da infecção pelo vírus da hepatite C	24
2.5 Polimorfismo de TNF- α - 308.....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo Geral	31
3.2 Objetivos Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Modelo de Estudo	32
4.2 Área de Estudo.....	32
4.2 Amostragem, critérios de inclusão e exclusão.....	32
4.3 Aspectos éticos	32
4.4 Coleta, processamento e armazenamento de material biológico para pesquisa	33
4.5 Isolamento de células mononucleares do sangue periférico e cultura celular	34
4.6 Obtenção do sobrenadante do macerado de tecido hepático	34
4.7 Dosagem de citocinas no soro e sobrenadante de cultura celular	35
4.8 Imunofenotipagem celular do sangue periférico por citometria de fluxo.....	35
4.9 Imunofenotipagem celular do tecido hepático por citometria de fluxo	36
4.10 Polimorfismo de TNF- α - 308.....	37
4.10.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	37
4.10.2 Reação de restrição	38
4.11 Análise histológica para identificar a fibrose hepática.....	38
8.12 Análises estatísticas.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Dados demográficos e características clínicas e epidemiológicas.....	40
5.2 Perfil dos Linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e T regulatórios	41
5.3 Expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e VLA-4 em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	43
5.4 Análise das citocinas séricas Th1, Th2 e Th17.....	45

5.4.1 Média de intensidade de fluorescência de citocinas pró-inflamatória e de perfil Th1 entre grupo controle e pacientes com Hepatite C.....	45
5.4.2 Média de Intensidade de Florescência de citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e regulatória entre grupo controle e pacientes com Hepatite C	46
5.5 Análise de citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	46
5.5.1 Média de intensidade de fluorescência de citocinas pró-inflamatória e de perfil Th1 entre grupo controle e pacientes com hepatite C	47
5.5.2 Média de intensidade de fluorescência de citocinas do perfil Th2, Th17 e regulatória entre grupo controle e pacientes com hepatite C	47
5.6 Associação das citocinas séricas Th1, Th2, Th17 e regulatória e o grau de progressão da fibrose em paciente com hepatite C	48
5.6.1 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência das citocinas sérica pro-inflamatórias e de perfil Th1	49
5.6.2 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência da citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e regulatória	50
5.7 Média de intensidade de fluorescência das citocins séricas do perfil Th1, Th2 e Th17 e assinatura de citocinas no grau de progressão da fibrose em pacientes com hepatite c	51
5.8 Frequência do polimorfismo de TNF- α- 308 e associação com citocinas séricas em pacientes com hepatite C.....	53
5.8.1 Frequência do polimorfismo de TNF- α - 308 G/A	53
5.8.2 Média de intensidade de fluorescência de citocinas Th1, Th2 e Th17 entre os genótipos do polimorfismo de TNF- α - 308	53
6. DISCUSSÃO	55
6.1 Análise dos linfócitos T em pacientes com hepatite C	55
6.2 Análise da expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4 ⁺ e TCD8 ⁺ em pacientes com hepatite C.....	58
6.3 Análise de citocinas séricas pró- inflamatórias Th1 e anti-inflamatória, Th2 e Th17 e o grau de progressão da fibrose em pacientes com hepatite C	60
6.4 Análise da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes com Hepatite C	63
6.5 Análise da frequência do polimorfismo de TNF- α – 308 G/A em pacientes com hepatite C.....	64
CONCLUSÃO.....	67

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE	83
Apêndice 01: Termo de aprovação do comitê de ética	83
Apêndice 02: TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido do paciente.....	84
Apêndice 03: Termo de realização da biópsia hepática	87
Apêndice 04: TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido do candidato a doador de sangue.....	91
ANEXOS	92
Anexo 01: Artigo de Revisão	92
Anexo 02: Artigo Original.....	107

Introdução e Revisão Bibliográfica

INTRODUÇÃO

A hepatite C é um problema de saúde pública que afeta mais de 170 milhões de pessoas no mundo. Aproximadamente 80% dos casos evoluem para hepatite c crônica e as principais complicações decorrentes da evolução da doença são a cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular, os quais elevam as chances de óbitos de etiologia relacionadas ao *vírus da hepatite C* (WHO, 2011).

A resposta imune desempenha um papel importante na infecção pelo VHC, pois tem um potencial de contribuir não somente com a eliminação viral e em alguns casos imunidade protetora, mas também ocasionar lesão hepática. O VHC interfere em vários aspectos das respostas efetivas de células T e B, reduzindo assim a probabilidade de sua eliminação e também como o grau de lesão no fígado, mediadas pelas células imunes, permitindo assim sua coexistência com as células infectadas (REHERMANN, 2009).

Estudos que envolvem pesquisa do perfil da resposta imunológica e perfil genotípico nos indivíduos infectados pelo VHC são alvos de intensa investigação, pois é necessário conhecer o comportamento da resposta imune ao vírus e os principais mecanismos que determinam a imunopatogênese, progressão e as principais complicações relacionadas à hepatite C.

Deste modo, os resultados obtidos nesta pesquisa ajudam a descrever os mecanismos imunológicos e características dos indivíduos com hepatite c crônica, como o perfil de resposta de linfócitos T, citocinas e polimorfismos genéticos que podem interferir diretamente na lesão hepática e conseqüentemente na evolução da fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. Conhecer os fenômenos evolutivos desta doença poderia direcionar as condutas no tratamento e prognósticos dos pacientes infectados e assim melhorar qualidade de vida destes indivíduos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Hepatite C

A infecção pelo *vírus da hepatite C* afeta 130-170 milhões de pessoas em todo mundo (**Figura 01**) e representa um importante problema de saúde global (SHEPARD et al., 2005; ALTER, 2007; LAVANCHY, 2011; HAJARIZADEH et al., 2013). Em média 12% a 25% dos pacientes infectados alcançam a eliminação viral espontânea, no entanto, a maioria desenvolve a forma crônica da doença (GERLACH et al., 2003) com evolução principalmente para fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (SEMMO & KLENERMAN, 2007). Por ano, mais de 350.000 mortes relacionadas à hepatite C são registradas (WHO, 2011).

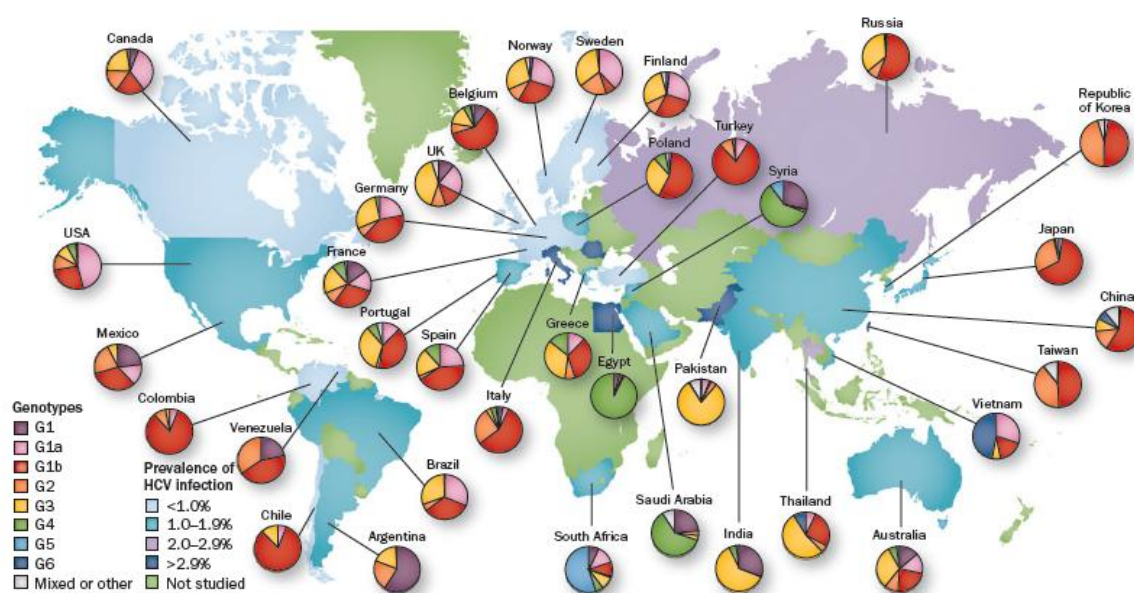


Figura 01: Prevalência estimada da infecção pelo *vírus da hepatite C*.

Fonte: Hajarizadeh ET AL., 2013.

As principais vias de transmissão do VHC acontecem por exposição percutânea direta com sangue contaminado, transfusão sanguínea ou transplante de doadores infectados e usuários de drogas injetáveis (ALTER, 2007).

A terapia antiviral para infecção pelo VHC consiste na combinação do interferon peguilado (IFN- PEG) associado à ribavirina- RBV (MANNS et al., 2001; FRIED et al., 2002) e objetiva alcançar a resposta virológica sustentada (RVS), definida como níveis de RNA do VHC indetectáveis no soro em 6 meses após término do tratamento (JANG & CHUNG, 2011). No entanto somente 50% dos pacientes infectados com o genótipo VHC 1 alcançam a RVS comparado com 80% dessas taxas em pacientes infectados com o genótipo 2 ou 3 (NIH, 2002).

Atualmente os inibidores da protease viral NS3/4A, boceprevir e telaprevir estão aprovados para o tratamento de pacientes infectados com o VHC genótipo 1 (POORDAD et al., 2011; JACOBSON et al., 2011) e que usados em combinação com o IFN- PEG e RBV em pacientes virgens de tratamento aumentam as taxas de RVS em 70–80%. O boceprevir e telaprevir são eficientes também em pacientes com falhas em alcançar a RVS com o tratamento prévio com IFN- PEG e RBV (BACON et al., 2011; ZEUZEM et al., 2011).

No Brasil, entre 1999 a 2010 foram confirmados 69.952 casos de hepatite C. Os maiores índices provêm da região sudeste com 47.830 casos confirmados, sendo 41.033 casos provenientes do estado de São Paulo e da região sul com 15.095 sendo 9.143 casos oriundos do Rio Grande do Sul. As duas regiões representam 90% dos casos confirmados do país. Ao considerar somente as causas básicas de óbitos por hepatites virais, o maior número de casos foi decorrente do *vírus da hepatite C* com 14.873 eventos de 2000 a 2010. Destes, 58,3% (8.672) ocorreram na região Sudeste e 23,4% (3.482) na região Sul (BRASIL, 2011).

No estado do Amazonas, entre o ano de 2005 a 2007 foi constatado um índice de descarte sorológico para o marcador para Hepatite C de 0,32% em 82.851 doadores de sangue. Entre doadores VHC- RNA positivo foi observada a frequência de 87,1% do genótipo 1 e 12,9% do genótipo 3. Sendo que o genótipo 1 foi encontrado na capital, Manaus, e no interior do estado, enquanto o genótipo 3 foi observado somente na capital (TORRES, 2009).

Outros estudos, realizados com 69 pacientes VHC+ confirmaram a prevalência do genótipo 1 (54,2%), 2 (20,8%) e 3 (25%) nas mulheres e 1 (76,1%), 2 (4,3%) e 3 (19,6%) nos homens. Foi observada maior prevalência do genótipo 1, seguido do 3 e 2. Os genótipos 2 e 3 foram encontrados somente na capital, o que reforça a hipótese de que a cidade de Manaus é a porta de entrada para diferentes genótipos do VHC e posterior distribuição para o interior do estado (ARAÚJO et al., 2011).

2. 2. Estrutura do Vírus da Hepatite C

O *vírus da hepatite C* pertencente à família *Flaviviridae* e o gênero *Hepacivirus*. O VHC é constituído por um envelope lipídico e uma fita de RNA com polaridade positiva (**Figura 02**) que codifica uma única poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos (**Figura 03**). A poliproteína é clivada por proteases virais e do hospedeiro em 10 diferentes proteínas: as estruturais Core, E1 e E2, o canal iônico p7 e as não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (LINDENBACH et al, 2007).

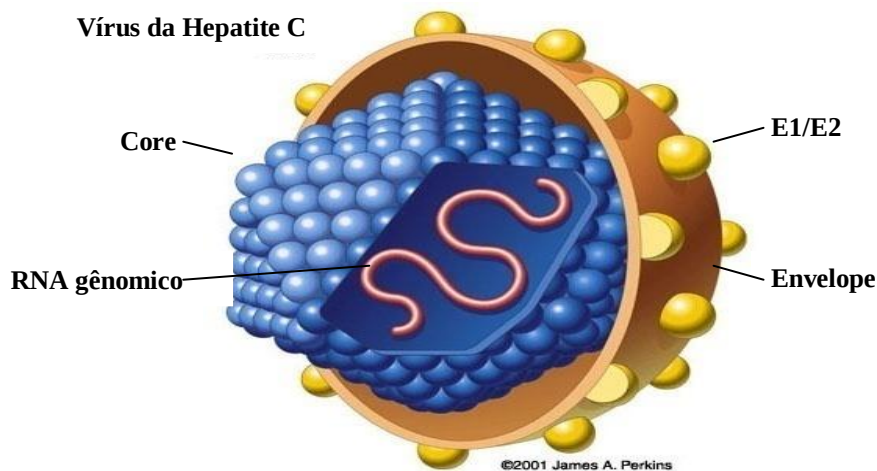


Figura 02. RNA genômico e proteínas estruturais do *vírus da hepatite C*
Fonte: James, 2001

A proteína estrutural do capsídio viral também chamada de Core do VHC é altamente conservada. Esta proteína exerce múltiplas funções biológicas nas células do hospedeiro como regulação na transcrição gênica (KATO et al., 2000), apoptose (ZHU et al., 1998) e alterações nas sinalizações dos interferons (MILLER et al., 2004). Os efeitos biológicos da proteína do núcleocapsídeo são considerados importantes no avanço da sobrevivência do vírus nas células (JANG & CHUNG, 2011).

As proteínas estruturais E1 e E2 são glicoproteínas da superfície viral e desempenham um importante papel na entrada do vírus nos hepatócitos. A E1 serve como unidade subgenômica e a E2 como subunidade ligante do envelope do vírus (DRUMMER et al., 2003; GOFFARD et al., 2005). Além disso, a E2 contém regiões hiper-variáveis, as quais sofrem seleção constante por mutação (BOULESTIN et al., 2002), dificultando a geração de anticorpos efetivos para a neutralização viral. Também tem sido relatado que a E2 pode interagir com a proteína celular PKR, a qual sinaliza as vias antivirais de indução do IFN (TAYLOR et al., 1999).

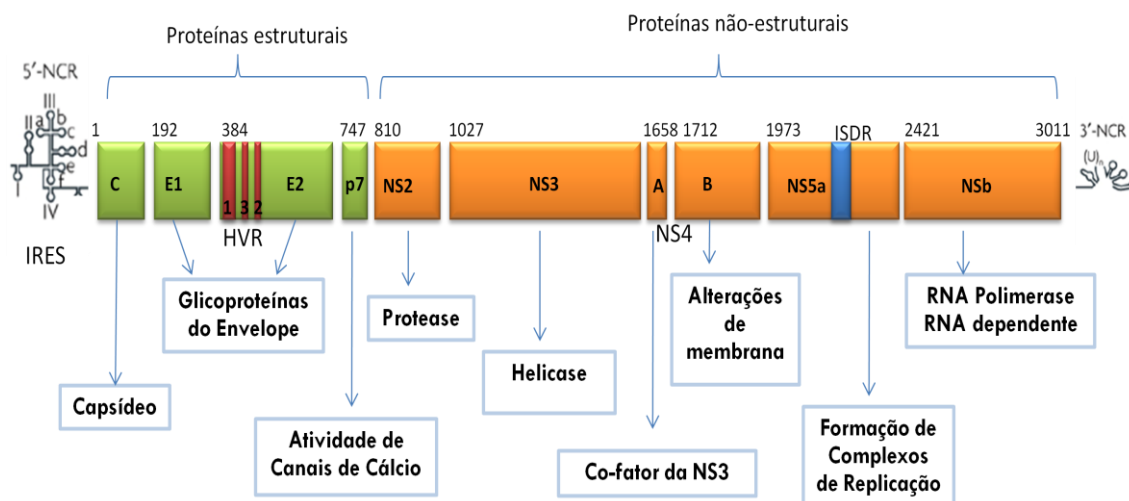


Figura 03. Genoma do vírus da hepatite C.

Fonte: Adaptado de TAN et al., 2002 e MORADPOUR et al., 2007.

A proteína p7 é um canal iônico necessário para a reunião e liberação de partículas virais. A NS2 é a autoprotease do VHC e desempenha funções na reunião viral, mediando a clivagem entre NS2 e NS3. A NS3 codifica a protease serina do VHC e cliva a poliproteína viral em 4 sítios, localizado entre NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B. A NS4 forma um complexo estável com NS3 e é um co-fator para a serina protease NS3. A NS4B é conhecida por induzir a formação de um complexo de membranas, relacionada a replicação viral. A NS5A é uma metaloproteínase que liga o RNA viral e vários fatores do hospedeiro. A NS5B é a polimerase RNA dependente que também tem sido considerado com um marcador para o desenvolvimento de terapias antivirais. Estas proteínas contribuem em vários aspectos do ciclo de vida do VHC, incluindo ligação, entrada, fusão, tradução do RNA e replicação (CHANG & CHANG, 2013).

O VHC tem 6 genótipos bem descritos e muitos subtipos, que incluem 1a, 1b, 1c etc. Os genótipos 1, 2 e 3 são mundialmente distribuídos. Os subtipos 1a e 1b são responsáveis por aproximadamente 60% das infecções em todo mundo. O genótipo 2 é mais encontrado na Europa e América do Norte, enquanto o genótipo 3 é encontrado principalmente na Ásia, os genótipos 4 e 5 encontrados no Oriente Médio e África e os genótipos 6 no sudeste da Ásia (MONDELLI et al., 1999; NGUYEN & KEEFFE, 2005; FISHMAN & BRANCH, 2009).

2.3. O ciclo do vírus da hepatite C

O ciclo do VHC no indivíduo inicia com muitos fatores de entrada do vírus e da célula alvo. O primeiro fator de entrada identificado na célula alvo foi o receptor *scavenger* classe B tipo I (SRBI), considerado como padrão de ligação à proteína viral E2, através da região hipervariável- I (SCARSELLI et al., 2002). O SBRI é o principal receptor para a lipoproteína de alta densidade- HDL (ACTON et al., 1996), que é altamente expressa no fígado e promove a captura seletiva do colesterol HDL para dentro dos hepatócitos (MEREDITH et al., 2012).

Outro fator de entrada é a tetrasparina CD81 humana que está envolvida em muitas funções incluindo adesão, morfologia, proliferação e diferenciação celular. A CD81 constitui 4 domínios transmembrânicos, que são dois domínios curtos intracelulares e dois longos extracelulares (MEREDITH et al., 2012). O SBRI e CD81 estão envolvidos nas fases iniciais de entrada do VHC promovendo uma troca conformacional nas glicoproteínas do envelope E1/E2 para facilitar a fusão e endocitose viral (SHARMA et al., 2011).

As proteínas claudin- 1 (CLDN1) e ocludina (OCLN) também são essenciais na entrada nas células alvo (EVANS et al., 2007; PLOSS et al., 2009) apesar de não interagirem diretamente com o vírus. No entanto, a CLDN1 pode interagir com a CD81 como parte do complexo receptor para o VHC (HARRIS et al., 2010).

Após o processo de entrada do VHC na célula alvo através dos receptores que medeiam a endocitose, inicia o ciclo de replicação do vírus (**Figura 04**). As partículas virais encontram-se num compartimento endossomal, que posteriormente passa por um processo de fusão para liberar o RNA genômico no citoplasma (ALVISI et al., 2011; TSCHERNE et al., 2006; BLANCHARD et al., 2006) e assim iniciar a tradução de proteínas e replicação viral. A tradução do RNA viral é iniciada pela ligação do iniciador 5'-IRES (sítio de entrada do ribossomo interno) ao ribossomo no retículo endoplasmático e produz a poliproteína viral (EL-HAGE & LUO, 2003).

O processamento da poliproteína está associado ao complexo de membranas (EGGER et al., 2002; GOSERT et al., 2003), local onde se acredita que ocorra a replicação do RNA viral com a fita de RNA positiva como molde para gerar a fita de RNA negativa intermediária para produzir mais fitas genômicas positivas, que podem ser traduzidas para produzir novas proteínas virais; atuando como molde para a replicação do RNA ou formando virions infecciosos para iniciar um novo ciclo (YANG et al., 2008; FOSTER et al., 2011).

Para continuar seu processo de replicação, o VHC interfere em várias vias de sinalização das respostas imunes antivirais. Uma das proteínas que participa desse processo é a NS3/4, que bloqueia a ativação do gene de indução pelo ácido retinóico I (RIG- 1) e a

tradução do fator regulador de IFN- γ (IRF- γ). A proteína core interfere na via Janus Kinase- tradutores de sinais e ativadores de transcrição (JAK- STAT) pela ativação dos supressores da sinalização de citocinas- γ (SOCS-3). A proteína E2 inibe o receptor de proteína Kinase R (PKR) e as funções das células naturais killer (NK). A NS5A tem propriedades importantes no escape da ação antiviral dos IFNs. Outra forma de escape do VHC do sistema imunológico é através do processo de mutação que suas partículas sofrem e falhas nas respostas das células T específicas (ASHFAQ et al., 2011)

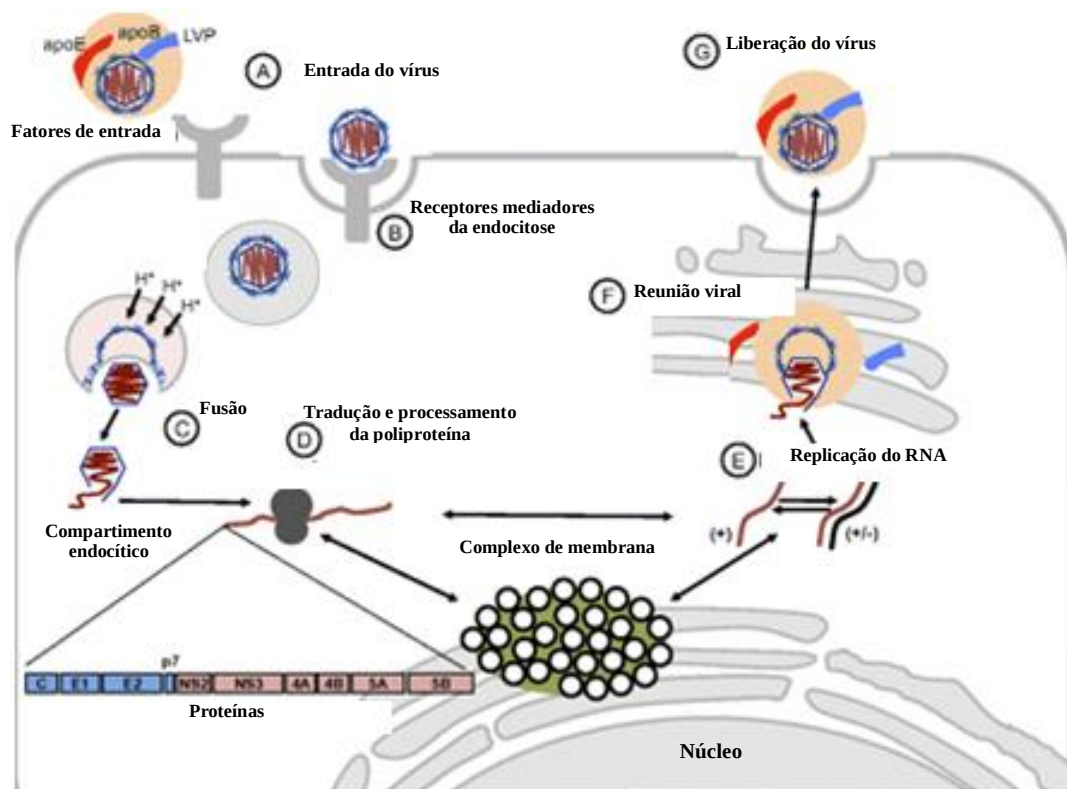


Figura 04: O ciclo do vírus da hepatite C.

Fonte: Adaptado de Ploss et al. 2012.

2. 4. Imunopatogênese da infecção pelo vírus da hepatite C

A infecção viral dispara os mecanismos da resposta imune na tentativa de erradicar o vírus e minimizar os danos causados ao indivíduo infectado. A defesa imunológica antiviral tem como evento inicial a produção de IFNs e subsequente expressão de genes estimuladores de IFN (ISGs) que vão limitar a replicação do patógeno. A resposta imune é essencial, pois, conduz a eliminação viral ou ao estabelecimento da infecção crônica, determinando assim o curso da doença (ZHU et al., 2003).

Durante as infecções, células imunes são estimuladas pela presença do vírus e produzem citocinas para inibir a replicação viral. As citocinas ativam as células residentes no local da infecção e também tem o potencial de recrutar células imunes para este local e ativá-las para desempenharem suas funções efetoras. A ativação e atração de células imunes inatas, incluindo neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, células natural killer (NK) e células NKT constituem a primeira linha de defesa da resposta imunológica (MEDZHITOV, 2007; MEDZHITOV, 2008).

Na resposta imune não específica na infecção pelo VHC, as células dendríticas produzem os IFN-I (α e β) para inibir a replicação do vírus. Os IFN- I aumentam a expressão de antígeno leucocitário humano (HLA) classe I na superfície das células apresentadoras de antígenos, e assim reforçam a resposta imune. As células NK e NKT são ativadas pelo IFN- I e eliminam os hepatócitos infectados pelo VHC, iniciando assim o processo da hepatite. A destruição dos hepatócitos pelas células NK e NKT estimula as células dendríticas mielóides a secretarem o IFN- γ que então ativa os macrófagos hepáticos (Células de Kupffer) e aumentam a inflamação local (HIROISHI et al., 2008).

As células dendríticas mielóides capturam os antígenos do VHC no fígado e seguem para os linfonodos, onde maturam e expressam antígeno leucocitário humano (HLA) classe I, classe II e moléculas co- estimulatórias em sua superfície, estimulando assim as células T helper (Th) “naive” a se diferenciarem em células Th1 através da produção da interleucina 12 (IL-12). As células Th1 ativadas secretam IL-2 e IFN- γ que induzem a ativação e proliferação de células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs) que seguem para o fígado e reconhecem peptídeos do vírus junto ao HLA classe I na superfície do hepatócitos infectados e liberam perforinas, granzimas e TNF- α (**Figura 05**), o que conduz à morte das células infectadas, aumento do processo inflamatório e o desenvolvimento da hepatite C (HIROISHI et al., 2010)

As respostas imunes inata e adaptativa aos patógenos são essenciais para eliminar o VHC, incluindo as citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4⁺, assim também como as

atividades efetoras dos linfócitos T CD8⁺, que eliminam diretamente a célula infectada ou ativa outras células do sistema imune como macrófagos para eliminar os patógenos (SHEVACH, 2002; BELKAID, 2007).

Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos indivíduos com a forma aguda da hepatite C possuem respostas anti-virais quantitativamente maiores do que nos indivíduos com a forma crônica (WEIDEMAYER et al., 2002), porém, as respostas de células T específicas na hepatite crônica, apesar de diminuídas, são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose (POYNARD et al., 2003).

Estudos detectaram que em pacientes com hepatite C crônica, as alterações na estrutura hepática estão relacionadas também as concentrações de citocinas do perfil Th1, enquanto, as citocinas do perfil Th2 podem suprimir as respostas de Th1 e tornar a resposta imune mais branda (GIGI et al., 2008). Como exemplo o IFN- γ , uma citocina pró- inflamatória do perfil Th1 que está relacionada a patologia hepática (WYNN, 2008). A síntese desta citocina é regulada pela IL-10, uma potente citocina anti- inflamatória que também tem um efeito modulatório na fibrose hepática (ZHANG et al., 2006).

A regulação da resposta imune é fundamental para o curso de progressão da doença, pois a excessiva atividade efetora das células pode conduzir a progressão das lesões teciduais no indivíduo (SHEVACH, 2002; BELKAID, 2007).

Os linfócitos T regulatórios CD4⁺CD25⁺Foxp3 (Tregs) regulam a atividade das células T efetoras de forma direta ou indiretamente, inibindo as atividades das células apresentadoras de antígenos, reduzindo a expressão das moléculas de MHC II e expressão de proteínas co-estimulatórias, e assim alterando as habilidades das células T em secretar citocinas (MANIGOLD & RACANELLI, 2007) e desempenhar suas funções efetoras antivirais. No entanto, as T regs podem conduzir ao aumento de citocinas anti- inflamatórias, o que caracteriza suas funções supressoras, alterando a resposta imune e assim contribuem para progressão da doença (STURM et al., 2010).

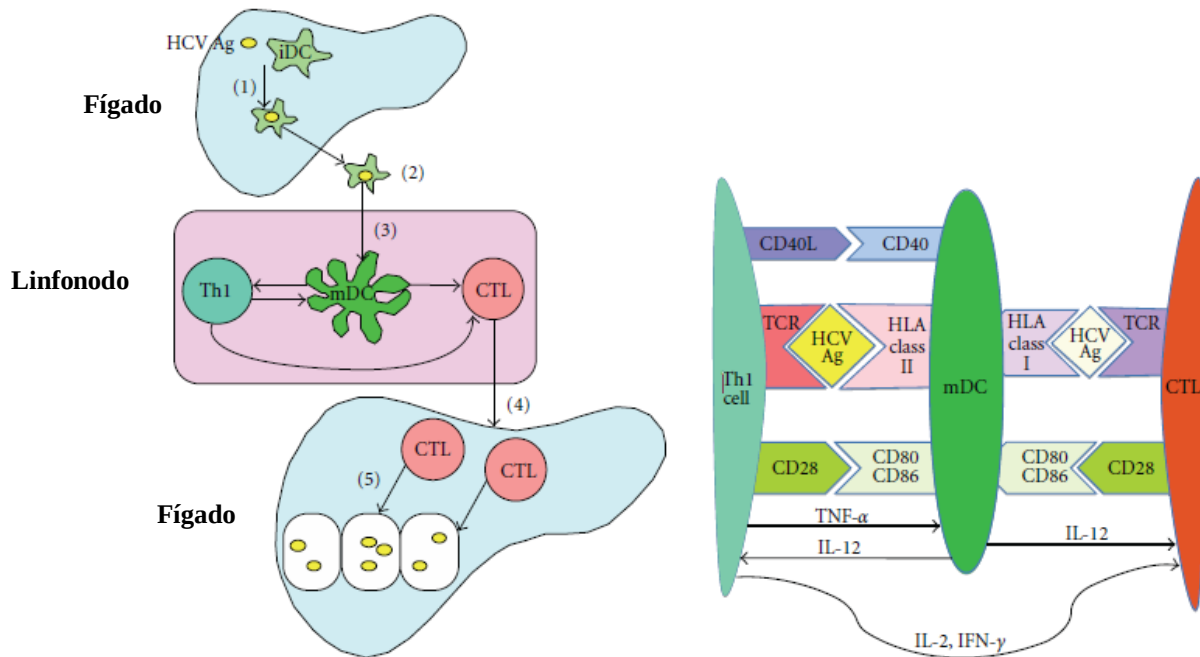


Figura 05: Mecanismos das células imunes no reconhecimento e apresentação de antígenos do VHC para a estimulação e proliferação dos CTLs.

Fonte: HIROISHI et al., 2010

A resposta imune nos processos inflamatórios requer o recrutamento dos leucócitos da circulação sanguínea para o local de infecção. Durante esse processo, moléculas de adesão do endotélio vascular interagem com seus respectivos ligantes na superfície dos leucócitos (**Figura 06**), facilitando seu rolamento pela parede endotelial e posterior transmigração para os espaços extras vasculares (NODA et al., 2011).

As principais moléculas de adesão envolvidas neste processo são as selectinas, expressas pelo endotélio e as integrinas, que são expressas predominantemente por leucócitos. A atividade insuficiente das integrinas contribui para recorrentes episódios infecciosos e um aumento da sua atividade pode desencadear uma resposta inflamatória exagerada e lesão tecidual (HYUN et al., 2009).

As integrinas são receptores transmembrânicos que intercedem a transmissão de sinais de forma bidirecional entre a célula e seu ambiente. A sinalização das integrinas é frequentemente estimulada por quimiocinas e citocinas que regulam a afinidade do receptor em ligar aos seus respectivos ligantes. As principais integrinas envolvidas no processo de migração dos leucócitos para os locais de inflamação são *Very Late Antingens*- VLA-4, *lymphocyte function-associated antigen-1*- LFA-1 e *macrophage antigen-1*- Mac- 1 (YOUNG et al., 2010).

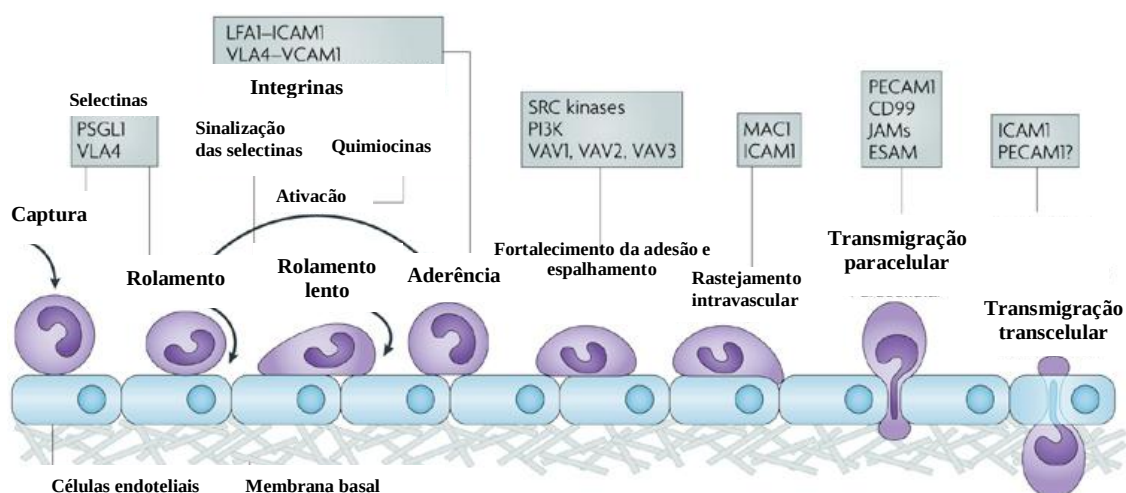


Figura 06: Expressão das moléculas de adesão na rolagem dos leucócitos para os locais de inflamação.

Fonte: LEY et al., 2007

A integrina VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$, CD49d/CD29) é expressa pelos linfócitos, eosinófilos e monócitos (LOBB & HEMLER, 1994; LUO et al., 2007) e desempenha funções na diferenciação e migração (*homing*) de linfócitos para o tecido durante a inflamação (BUTCHER et al., 1999). A VLA-4 também desempenha papéis no desenvolvimento e diferenciação de vários tecidos e tipos celulares (GONZALEZ-AMARO et al., 2005).

A integrina LFA-1 ($\alpha L\beta 2$, CD11a/CD18) é expressa exclusivamente pelos leucócitos e desempenha papel importante no recrutamento destes para os locais de inflamação e tecidos linfóides (SPRINGER, 1994). A LFA-1 está envolvida em várias interações célula – célula como as células T - células apresentadoras de antígenos, células B – células T e NK- células alvo (SHIMAOKA & SPRINGER, 2003).

A importância de LFA-1 é evidenciada em pacientes deficientes em integrina $\beta 2$, que demonstram dificuldades na adesão de leucócitos e em eliminar os patógenos e assim apresentam episódios recorrentes de infecção e morte precoce (SPRINGER, 1994).

A integrina Mac-1 ($\alpha M\beta 2$, CD11b/CD18) é expressa por neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e com extensão limitada por certas populações de linfócito T (MCFARLAND et al., 1992). A Mac-1 tem mais de 30 ligantes que incluem a família das ICAM (DIAMOND et al., 1990; GAHMBERG, 1997).

Na infecção pelo VHC é essencial o recrutamento de leucócitos para promoverem a eliminação viral dos hepatócitos infectados. Porém uma resposta exacerbada pode ocasionar lesão tecidual (GUIDOTTI & CHISARI, 2006).

A resposta imune na infecção pelo VHC traça um perfil celular no sangue e acarreta mudanças na estrutura do fígado na tentativa de eliminação viral. Essas mudanças são fatores recorrentes na fisiopatologia das doenças hepáticas crônicas. No entanto, uma resposta imune deficiente ou exacerbada pode resultar em complicações como fibrose, cirrose, carcinoma hepatocelular e morte (COULON et al., 2010).

O controle apropriado da resposta imune pode contribuir para erradicação do VHC e impedir o estabelecimento da hepatite C crônica, mas muito ainda tem que se conhecer dos mecanismos imunológicos e virais.

2. 5 Polimorfismo de TNF- α – 308

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma potente citocina pro inflamatória que afeta o crescimento, diferenciação, função e sobrevivência de muitas células. Esta citocina é produzida por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, células tumorais entre outros tipos celulares (ANDERSON et al., 2004) e desempenha funções importantes na resposta imune contra a infecção pelo VHC.

O gene codificante do TNF- α está localizado no cromossomo 6p21.3 (HAJEER & HUTCHINSON , 2000) na região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe III entre HLA-B e -DR (**Figura 07**). A expressão desse gene é controlada nos níveis transcricional e postranscricional. Sete polimorfismos bialélicos foram descritos dentro da região promotora do TNF- α , nas posições e pares de bases -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -376G/A, -308G/A, -238G/A e -163G/A (HAJEER & HUTCHINSON , 2000).

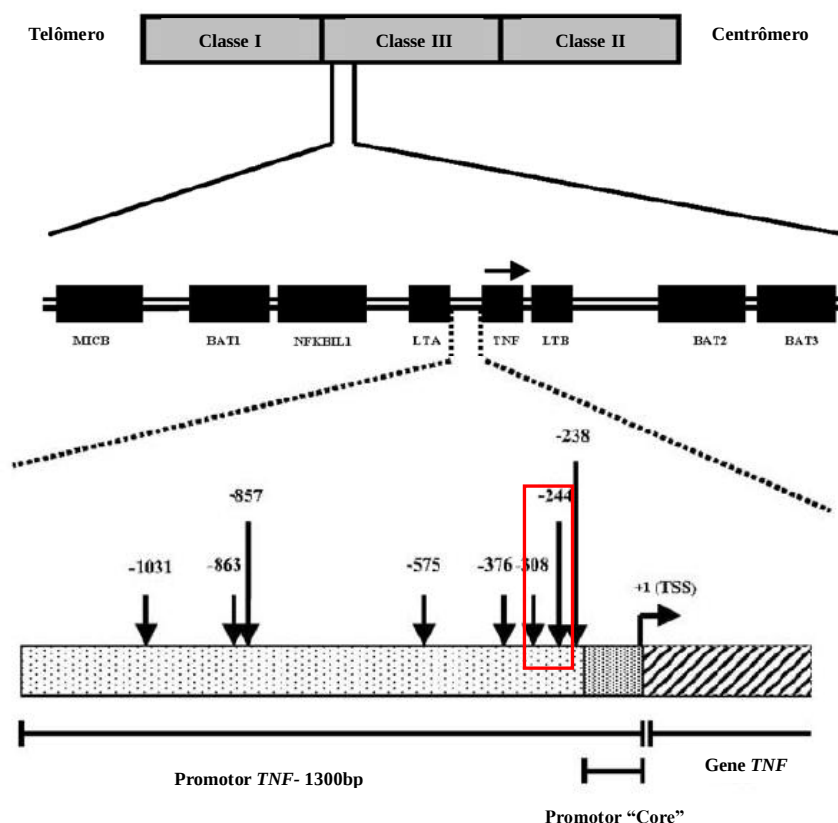


Figura 07: Localização do polimorfismo genético do TNF- α - 308 no cromossomo 6p21.3

Fonte: Bayley et al., 2004

O polimorfismo de TNF- α -308 G/A envolve a substituição da guanina(G) pela adenosina (A) num alelo incomum, os quais estão associados a várias doenças infecciosas e desordens inflamatórias (WILSON et al., 1997)

A sequência polimórfica do TNF- α - 308 G/A (WILSON et al., 1993) na região promotora influencia a expressão gênica da citocina. Três genótipos potenciais (GA, GG e AA) correspondem a dois fenótipos diferentes, alto ou baixo produtor de TNF- α (PERREY et al., 1998). O alelo A do TNF- α - 308 G/A está associado com maior produção da citocina (ABRAHAM et al., 1993) e considerado o fator transcricional mais potente que o alelo G, afetando diretamente a regulação do gene e sua associação com as altas concentrações de TNF- α (TAMBUR et al., 2001).

A frequência dos genótipos TNF- α -308 GA e AA foi significativamente maior em pacientes com cirrose hepática e carcinoma hepatocelular que indivíduos controles, sugerindo que o polimorfismo está diretamente relacionado a estas doenças por estimular a produção do TNF- α (CHUANG et al., 2004).

O TNF- α também é encontrado em altas concentrações na angiogênese hepática, sítios de inflamação (LEIBOVICH et al., 1987), metástase (BALASUBRAMANIAN et al., 2002) e pode acelerar a progressão da fibrose e lesão no fígado, o que agrava a doença hepática associada à infecção pelo VHC e conduz ao desenvolvimento precoce da cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (GITTO et al., 2009).

Portanto, inflamação crônica na hepatite C, combinada com a alta produção de TNF- α pode aumentar a progressão da fibrose, cirrose hepática, desenvolvimento de carcinoma hepatocelular e risco de morte, elevando os índices de mortalidade relacionados a essa doença.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar a resposta imune e estimar a frequência do polimorfismo do TNF- α -308 G/A em pacientes com hepatite C crônica atendidos na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil das respostas Th1, Th2, T regulatórias e as moléculas de adesão VLA-4, LFA-1, Mac-1 no sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica;
- Caracterizar o perfil das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 no soro e sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HCV⁺;
- Relacionar o perfil de citocinas séricas com a fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica;
- Estimar a frequência do polimorfismo de TNF- α -308 G/A em pacientes com hepatite C crônica.

*Material e
Métodos*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo de indivíduos infectados pelo *vírus da hepatite C* atendidos no ambulatório de hepatites virais da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado.

4.2. Área de Estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHEMOAM) em colaboração com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

4.3 Amostragem, critérios de inclusão e exclusão

O número de indivíduos envolvidos no projeto foi de acordo com a demanda espontânea do centro de pesquisa da FMT-HVD no período de setembro de 2011 a fevereiro de 2013. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico sorológico positivo para hepatite C (anti- VHC) pelo método imunoenzimático ELISA e posteriormente confirmados com o teste de detecção do RNA viral (VHC RNA+) através da técnica PCR (Reação em cadeia da polimerase), de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos e sem tratamento prévio para infecção pelo *vírus da hepatite C*. Foram excluídos os pacientes co-infectados com os vírus da hepatite A, B, D, E , vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), os que já haviam iniciado o tratamento para hepatite C e aqueles que apresentaram cirrose descompensada (Child-Pugh B ou C).

O grupo controle para as análises procedentes do sangue periférico foi a partir de candidatos a doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas que não apresentaram resultados positivos nos testes de triagem sorológica, que incluem hepatites virais, HIV, Sífilis, Doença de Chagas e HTLV 1 e 2.

4.3. Aspectos Éticos

Este é um subprojeto do projeto: Avaliação da angiogênese hepatocelular em pacientes infectados pelo *vírus da hepatite C* portadores de Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA), aprovado pelo Comitê de Ética da FMT- HVD – **CAAE: 00330114000-09**

4.4. Coleta, armazenamento e processamento de material biológico para a pesquisa

Nesta pesquisa foram analisadas amostras biológicas de sangue periférico e tecido hepático dos pacientes que atenderam aos requisitos nos critérios de inclusão.

As amostras do sangue periférico foram coletadas através de punção venosa e as de tecido hepático foram coletados através de biópsia hepática transparietal, ambos os procedimentos foram realizados na FMT-HVD e processados no mesmo dia na FHEMOAM. Foram coletados, com sistema a vácuo, 20 mL de sangue venoso de cada paciente, distribuído em cinco tubos de coleta: 1 tubo com gel separador (*Gel BD SST® II Advance®*) para coleta de soro e posterior dosagem de citocinas e 4 tubos com o anticoagulante EDTA (*BD Vacutainer® EDTA K2*) para extração de DNA para a caracterização dos polimorfismos do TNF- α - 308, realização de cultura de células mononucleares do sangue periférico e análise de células por citometria de fluxo. A amostra de biópsia hepática foi separada em 2 seções: 1. Análise histológica para definir o grau de fibrose hepática. 2. Análise de células do tecido por citometria de fluxo.

As análises foram realizadas de acordo com a viabilidade das amostras de sangue periférico e tecido hepático de cada paciente e obedecendo o seguinte fluxo como ilustra a **figura 8**.

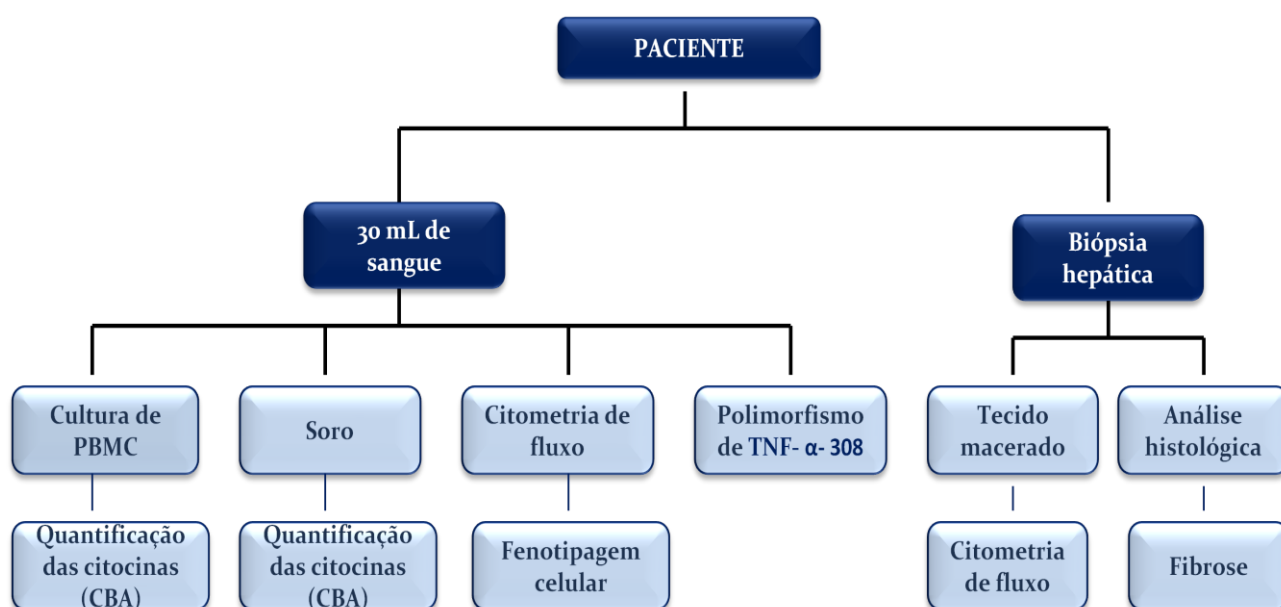


Figura 8. Fluxograma das análises realizadas nas amostras dos pacientes com hepatite C.

4.5. Isolamento das células mononucleares do sangue periférico e cultura celular

O procedimento foi realizado dentro da capela de fluxo laminar nível II, previamente esterilizado por 15 minutos com luz ultravioleta (UV) ligada. O sangue periférico obtido foi adicionado em um tubo falcon de 15 mL contendo o gradiente Ficoll-Hypaque e após submetido a centrifugação a 0,5g por 30 minutos, a 18 °C e sem freio na centrífuga. Após a centrifugação, os componentes sanguíneos foram separados e os leucócitos foram coletados e transferidos para um tubo falcon de 15 mL, o qual foi acrescentado 10 mL do meio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute-1640- *Sigma-Aldrich*) e centrifugado a 0,3g por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 10 mL de RPMI e centrifugado novamente. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuscitado em 4 mL de RPMI e centrifugado novamente. O sobrenadante foi desprezado e posteriormente as células foram ressuscitadas em 2 mL de RPMI completo (RPMI + o antibiótico streptomycina + soro bovino fetal). Foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer utilizando a solução de Turk. Para verificar a viabilidade celular foi utilizado o corante Azul de Tripan. O volume final de 2 mL (1×10^6 /mL) foi distribuído em dois poços na placa de cultura, na qual 1 poço foi preenchido com 1 mL de suspensão celular, 477 μ L de RPMI completo, 15 μ L do estimulante celular forbol 12-meristato 13-acetato (PMA) e 8 μ L de ionóforo de cálcio. O outro poço foi preenchido com 1 mL de suspensão celular e 500 μ L de RPMI completo. A placa foi submetida à incubação por 14 horas em estufa de CO₂ a 37° C. Após a incubação da placa foi coletado o sobrenadante da cultura para dosagem de citocinas por citometria de fluxo, utilizando-se o kit CBA.

4.6. Obtenção do sobrenadante do macerado tecido hepático

Uma seção da amostra de tecido hepático de aproximadamente 4cm foi macerada com 1 mL de RPMI e em seguida transferida para um tubo falcon de 15 mL, ao qual foi acrescentado mais 2 mL de RPMI e deixado em incubação por 30 minutos, sob movimentos de inversão e à temperatura ambiente. Após este período, a amostra foi centrifugada a 0,3g por 7 minutos. O sobrenadante do tecido hepático foi transferido para um microtubo e congelado (-80°C) para estudos posteriores. O pellet restante no tubo foi lavado com 3 mL de PBS-W e centrifugado a 1300 0,3g por 7 minutos- 2 vezes. Após a lavagem o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 1100 μ L de PBS- W e utilizado para citometria de fluxo do tecido hepático.

4.7. Dosagem de citocinas no soro e sobrenadante de cultura celular

A dosagem de diferentes citocinas no soro e sobrenadante de cultura celular foi realizada 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 do fabricante. Foram quantificadas as citocinas IL-2, IL- 4, IL-6, IL- 10, TNF- α , IFN- γ e IL- 17. O citômetro de fluxo FACSCalibur[®] (Becton, Dickinson and company, San Jose, CA, USA). foi utilizado para leitura e aquisição das amostras. A identificação das citocinas foi realizada utilizando o software *FCAP-array*TM (v3.01).

4.8. Imunofenotipagem celular do sangue periférico por citometria de fluxo

Os tubos de citometria de fluxo foram marcados com anticorpos monoclonais com seus marcadores de superfície celular específicos, de acordo com as populações de linfócitos e moléculas de adesão de interesse. Para esta marcação foi adicionado 50 μ L de sangue periférico em cada tubo de citometria (10 tubos), que foram incubadas com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Os anticorpos utilizados foram: **anti-CD8 FITC** (*Isotiocinato de Fluoresceína*, Cat. N^o 555634, lote 15483, clone HIT8a, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD4 PE** (*Ficoeritina*, Cat. N^o 555346, lote 75982, clone RPA- T4 marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD3 percP** (*Clorofilpiridina*, Cat. N^o 347344, lote 41864, clone SK7, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD69 APC** (*Aloficocianina*, Cat. N 555533, lote 68183, clone FN50 marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para a identificação de linfócito T CD4⁺ e TCD8⁺ ; **anti-CD4 FITC** (*Isotiocinato de Fluoresceína*, Cat. N^o 555346, lote 75982, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) e **anti-CD25 APC** (*Aloficocianina*, Cat. N 555434, lote 17468, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para a marcação de linfócitos T regulatórios; **anti- CD49d PE** (*Ficoeritina*, Cat. N 555503, lote 20137, clone 9F10, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para identificação de VLA-4, **anti- CD11a PE** (*Ficoeritina*, Cat. N 301208, lote b119504, clone HI111, marca BioLegend[®], San Diego, CA, USA) para identificação de LFA-1, **anti- CD11b PE** (*Ficoeritina*, Cat. N 555388, lote 12263, clone ICRF44, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para identificação de MAC-1.

Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de solução de lise (*BD FACSTM Lysing Solution*, Cat, N 349202, Lot.:24299, BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA). Em seguida as células foram lavadas com 2mL de PBS-

W (solução fisiológica tamponada com fosfato) e centrifugadas 0,3g por 7 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado por inversão e adicionado 300µL de PBS-W. O marcador intracelular **anti-Foxp3 PE** (*Ficoeritina*, Cat. N 560046, lote 15169, clone 259D/C7, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) foi acrescentado junto ao tubo do marcador de superfície anti- CD25 para se obter a marcação de linfócitos T regulatórios.

A leitura das amostras foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação HEMOAM, no citômetro de fluxo FACScalibur[®] (Becton, Dickinson e Company, San Jose, CA, USA). A identificação das populações celulares de interesse tanto do tecido hepático quanto do sangue periférico foi realizada com o programa *FlowJo* (v9.4). Primeiramente identificou-se a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos, utilizando gráficos “dot plot” onde a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes na obtenção do seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Posteriormente da seleção da região de interesse foi analisada a intensidade de fluorescência apresentada pelas células marcadas nessa região. Após a definição das regiões, o percentual de células positivas foi determinado utilizando-se um histograma simples de análise da região.

4.9. Imunofenotipagem celular do tecido hepático por citometria de fluxo

O pellet restante no tubo falcon da obtenção do sobrenadante de tecido hepático foi lavado com 3 mL de PBS- W com agitação magnética. Em seguida foi centrifugado a 0,3g por 7 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida o pellet restante foi ressuspensionado em 400 µL de PBS-W para posterior marcação nos tubos de citometria de fluxo.

Os 4 tubos de citometria de fluxo foram marcados com anticorpos monoclonais com seus marcadores de superfície celular específicos, de acordo com as populações de linfócitos de interesse. Em cada tubo foi adicionado 100 µL da suspensão do tecido hepático, que foi incubada com anticorpos monoclonais por 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os anticorpos utilizados foram: **anti-CD8 FITC** (*Isotiocinato de Fluoresceína*, Cat. N° 555634, lote 15483, clone HIT8a, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD4 PE** (*Ficoeritina*, Cat. N° 555346, lote 75982, clone RPA- T4 marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD3 perCP** (*Clorofilpiridina*, Cat. N° 347344, lote 41864, clone SK7, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA), **anti-CD69 APC** (*Aloficocianina*, Cat. N 555533, lote 68183, clone FN50 marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para a identificação de linfócito T CD4⁺ e TCD8⁺ ; **anti-CD4 FITC** (*Isotiocinato de Fluoresceína*, Cat. N° 555346, lote 75982, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) e **anti-CD25**

APC (Alofocianina, Cat. N 555434, lote 17468, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) para a marcação de linfócitos T regulatórios.

Após a marcação dos glóbulos brancos, as hemácias presentes foram lisadas com 2 mL de solução de lise. Em seguida as células foram lavadas com 2 mL de PBS- W e centrifugadas 0,3g por 7 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado por inversão e adicionado 300µL de PBS-W. O marcador intracelular **anti-Foxp3 PE** (Ficoeritina, Cat. N 560046, lote 15169, clone 259D/C7, marca BD[®] Biosciences, San Diego, CA, USA) foi acrescentado junto ao tubo do marcador de superfície anti- CD25 para se obter a marcação de linfócitos T regulatórios.

A leitura das amostras foi realizada no laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação HEMOAM, no citômetro de fluxo FACScalibur[®] (Becton, Dickinson e Company, San Jose, CA, USA), como descrito no item 4.8.

4.10. Polimorfismo de TNF- α – 308

Para caracterizar os polimorfismos de TNF- α - 308 foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) associada à análise de polimorfismos por fragmentos de restrição (RFLP), como descrito abaixo.

4.10.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a genotipagem foi preparado um mix para PCR contendo 14,55 µL de H₂O (água) MiliQ; 2,5 µL de tampão de reação 10x; 0,75 µL de MgCl₂; 2,5 µL de dNTPs; 0,25 µL de *primer* TNF147F; 0,25 µL de *primer* TNF147R; 0,2 µL de Taq polimerase. Foi utilizado 21 µL da Mix de PCR para 4,0 µL de DNA extraído de cada amostra. Para a amplificação foi utilizado o termociclador *Applied Biosystems (Veriti 96 Well Thermal Cycler, Carlsbad, USA)*

Tabela 01: Descrição dos *primers*, temperaturas de pareamento (Tp) utilizadas para a amplificação por PCR e tamanhos dos fragmentos que foram obtidos após a PCR e reação de restrição (RFLP).

TNF ¹	LSR ² e ER ³	Primers	Seqüências 5' → 3'	Tp ⁴ (°C)	PCR	RFLP
TNF- α	G 308 A – <i>NcoI</i>	TNF147	GAGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	60°C	147pb	147pb
		TNF147	GGGACACACAAGCATCAAG			126pb
						21pb

1. Fator de Necrose Tumoral; 2. Localização do Sítio de Restrição; 3. Enzima de Restrição; 4. Temperatura de Pareamento.

4.10.2. Reação de restrição

Após a amplificação do DNA, o produto da PCR foi digerido com a Enzima *NcoI* (*Biolabs, New England, Ipswich, MA, USA*), de acordo com o seguinte mix de reação de clivagem: produto da PCR (10,0 μ L); tampão específico para a enzima (2,0 μ L); H₂O ultrapura (7,0 μ L) e enzima de restrição específica (1,0 μ L), totalizando volume final de 20,0 μ L. As amostras foram incubadas a 37°C *overnight*.

Os produtos da PCR e reação de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1x (*Tris- borato- EDTA*) e visualizados por fluorescência UV no transluminador de luz azul da Invitrogen Corporation (*Safer ImagerTM S3702, Carlsbad, CA, USA*) após a coloração com SYBR[®] safe DNA Gel Stain (*InvitrogenTM Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA*). O marcador de peso molecular de 50pb foi utilizado como referência para o tamanho dos fragmentos de DNA obtidos.

4.11. Análise histológica para identificar a fibrose hepática

Após a biópsia do fígado, foi realizada a análise histológica no centro de patologia da FMT-HVD. O tecido hepático foi fixado em formaldeído tamponado a 3,7% e após desidratado com alcoóis e clareficado com xilol. Em seguida foi incluída em um bloco de parafina para os cortes de 4-5 μ m, os quais foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina, reticulina, tricromina e PERLS. As lâminas histológicas foram examinadas ao microscópio e suas imagens capturadas digitalmente para obtenção dos resultados de acordo com o escore METAVIR (Bedossa & Poynard, 1996), que avalia a fibrose em F 0-4, onde 0 representa ausência de fibrose e 4 representa cirrose.

4.12. Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas de todos os dados foi utilizado o software *GraphPad prism* (*San Diego, CA, EUA*). As características clínicas e demográficas e a média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas entre os grupos controle e pacientes com hepatite C foram realizadas com o teste não paramétrico *Mann- Whitney*. A análise de variância ANOVA, seguida pelo teste *Kruskal Wallis* e pós- teste Comparação Múltipla de Dunn foi utilizado para a comparação da média de intensidade de fluorescência (MIF) das citocinas entre os grupos controle e pacientes com hepatite C distribuídos em dois grupos de fibrose $\leq$ F2 e $\geq$ F3. Para a análise da frequência dos alelos do polimorfismo TNF- α - 308 foi realizado o teste *Qui-quadrado* com correção de *Yates*, *Exato de Fisher* e o equilíbrio de *Hardy- Weinberg*. Nos testes estatísticos foi considerado o valor de $p < 0,05$ significativo.

Adicionalmente para as análise das MIF das citocinas foi utilizado a comparação do perfil ascendente das citocinas entre os grupos controle, $\leq F2$ e $\geq F3$ de acordo com a frequência que cada citocina demonstrou entre os grupos. Após obter uma mediana global para cada citocina foi considerado alto produtor de citocinas o indivíduo com valor de MIF acima da mediana, e baixo produtor o indivíduo com MIF abaixo desse valor. A análise referenciada como “assinatura de citocinas” proposta por Luiza- Silva et al., (2011) considera relevante quando a frequência (%) de pacientes alto produtores de citocinas for acima do percentil 50.

Resultados

5. RESULTADOS

Para este estudo foram coletadas 30 amostras de sangue periférico de pacientes infectados pelo *vírus da Hepatite C* atendidos na FMT-HVD. Nestas amostras foram realizadas caracterização do polimorfismo de TNF- α - 308, quantificação das citocinas séricas e análise histológica para determinação do grau de fibrose hepática. Em 20 destas amostras foi realizada a análise das populações de linfócitos T do sangue periférico, juntamente com a análise das moléculas de adesão e quantificação das citocinas do sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Adicionalmente, em 11 destas amostras, foi realizada a análise da população de linfócitos T do tecido após a biópsia hepática como resumido na **figura 8**.

5.1. Dados demográficos e características clínicas e epidemiológicas

Os dados demográficos, características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos envolvidos no estudo estão resumidos na **tabela 2**.

O grupo de pacientes com Hepatite C mostrou faixa etária média maior que os indivíduos do grupo controle (50 anos e 40 anos). O gênero masculino predominou sobre o gênero feminino nos dois grupos estudados. Os genótipos do VHC nos indivíduos infectados foram representados em 70% pelo genótipo VHC- 1, 13% pelo genótipo VHC- 2 e 17% pelo genótipo VHC- 3.

Com relação aos leucócitos totais não foram observadas diferenças estatísticas significativas, no entanto entre os linfócitos foi observado aumento significativo nos pacientes infectados ($p= 0,0010$) e diminuição nas plaquetas com relação ao grupo controle ($p= 0,0455$). Nos pacientes com hepatite C, 20 foram diagnosticados com fibrose moderada $\leq F2$ e 10 com fibrose avançada $\geq F3$. As transaminases que indicam danos hepáticos, AST e ALT, mostraram-se significativamente em maiores concentrações nos paciente com relação ao grupo controle.

Tabela 02. Dados demográficos, características clínicas e epidemiológicas de pacientes com hepatite C e grupo controle.

Características		Controle (n= 28)	Pacientes (n=30)	P value
		[M ± DP]	[M± DP]	
Idade		40,29 ± 9,05	50,27 ± 8,65	-
Masculino/Feminino		20/8	19/11	-
Genótipo VHC	VHC- 1	-	21 (70%)	-
	VHC- 2	-	4 (13%)	-
	VHC- 3	-	5 (17%)	-
Fibrose	≤ F2	-	20 (75%)	-
	≥ F3	-	10 (25%)	-
Leucócitos (Unid.x10 ⁶ /mm ³)		6,82 ± 2,01	6,05 ± 1,75	0,2865
Linfócitos (Unid.x10 ⁶ /mm ³)		1,96 ± 0,60	2,53 ± 0,54	0,0010
Plaquetas (Unid.x10 ⁶ /mm ³)		242,2 ± 51,67	237,9 ± 152,7	0,0455
AST (U/L)		26,75 ± 13,72	69,83 ± 65,13	< 0,0001
ALT (U/L)		38,89 ± 38,27	95,93 ± 75,73	< 0,0001

O teste não paramétrico Mann- Whitney foi utilizado para obter o **p value**

M- média; DP- Desvio padrão

5.2. Perfil dos Linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T regulatórios

Os linfócitos T CD4⁺, TCD8⁺ e T regs foram analisados no sangue periférico de 20 pacientes e comparados ao grupo controle com 28 indivíduos. Os linfócitos T CD4⁺ e TCD4⁺/CD69⁺ [marcador de ativação celular] (p= 0,3548 e p= 0,2501, **Figura 9A e 9B**), T CD8⁺ e T CD8⁺/CD69⁺ (p= 0,6669 e p=0,4836, **Figura 9C e 9D**) dos pacientes com hepatite C não mostraram diferenças significativas com relação ao grupo controle, assim também como a razão dos linfócitos T CD4⁺/ T CD8⁺ e T CD4⁺CD69⁺/ T CD8⁺CD69⁺ (p= 0,9742 e p= 0,7458, **Figura 9E e 9F**). Os linfócitos T regs (CD4⁺/ CD25⁺/FOXP3⁺) mostraram-se aumentados nos indivíduos com hepatite C em relação ao grupo controle (p= 0,0144, **Figura 10**).

Ao comparar os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico pode-se observar percentual significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ do que T CD8⁺ (p< 0.0001). Com relação aos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no tecido hepático demonstrou-se a predominância de células TCD8⁺ significativa com relação a linfócitos T CD4⁺ (p= 0,0488), como mostra a **Figura 11A**. A razão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico mostra que em média há 2 linfócitos T CD4⁺ para cada T CD8⁺ (2:1), enquanto no tecido hepático essa razão fica em 0,6 linfócitos T CD4⁺ para cada T CD8⁺ (0,6:1) **Figura 11B**.

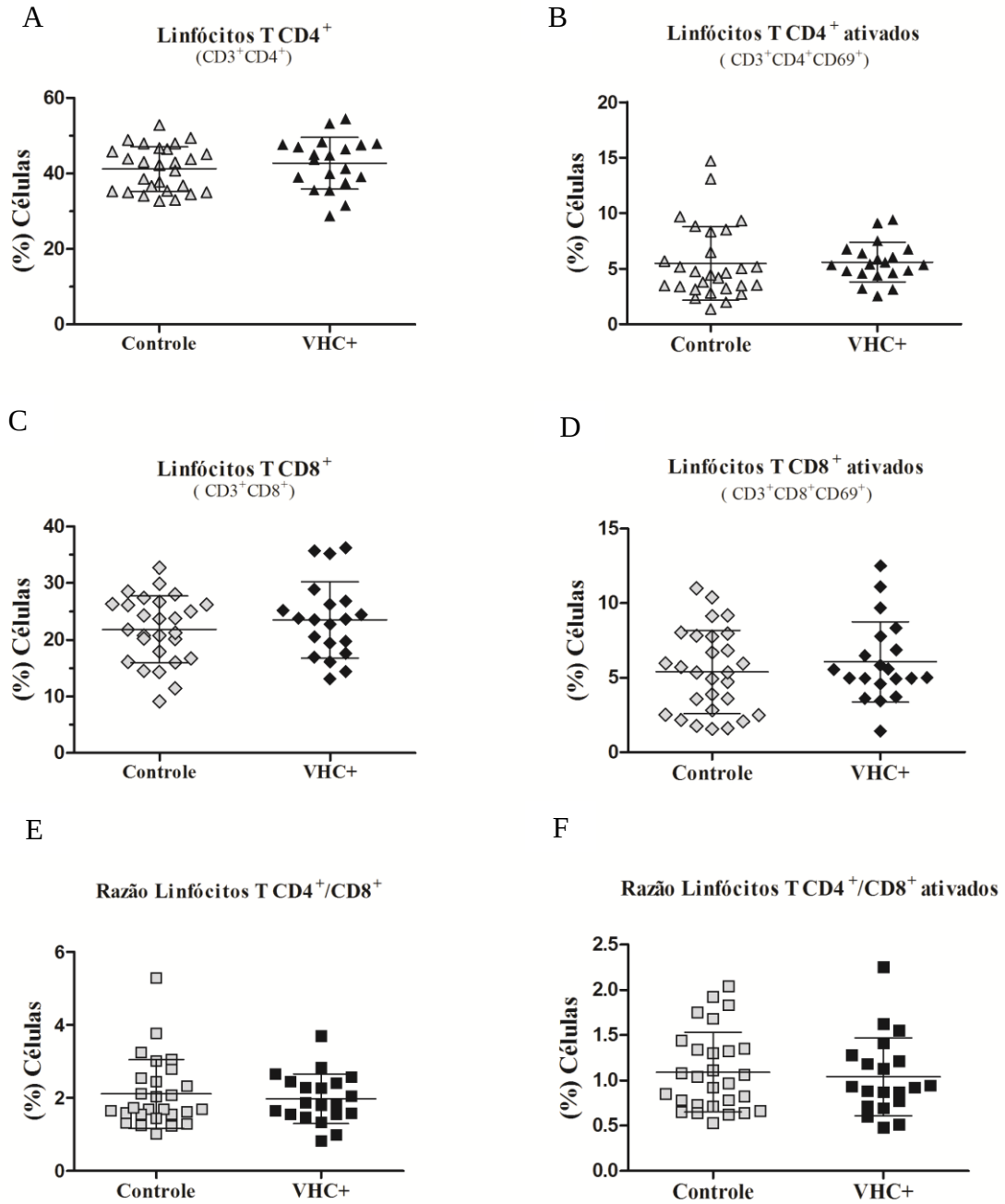


Figura 09. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ totais (A), T CD4⁺ ativados (B), T CD8⁺ totais (C), T CD8⁺ ativados (D), razão entre os linfócitos T CD4⁺/ T CD8⁺ totais (E) e razão entre linfócitos T CD4⁺/ T CD8⁺ ativados (F) entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais apresentando média e desvio padrão. Foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney e considerado ($p < 0,05$) estatisticamente significativo, representado por “*”.

Linfócitos T Regulatórios (T regs)

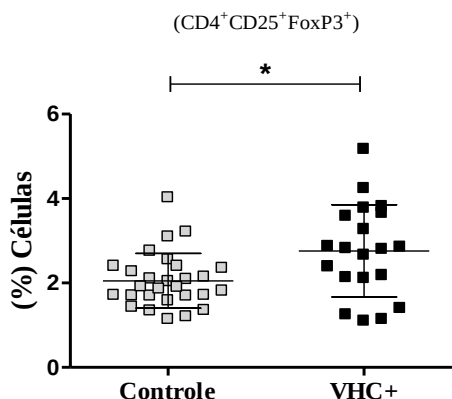


Figura 10. Porcentagem de linfócitos T regulatórios no sangue entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais apresentando média e desvio padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para obter valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos e representado por “*”.

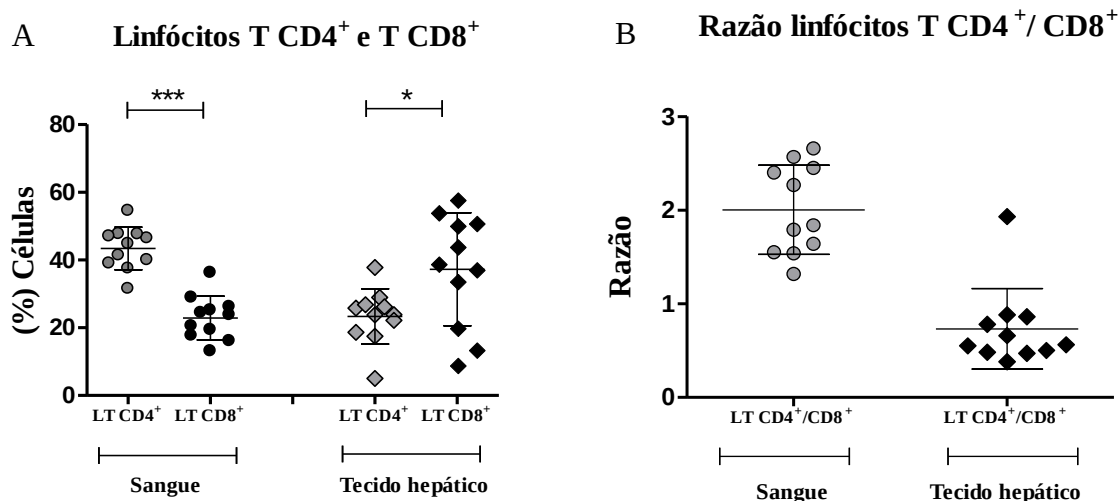


Figura 11. Porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ no sangue periférico e tecido hepático (A) e razão de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ no sangue periférico e tecido hepático (B) de pacientes com Hepatite C. Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais apresentando média e desvio padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para obter valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos e representado por “*”.

5.3. Expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e VLA-4 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

A expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e VLA-4 foram analisadas nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico dos grupos controle e pacientes com hepatite C. Não houve diferenças significativas entre a expressão das moléculas LFA-1 e Mac-1 dos pacientes e grupo controle tanto nos linfócitos T CD4⁺ ($p = 0,9294$ e $p = 0,1652$, **Figura 12A e 12B**) quanto nos linfócitos T CD8⁺ ($0,2026$ e $0,0690$, **Figura 12C e 12D**). A

expressão de VLA-4 mostrou- se significativamente diminuída nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ($p = 0,0084$ e $p < 0.0001$, **Figura 12E e 12F**) de pacientes com hepatite C em relação ao grupo controle.

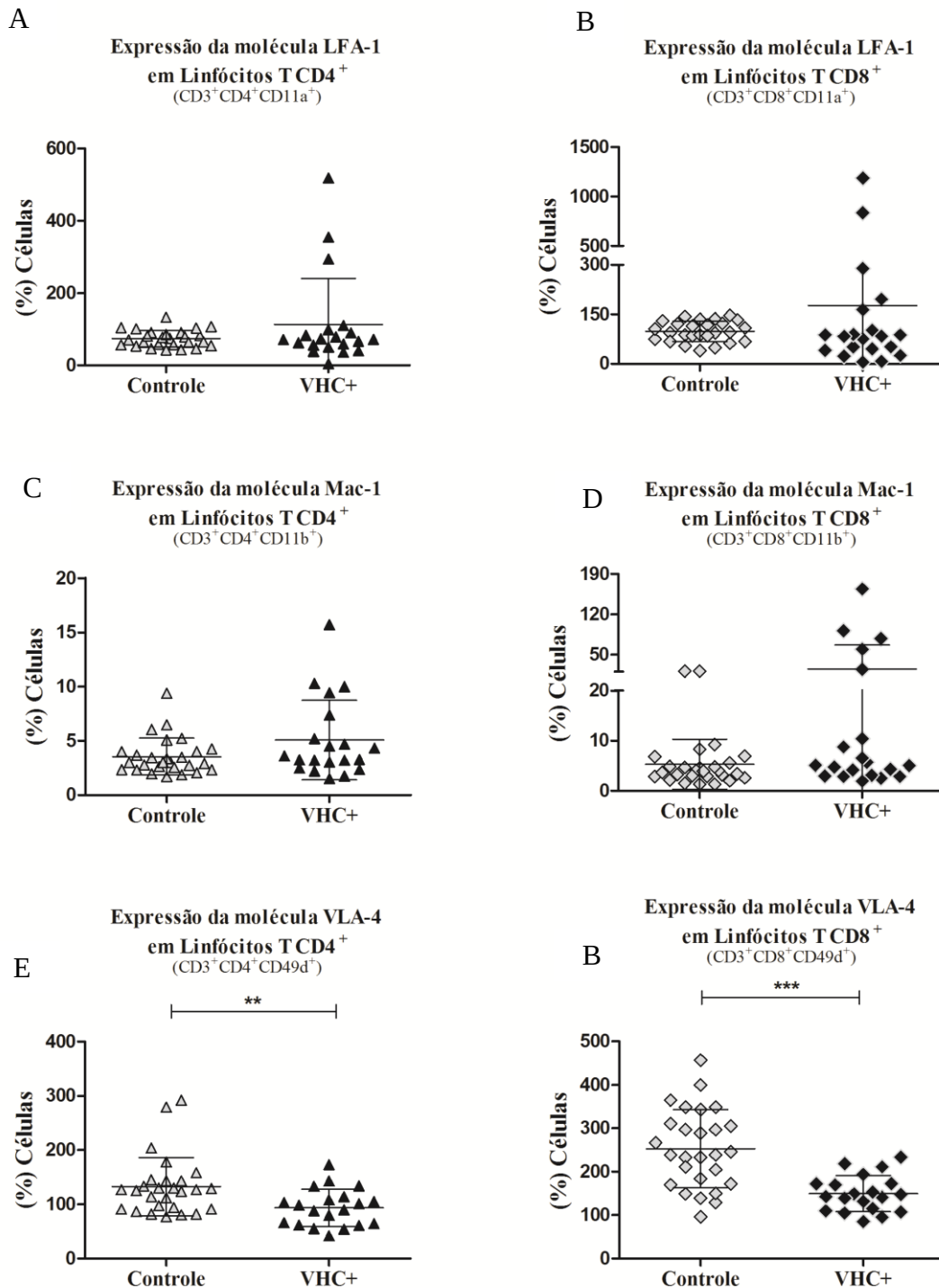


Figura 12. Expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac- 1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4⁺ (Figuras A, C e D) e linfócitos T CD8⁺ (Figuras B, D e F) entre o grupo controle () e pacientes com Hepatite C (). Os resultados são expressos em gráficos de dispersão de valores individuais apresentando média e desvio padrão. O teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para obter valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os grupos e representado por “*”.

5.4. Análise das citocinas séricas Th1, Th2 e Th17

A análise das citocinas séricas IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 entre grupo controle e pacientes com Hepatite C foi caracterizada pelas médias de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a utilização do kit de citometria de fluxo CBA (Cytometric beads array).

5.4.1. Média de intensidade de fluorescência de citocinas pró-inflamatória e de perfil Th1 entre grupo controle e pacientes com Hepatite C

Em relação às citocinas pro- inflamatórias e do perfil Th1 observou aumento significativo de todas as citocinas analisadas, quando comparou- se o grupo de pacientes HCV⁺ ao controle, IL-2 ($p < 0.0001$, **Figura 13A**), IL- 6 ($p=0,0001$, **Figura 13B**), TNF- α ($p=0,0001$, **Figura 13C**) e IFN- γ ($p < 0.0001$ **Figura 13D**).

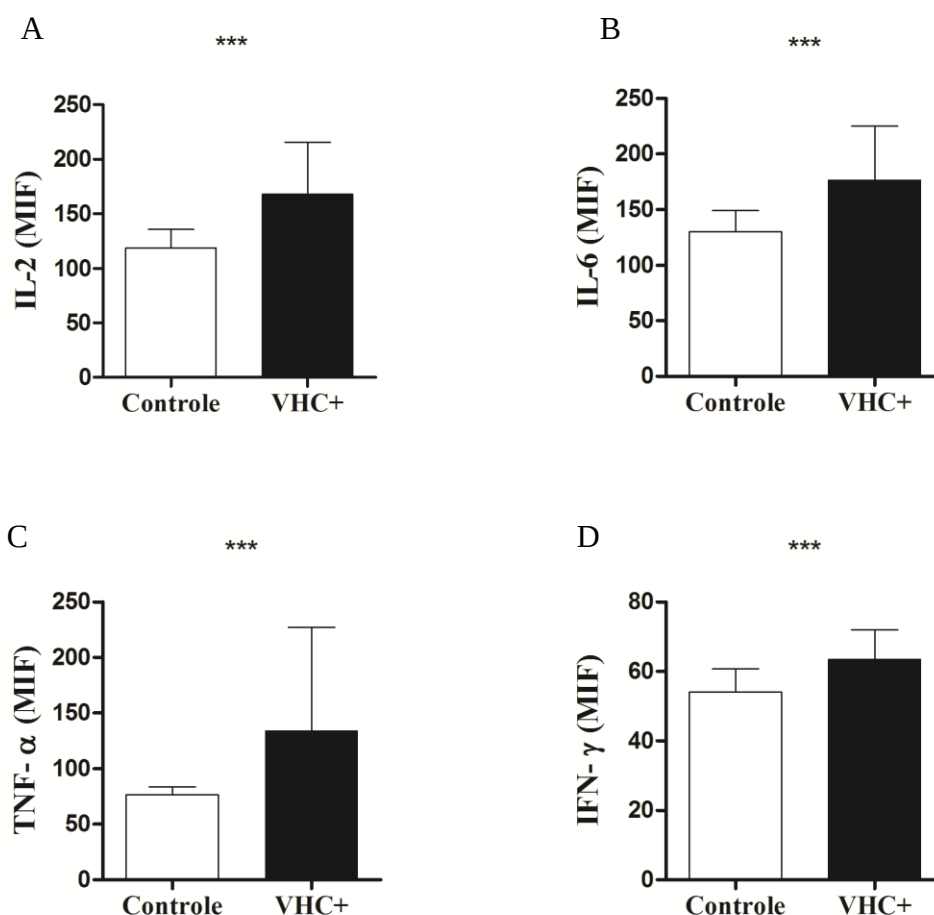


Figura 13. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D) entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são expressos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “***”.

5.4.2. Média de Intensidade de Fluorescência de citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e regulatória entre grupo controle e pacientes com Hepatite C

Nas análises das citocinas séricas do perfil Th2, IL-4 ($p < 0.0001$, **Figura 14A**), Th17, IL-17 ($p = 0.0001$, **Figura 14B**) e regulatória IL-10 ($p = 0.0489$, **Figura 14C**) foi observado aumento significativo destas citocinas nos pacientes em relação ao grupo controle.

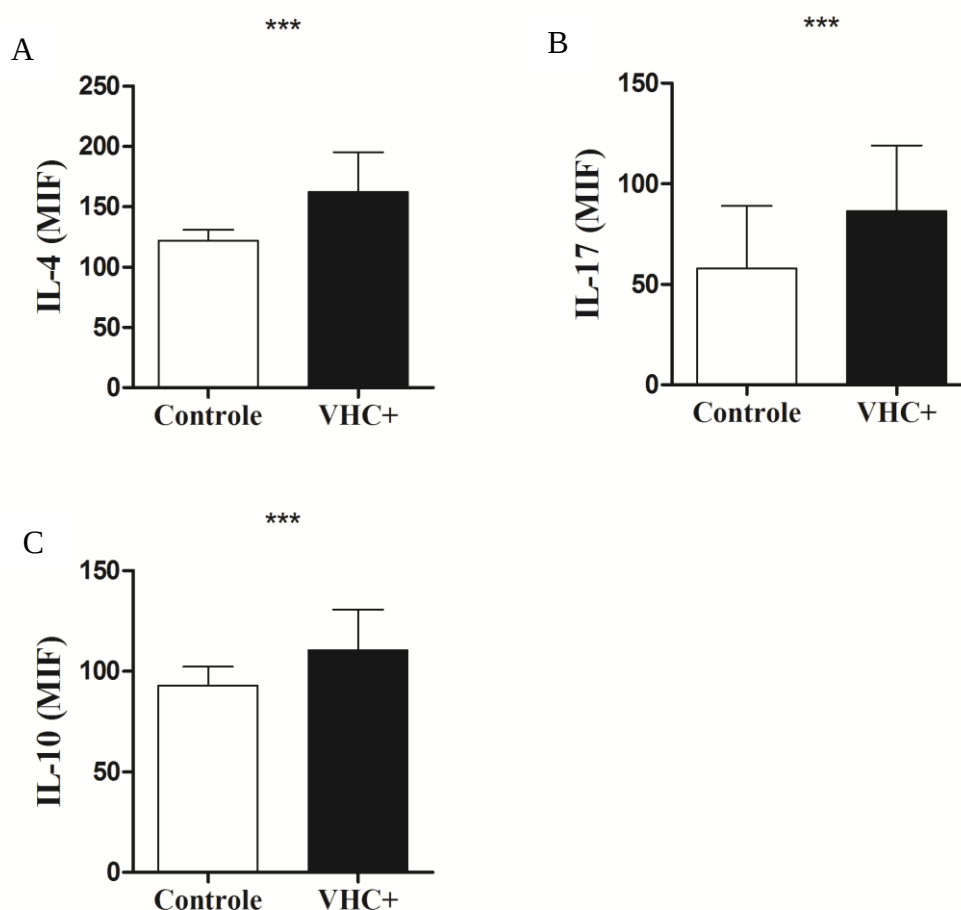


Figura 14. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-4 (A), IL-17 (B) e IL-10 (C) entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Beads Array). Os resultados são com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “***”.

5.5. Análise de citocinas Th1, Th2 e Th17 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Assim como para o sangue periférico, as citocinas, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 em sobrenadante de cultura de PBMC foram determinadas pela MIF, por citometria de fluxo.

5.5.1 Média de intensidade de fluorescência de citocinas pró-inflamatória e de perfil Th1 entre grupo controle e pacientes com hepatite C.

Como demonstrado na Figura 15, observou-se diferenças significativas nas MIF das citocinas pró- inflamatórias e do perfil Th1, IL-2 ($p < 0.0001$, **Figura 15A**), IL- 6 ($p=0,0166$, **Figura 15B**), TNF- α ($p= 0,0001$, **Figura 15C**), e IFN- γ ($p< 0.0001$, **Figura 15D**) quando comparou-se os pacientes VHC+ e controles.

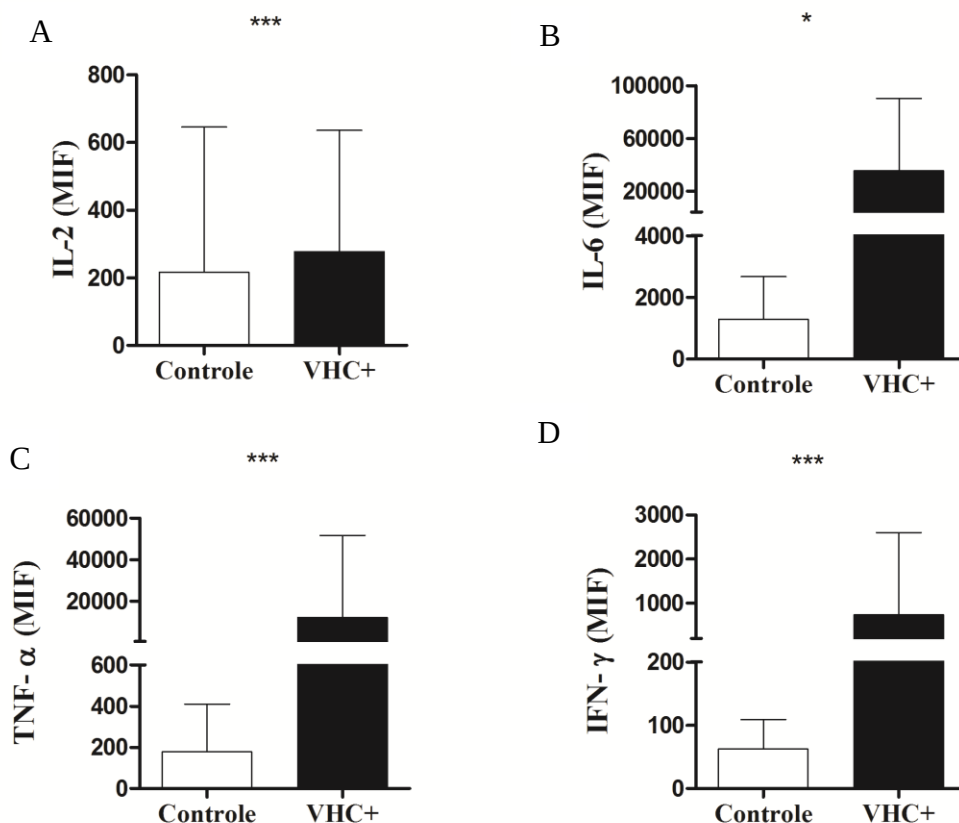


Figura 15. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC, IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D) entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são expressos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “***”.

5.5.2. Média de intensidade de fluorescência de citocinas do perfil Th2, Th17 e regulatória entre grupo controle e pacientes com hepatite C.

Quando analisou-se as citocinas Th2, IL-4 ($p < 0.0001$, **Figura 16A**), Th17, IL-17 ($P= 0,0032$, **Figura 16B**) e regulatória IL-10 ($P= 0,7655$, **Figura 16C**) foi observado aumento significativo nas citocinas IL-4 e IL-17 dos pacientes quando comparou-se com o grupo controle saudável. A IL-10 não mostrou diferenças significativas entre os grupos.

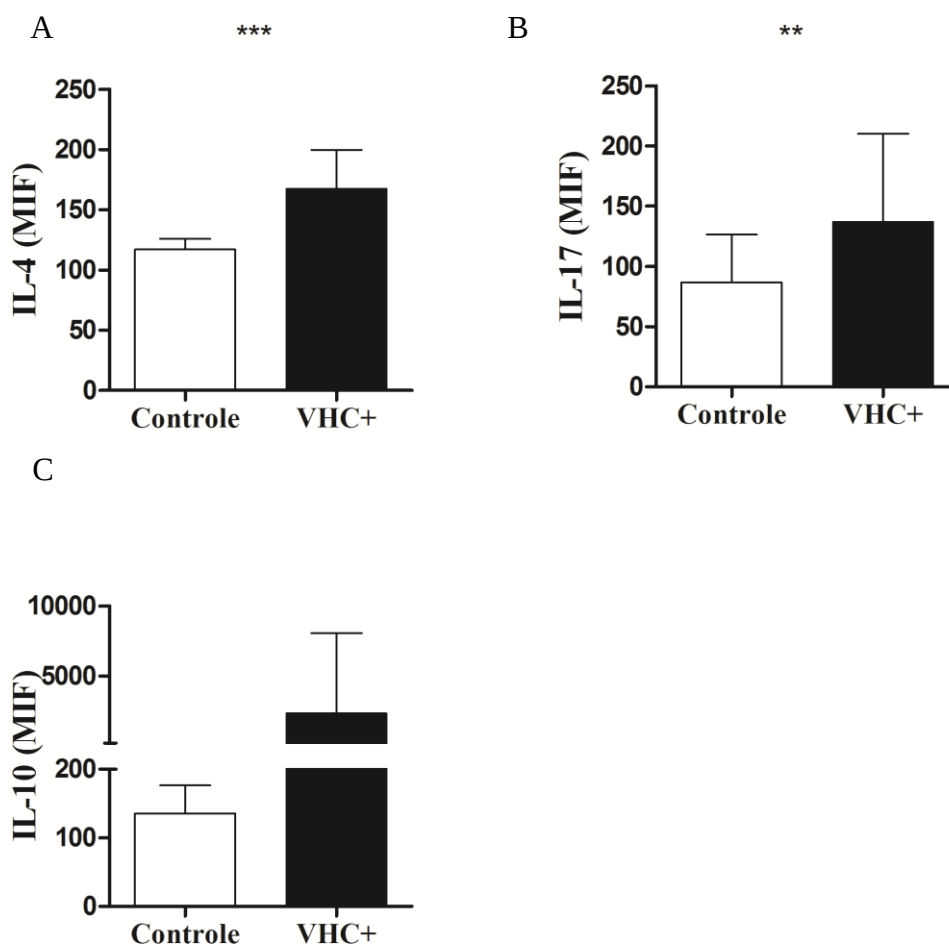


Figura 16. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC, IL-4 (A), IL-17 (B), IL-10 (C) entre grupo controle () e pacientes com Hepatite C (). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são expressos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significante quando $p < 0,05$, representado por “*”.

5.6. Associação das citocinas séricas Th1, Th2, Th17 e regulatória e o grau de progressão da fibrose em paciente com hepatite C

A comparação das citocinas séricas IL- 2, IL-4, IL- 6, IL- 10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 entre o grupo controle e os grupos de pacientes com hepatite C, classificados de acordo com o grau de fibrose, segundo o escore METAVIR, que classifica a fibrose em F0, F1, F2, F3 e F4 foi realizada entre os grupos (Controle *versus* $\leq$ F2), (Controle *versus* $\geq$ F3) e ($\leq$ F2*versus* $\geq$ F3). As citocinas séricas foram analisadas pela média de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a utilização do kit de citometria de fluxo CBA.

5.6.1 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas pro- inflamatórias e do perfil Th1

Para esta análise, o grupo de 30 pacientes foi classificado em dois novos grupos, levando-se em consideração o grau de fibrose $\leq F2$ (20 pacientes) e $\geq F3$ (10 pacientes). Os resultados demonstraram que houve diferenças significativas nas MIF de citocinas pro-inflamatórias e do perfil Th1 quando comparou-se o grupo controle com $\leq F2$ e $\geq F3$, respectivamente, sendo , IL-2 ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, **Figura 17A**), IL- 6 ($p < 0,0001$ e $p = 0,0007$, **Figura 17B**), TNF- α ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$ **Figura 17C**), e IFN- γ ($p < 0,0004$ e $p < 0,0023$, **Figura 17D**). Na comparação entre os dois grupos de fibrose ($\leq F2$ e $\geq F3$) não foram observadas diferenças estatísticas significativas para estas citocinas.

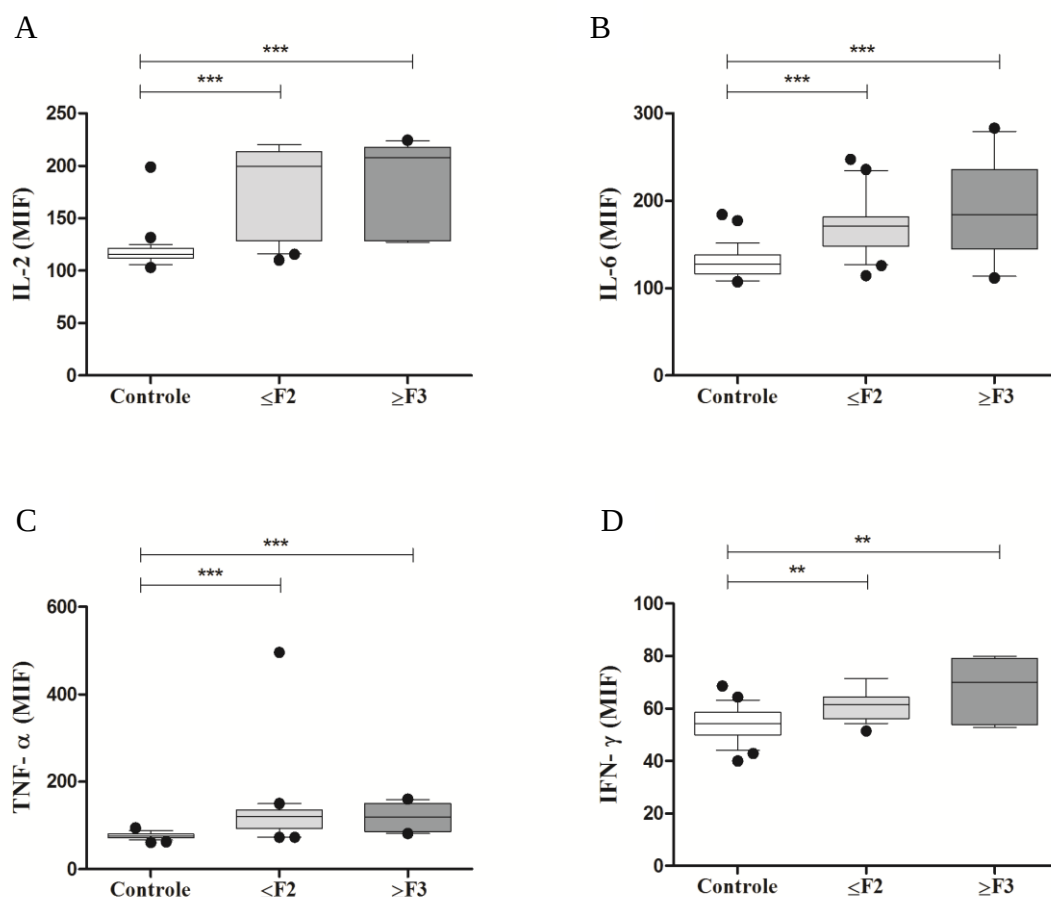


Figura 17. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas entre grupo controle () e pacientes com hepatite c de acordo com o grau de progressão da fibrose em $\leq F2$ () e $\geq F3$ () . As citocinas foram determinados por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). São representadas as citocina IL-2 (**A**), IL-6 (**B**), TNF- α (**C**) e IFN- γ (**D**). Os resultados são apresentados em gráficos em formato de box plot. A mediana de cada grupo é representada pela linha que atravessa cada caixa. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Kruskal- Willis*. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ e representadas pelo traço e asterisco (*).

5.6.2 Associação entre o grau de fibrose e média de intensidade de fluorescência das citocinas séricas do perfil Th2, Th17 e regulatória IL-10

Nas análises da concentração de citocinas do perfil Th2, Th17 e a regulatória IL-10 entre o grupo controle e os grupos $\leq F2$ e $\geq F3$ de pacientes com hepatite C foram observadas diferenças estatísticas significativas somente entre os grupos (controle e $\leq F2$) e (controle e $\geq F3$) de IL-4 ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, **Figura 18A**) e IL-17 ($p < 0,0002$ e $p < 0,0015$, **Figura 18B**). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas para a IL-10 entre o controle e os grupos $\leq F2$ e $\geq F3$. Também não foi observada diferença estatística significativa na comparação entre os grupos de fibrose para estas citocinas.

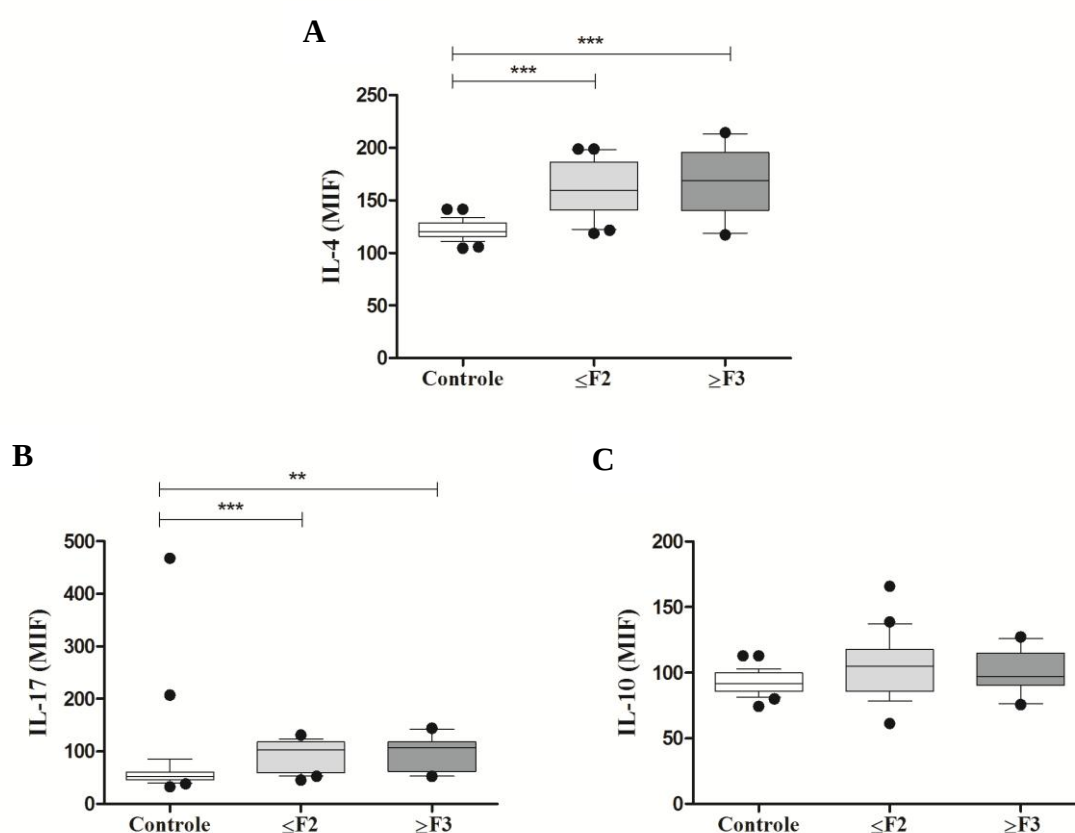


Figura 18. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas entre grupo controle (□) e pacientes com hepatite c de acordo com o grau de progressão da fibrose em $\leq F2$ (▒) e $\geq F3$ (■). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). São representadas as citocina IL-4 do perfil Th2 (A), a regulatória IL-10 (B) e a IL-17 do perfil Th17 (C). Os resultados são apresentados em gráficos em formato de box plot. A mediana de cada grupo é representada pela linha que atravessa cada caixa. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Kruskal-Willis*. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p < 0,05$ e representadas pelo traço e asterisco (*).

A frequência de indivíduos com alta produção de citocinas foi utilizada para traçar o perfil de citocinas ascendente, referenciado com assinatura de citocinas para cada grupo (Figura 20).

No grupo controle nenhum indivíduo apresentou-se como alto produtor de citocina. No entanto nos grupos $\leq F2$ e $\geq F3$ observou-se indivíduos altos produtores de citocinas para todas as citocinas analisadas, com exceção da IL-10 que mostrou-se no limite mínimo do percentil 50 no grupo $\geq F3$, portanto não considerada com concentração alta nesse grupo.

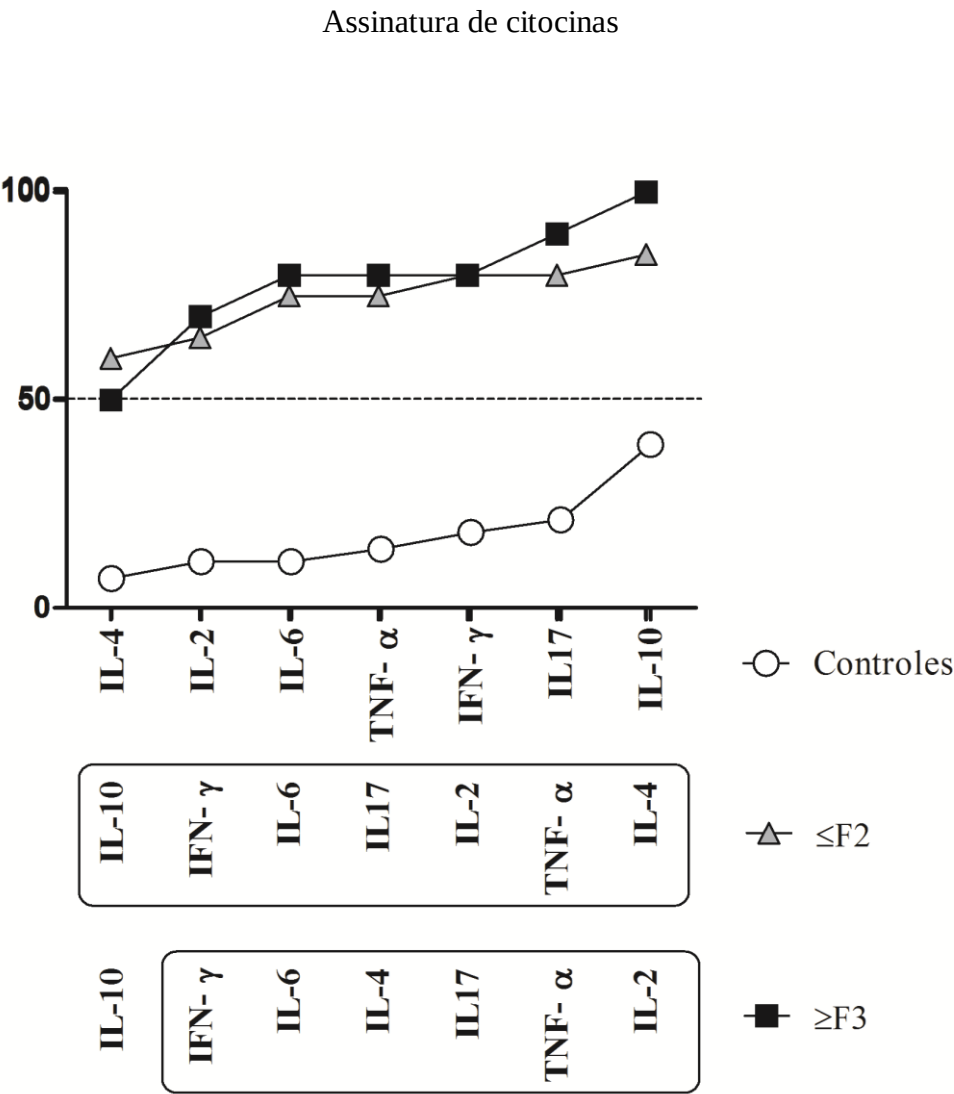


Figura 20. Assinatura de citocinas sobrepostas entre o grupo controle e grupos de pacientes com hepatite c de acordo com o grau de progressão da fibrose ($\leq F2$ e $\geq F3$). Foram consideradas relevantes apenas as frequências acima do percentil 50 e destacadas por um retângulo.

5.8. Frequência do polimorfismo de TNF- α – 308 e associação com citocinas séricas em pacientes com Hepatite C

5.8.1. Frequência do polimorfismo TNF- α – 308 G/A

Para analisar a frequência do polimorfismo de TNF- α – 308 G/A e associa-lo com a citocinas séricas foi utilizada amostras de 30 pacientes com a Hepatite C e 28 amostras do grupo controle.

A frequência dos genótipos (GG, GA e AA) de TNF- α – 308 G/A nos pacientes com hepatite C revelou que 77% são homozigoto com genótipo GG, 23% heterozigoto com genótipo GA e não foi encontrado nenhum homozigoto de genótipo AA. No grupo controle 82% são homozigotos com genótipo GG, e 14% heterozigoto com genótipo GA e 4% com genótipo AA, como resumido na **tabela 3**.

Tabela 03 . Frequência do polimorfismo de TNF- α -308 G/A entre grupo controle e pacientes com Hepatite C.

Polimorfismo	Genótipo	N° Controles (28)	N° Pacientes (30)	P valor
TNF- α – 308	GG	23 (82%)	23 (77%)	0,8492
	GA	4 (14%)	7 (23%)	0,5079
	AA	1 (4%)	0 (0%)	0,4828

5.8.2. Média de intensidade de fluorescência de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 entre os genótipos do polimorfismo TNF- α - 308

As citocinas séricas IL- 2, IL- 4, IL- 6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 entre os genótipos (GG e GA) de TNF- α - 308 G/A em pacientes com Hepatite C foi analisada pelas médias de intensidade de fluorescência (MIF) de cada citocina, adquiridas após a utilização do kit de citometria de fluxo CBA.

As citocinas analisadas entre os genótipos de GG e GA do TNF- α – 308 G/A, IL-2 ($p < 0.4915$, **Figura 21A**), IL- 6 ($p=0,1937$, **Figura 21B**), IFN- γ ($p < 0.2684$, **Figura 21D**), IL-4 ($p < 0.3145$, **Figura 21E**), IL-17 ($p < 0.4322$ **Figura 20F**) não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os genótipos, assim também com a citocina TNF- α ($p= 0,7209$, **Figura 21C**), produzida a partir da transcrição do gene TNF- α . Somente a citocina IL-10 mostrou aumento significativo no genótipo GG em relação ao GA ($p= 0,0006$, **Figura 21G**)

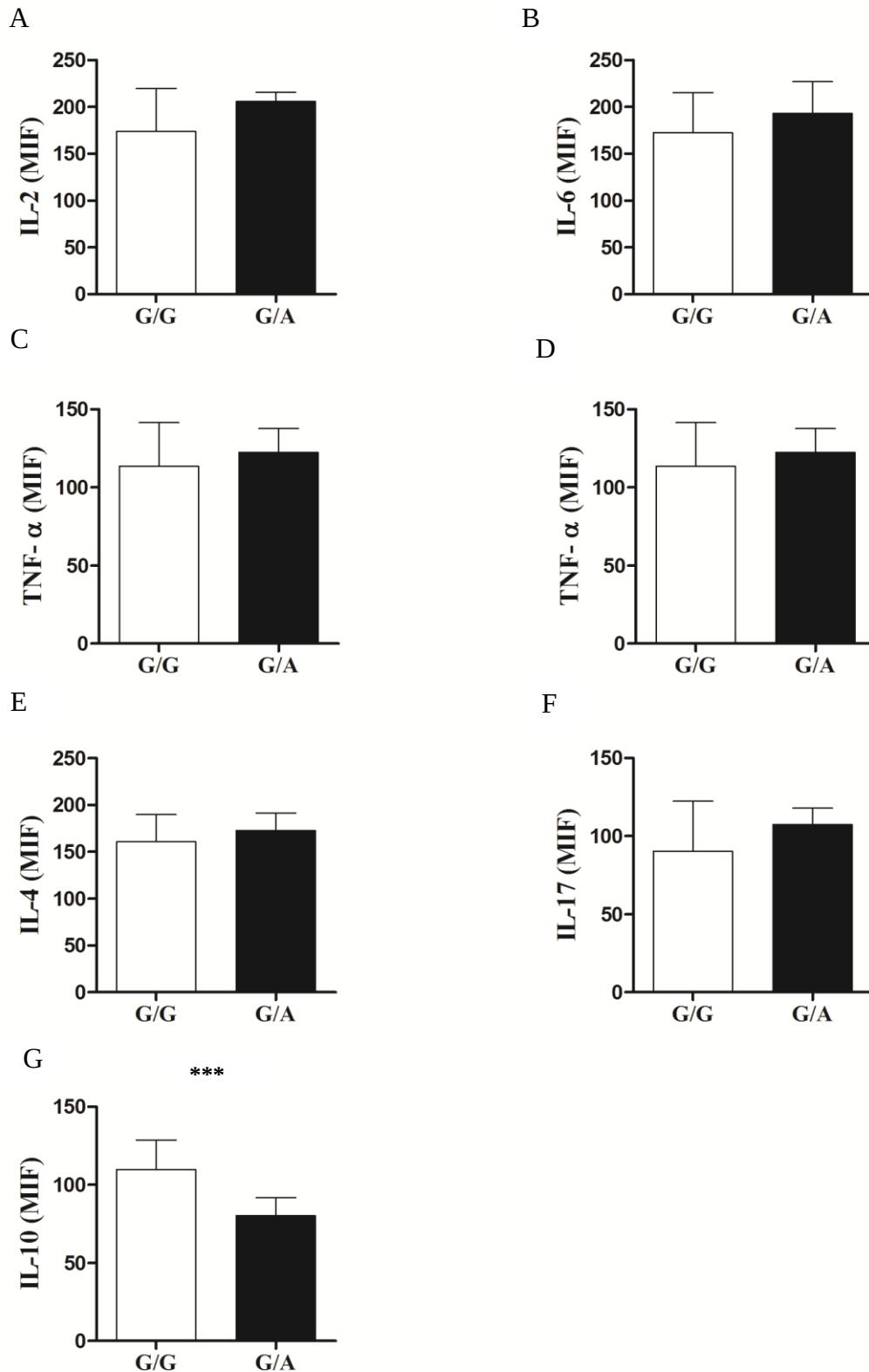


Figura 21. Média de intensidade de fluorescência de citocinas séricas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C), IFN- γ (D), IL-4 (E), IL-17 (F) e IL-10 (G) entre os diferentes genótipos GG (□) e GA (■) do polimorfismo de TNF- α - 308 G/A. As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferenças estatísticas significantes quando $p < 0,05$, representado por “***”.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1. Análise dos linfócitos T em pacientes com hepatite C

A resposta imune celular desempenha um mecanismo essencial na imunopatogênese da hepatite C. As funções dos linfócitos T específicos são comumente associadas com o controle da replicação viral durante a fase aguda da infecção (LECHNER *et al.*, 2000; THIMME *et al.*, 2001).

Na resposta imune à infecção pelo VHC, as células dendríticas ativadas apresentam os antígenos virais para os linfócitos T CD4⁺, que vão se proliferar e produzir citocinas como IL-2, IFN- γ e IL-4, necessárias para o desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺. Em situações ideais, os linfócitos T CD8⁺ ativados são capazes de eliminar os hepatócitos infectados pelo VHC através de mecanismo citolítico, destruindo diretamente as células infectadas ou mecanismo não citolítico, que inclui a secreção de citocinas como IFN- γ e TNF- α que inibem a replicação viral sem destruir a célula infectada diretamente (GUIDOTTI CHISARI, 2001; SPAAN *et al.*, 2012).

Em nosso estudo analisamos os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T regulatórios (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3) do sangue periférico de pacientes com hepatite C e grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, enquanto os linfócitos T regs demonstram maior porcentagem celular nos indivíduos com hepatite C em relação ao controle.

Estudos revelam que no início da infecção pelo VHC, uma resposta vigorosa de células T CD4⁺ específicas são essenciais para limitar a replicação do vírus, e os indivíduos que conseguem uma eliminação viral espontânea apresentam precocemente essa resposta vigorosa de células T CD4⁺, independentes do nível em que se encontra a replicação viral. Em contraste, nos sujeitos que demonstram persistência da infecção, as respostas proliferativas de linfócitos T CD4⁺ estão quase ausentes, embora possam ser observadas em alguns indivíduos com o controle temporário do VHC (GERLACH *et al.*, 1999).

Grakoui *et al.*, (2003), Rehmann, (2009) e Schulze *et al.*, (2012) também demonstraram essas diferentes características da proliferação de linfócitos T CD4⁺ no curso da infecção pelo VHC e revelaram que estas células estão presentes em quase todos os indivíduos infectados durante a fase inicial da resposta imune adaptativa e são vigorosas e com especificidade a muitos antígenos do vírus. Mas não consideram que pacientes que evoluíram para a infecção crônica não tem uma resposta efetiva de linfócitos T CD4⁺.

Segundo Urbani *et al.*, (2006) e Kaplan *et al.*, (2007) as células T CD4⁺ específicas para o VHC não são detectadas facilmente na maioria dos pacientes na fase crônica da infecção, o que pode provavelmente contribuir para o comprometimento das células T CD8⁺. Esse comprometimento pode também ser mediado por expressão de receptores inibitórios, os quais conduzem os linfócitos T CD8⁺ a exaustão e depleção.

O sucesso da eliminação viral é mediado principalmente por linfócitos T CD8⁺ específicos, os quais dependem de uma forte resposta de linfócitos T CD4⁺ (SHOUKRY *et al.*, 2003). Segundo Wedemeyer *et al.*, (2002) e Spangenberg *et al.*, (2005) os linfócitos T CD8⁺ ainda são detectáveis na infecção crônica pelo VHC, mas frequentemente tem fenótipos disfuncionais como funções efetoras comprometidas, como a produção de citocinas antivirais, citotoxicidade e proliferação.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças entre estas células nos pacientes e grupo controle, sugerindo que estes pacientes não alteraram significativamente a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue, apesar da infecção pelo VHC. Isso provavelmente é devido os pacientes estarem na fase crônica da infecção, concordando com os dados dos estudos citados.

Mecanismos adicionais de disfunção das células T podem incluir a ação de linfócitos T regulatórios (Tregs), que suprimem as funções efetoras de linfócitos T específicos por citocinas inibitórias (NEUMANN *et al.*, 2007; ALATRAKCHI & KOZIEL *et al.*, 2009; WALKER, 2010).

Os Linfócitos T regs regulam a atividade de linfócitos T de forma direta ou indiretamente por modular as células apresentadoras de antígenos (ZHU & PAUL, 2010). Os linfócitos T regs do sangue periférico podem estar envolvidos na regulação negativa das respostas imunes específicas durante as doenças infecciosas e ajudam a conter uma potencial lesão pela resposta imune excessiva, no entanto podem facilitar a infecção crônica (ROUSE *et al.*, 2006)

Cabrera *et al.*, (2004) encontraram uma alteração significativa de linfócitos T regs no sangue de indivíduos cronicamente infectados quando compararam ao grupo que eliminou o vírus espontaneamente ou o grupo controle, sugerindo que estas células desempenham um papel na supressão de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na resposta ao VHC e assim promovem a persistência da infecção.

No presente estudo foi observado que no sangue periférico de pacientes com hepatite C a porcentagem de linfócitos T regs é maior que o grupo controle, o que está de acordo com

Sugimoto *et al.*, (2003) e Claassen *et al.*, (2010), que demonstraram que número de T regs na circulação, assim como no fígado de pacientes com VHC apresentou-se aumentado quando comparados com indivíduos saudáveis.

O primeiro sítio de replicação e inflamação crônica na resposta imune ao VHC é o fígado, onde a infiltração das células TCD4⁺ e TCD8⁺ são as populações de linfócitos mais abundantes, assim como a expressão de vários receptores de quimiocinas, marcadores de ativação e outras subpopulações de linfócitos e tendem a aumentar com a severidade da inflamação hepática (WANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, foi realizada adicionalmente, a análise de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T regs do tecido hepático de 11 pacientes com hepatite C e comparados com os linfócitos do sangue periférico. Os dados demonstraram que no sangue periférico existe maior porcentagem de linfócitos T CD4⁺ do que T CD8⁺, enquanto no fígado, encontra-se maior porcentagem de linfócitos T CD8⁺ do que T CD4⁺ e com relação aos linfócitos T regs não houve diferença entre sangue periférico e tecido hepático.

Gruener *et al.*, 2001; Wedemeyer *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2004 demonstraram que funções efetoras de células T CD8⁺ específicas para VHC podem estar comprometidas no sangue periférico e assim teria uma capacidade proliferativa diminuída. Essa diminuição de linfócitos T CD8⁺ no sangue não seria uma consequência da possível concentração destas células no fígado. Spangenberg *et al.*, 2005 relata que as respostas de células T CD8⁺ e T CD4⁺ no sangue periférico foram baixas quando comparadas com o compartimento intra-hepático.

Estudos demonstraram que em pacientes com hepatite C crônica a habilidade de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em produzir IFN- γ , assim também como a porcentagem proporcional de perforinas das células TCD8⁺ foi menor no fígado do que no sangue periférico. Contrariamente, a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando FasL foi maior no fígado do que no sangue periférico. Estes resultados sugerem que FasL/Fas desempenham importante papel na apoptose no fígado e pode ser a provável via que direciona a imunopatogênese da hepatite C crônica (WANG *et al.*, 2006).

Além do mais, foi demonstrado que os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com fenótipos de células de memória e diferenciação foram encontradas em maiores concentrações no fígado com relação ao sangue periférico e aumentaram significativamente na progressão da lesão e inflamação hepática, o que sugere uma associação entre a frequência dos linfócitos T de memória no fígado e severidade da inflamação (DUTTON *et al.*, 1998; APPAY *et al.*, 2002;

WANG *et al.*, 2006). No entanto, Curtsinger *et al.*, (2005) demonstraram que os linfócitos TCD8⁺ são menos responsivos no fígado do que no sangue periférico.

Os linfócitos T regs estão presentes no fígado de pacientes com hepatite C crônica (Sakaki *et al.*, 2008; Miyaaki *et al.*, 2009) e correlacionado negativamente com o desenvolvimento da fibrose hepática, enquanto no fígado de indivíduos saudáveis estão virtualmente ausentes (CLAASSEN *et al.*, 2010).

Segundo Grabowska *et al.*, (2001) e Cabrera *et al.*, (2004) a distribuição de linfócitos T regs em seus estudos sugere que estas células acumulam principalmente no sangue periférico e não no sítio da inflamação, o fígado. Tipicamente, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ específicos estão presentes principalmente no fígado e não no sangue periférico, assim a deficiência de linfócitos T regs no fígado podem conduzir a lesão hepática progressiva.

Em resumo, os linfócitos T desempenham um importante papel na imunopatogênese da hepatite C. O conhecimento sobre os mecanismos de atuação destas células nos diferentes ambientes imunológicos, fígado ou sangue periférico, podem conduzir novos estudos e contribuir com marcadores que possam prever os mecanismos que diminuam a persistência desta infecção.

6.2. Análise da expressão das moléculas de adesão LFA-1, Mac-1 e VLA-4 nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com hepatite C.

O movimento dos leucócitos do sangue para o tecido periférico é crítico na resposta imune do indivíduo. No entanto, o tráfico excessivo de leucócitos contribui para a patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes. Este mecanismo é orquestrado e controlado por uma quantidade de moléculas quimioatraentes e de adesão localizadas tanto nos leucócitos como no endotélio vascular (ROSE *et al.*, 2007). As moléculas de adesão das células envolvidas neste processo são principalmente as integrinas LFA-1, Mac-1 e VLA-4 (LUSTER *et al.*, 2005).

A integrina LFA-1 é expressa exclusivamente pelos leucócitos e desempenha papéis importantes no recrutamento destas células para o sítio de inflamação (SPRINGER, 1994), além de estar envolvida em várias interações célula- célula (SHIMAOKA, 2003). A integrina Mac-1 é expressa pelas células de linhagem mielóide (VARGA *et al.*, 2007), incluindo neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e em certas subpopulações de linfócitos T. A VLA- 4 desempenha importantes funções na diferenciação e *homing* de

linfócitos, regulando as funções de rolamento e aderência dos leucócitos no endotélio vascular (UDAGAWA *et al.*, 1996; DOUCEY *et al.*, 2003; CARRASCO & BATISTA, 2006;).

Em nosso estudo foi analisado a expressão das integrinas LFA-1, Mac-1 e VLA- 4 na superfície dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com hepatite C. Nossos resultados revelaram que a expressão das integrinas LFA-1 e Mac-1 não mostraram diferenças significativas entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes com hepatite C em relação ao grupo controle. Enquanto que a expressão de VLA-4 foi maior nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos indivíduos controle do que nos pacientes VHC⁺.

Estudos demonstram que em pacientes com deficiência na subunidade $\beta 2$ de LFA-1, tem funções comprometidas na adesão de leucócitos, dificuldades em eliminar os patógenos e assim apresentam recorrentes episódios infecciosos e morte precoce (SPRINGER, 1994). Ulyanova *et al.*, (2007) demonstraram em modelos animais que a deficiência nas subunidades de LFA-1 podem comprometer a resposta imune, incluindo o recrutamento atenuado de célula mielóides. Ghosh *et al.*, (2006) demonstraram que comprometimentos nas subunidades CD11a e CD18 de LFA-1 podem conferir resistência contra bactérias, especificamente *Mycobacterium tuberculosis*.

Shimaoka *et al.*, (2003) demonstraram o uso de um antagonista específico para LFA-1 no tratamento de doenças com base na resposta dos linfócitos, incluindo psoríase, artrite reumatóide e rejeição no transplante de órgãos. A utilização de um anticorpo monoclonal, Efalizumab, para a subunidade αL de LFA-1, seletivamente e reversivelmente inibe o tráfico de linfócitos T e assim ameniza a psoríase por bloquear a interação dos linfócitos T com células de langerhans, células endoteliais e queratinócitos (LEBWOHL *et al.*, 2003; SIMMONS, 2005).

Na resposta a estímulos inflamatórios, a expressão aumentada de Mac-1 na superfície dos neutrófilos (SPRINGER *et al.*, 1994) e monócitos (MILLER *et al.*, 1987) é insuficiente para as funções de adesão durante o recrutamento de leucócitos e transmigração (VEDDER & HARLAN, 1988). No entanto, Phillipson *et al.*, (2006) demonstraram que a deficiência de Mac-1 não prejudica significativamente a adesão de neutrófilos no endotélio vascular durante a inflamação, mas sugeriram que somente a integrina Mac-1 é intermediária na transmigração dos neutrófilos, após sua aderência no endotélio. A expressão aumentada de Mac-1 na superfície dos neutrófilos após a desgranulação não persiste quando estas células são expostas a estímulos por um longo tempo (DAVEY *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que VLA-4 é importante nos mecanismos de interações e adesão, e estão diretamente relacionadas na manutenção das células através da hematopoiese (IMAI *et al.*, 2010), assim como as respostas imunes intrínsecas. A aderência de VLA-4 no endotélio depende de quimiocinas (CHIGAEV & SKLAR, 2012) e tem implicações na patogênese de doenças autoimunes e inflamação crônica como esclerose múltipla (YEDNOCK *et al.*, 1992), doença de Crohn (GHOSH *et al.*, 2003), asma (LABERGE *et al.*, 1995) e artrite reumatóide (LAFFON *et al.*, 1991).

Estudos realizados por Kadioglu *et al.*, (2011) demonstraram que no pulmão durante a infecção por *Streptococcus pneumonia*, o recrutamento de linfócitos T depende unicamente de VLA-4, enquanto o de neutrófilos depende também de Mac-1. Wang *et al.*, (2008) demonstram que VLA-4 é crítica para a maturação de fagossomas e que a deficiência desta integrina nos macrófagos pode ter comprometimento da atividade bactericida destas células.

Estudos que relacionam a atividade destas integrinas nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com a infecção pelo VHC ainda são escassos, no entanto, nossos estudos podem contribuir para compor dados que possam delinear o comportamento destas moléculas nesta doença. Investigar estas moléculas nas diferentes populações de linfócitos T durante a evolução da hepatite C poderia contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos imunes envolvidos na complexa inflamação hepática desenvolvida na infecção pelo VHC.

6.3. Análise de citocinas séricas pró- inflamatórias Th1 e anti-inflamatória, Th2 e Th17 e o grau de progressão da fibrose em pacientes com hepatite C

A hepatite C é a doença hepática relacionada com os maiores índices de morbidade e mortalidade devido as recorrentes complicações como progressão da fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (LAUER & WALKER, 2001; RAUCH *et al.*, 2010). A resposta imune na hepatite C tem um potencial de contribuir não somente com a eliminação viral e em alguns casos imunidade protetora, mas também ocasionar lesão hepática (REHERMANN, 2009).

As citocinas são proteínas secretadas por células imunes ativadas e apresentam funções pleiotrópicas essenciais na resposta imunológica contra agentes infecciosos (HOFMANN *et al.*, 2002). Estudos demonstraram que na hepatite C crônica, há correlação entre as concentrações de citocinas do perfil Th1 e lesão hepática progressiva, enquanto as citocinas do perfil Th2 suprimem as respostas de Th1 e tornam a resposta imune mais branda (GIGI *et al.*, 2008). Doenças hepáticas, como a hepatite C, causam inflamação no fígado e estão

associadas a produção de citocinas e destruição dos hepatócitos, o que pode resultar em progressão da fibrose (PAWLOTSKY, 2004).

A fibrose hepática tem implicações importantes para o prognóstico de doenças e decisões de terapia. As informações sobre os estados da fibrose não somente indicam resposta ao tratamento mas também reflete/indica o desenvolvimento das principais complicações como a cirrose (AFDHAL *et al.*, 2004; ZIOL *et al.*, 2005).

Neste estudo, foram comparadas as citocinas do soro de pacientes com hepatite C e grupo controle. Nossos dados demonstram que as citocinas do perfil inflamatório, Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α) e anti- inflamatório Th2 (IL-4) tem maiores concentrações significativas no soro dos indivíduos com hepatite C do que no grupo controle.

Dados semelhantes foram demonstrados em alguns estudos como os de Cacciarelli *et al.*, (1996), que relataram o aumento das citocinas do perfil Th1, como IFN- γ e IL-2, as do perfil Th2, IL- 4 e a regulatória IL-10 no soro de pacientes com hepatite C em relação ao grupo controle, no entanto, o perfil Th2 foi mais elevado que Th1. Assim também como Fan *et al.*, (2000) que demonstraram que em pacientes com hepatite C o perfil Th2 predomina ao Th1. Estudos realizados por Spanakis *et al.*, 2002 descreveram uma diminuição de IL-4, enquanto Zhang *et al.*, 2011 relataram uma diminuição de IL-2 no soro de indivíduos portadores do VHC.

Chen *et al.*, (2007) mostraram que a concentração de IL-4 e IL-10 foram significativamente aumentadas em relação ao grupo controle, em concordância com o que foi demonstrado por Reiser *et al.*, (1997) e Abayli *et al.*, (2003). No entanto, Sofian *et al.*, 2012 demonstram que tanto as concentrações de IL-2 e IFN- γ , quanto de IL- 4 e IL-10 apresentaram-se aumentadas no soro de pacientes com VHC em relação ao grupo controle.

Posteriormente, as concentrações de citocinas do soro dos pacientes com hepatite C foram analisadas e relacionadas ao grau de fibrose, obtido a partir da biópsia hepática, seguida pela análise histológica de acordo com o escore METAVIR. Os pacientes foram segregados em um grupo com fibrose moderada $\leq$ F2 e outro com fibrose avançada $\geq$ F3. Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de citocinas séricas entre esses grupos.

No entanto, analisando os indivíduos em altos e baixos produtores de citocinas séricas nesses grupos e controle, demonstrou-se que o grupo controle não apresenta nenhuma porcentagem de indivíduos com elevada produção de citocinas, enquanto no grupo de fibrose moderada $\leq$ F2 observou-se uma elevada porcentagem de indivíduos com altas concentrações principalmente de IL-4, perfil Th2, seguida de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10,

enquanto o grupo de fibrose avançada $\geq F3$ demonstrou uma porcentagem elevada de indivíduos com altas concentrações principalmente de IL-2, do perfil Th1, seguido de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-17, IFN- γ . A porcentagem de indivíduos altos produtores de IL-10 não mostra-se relevante nesse grupo. O desenvolvimento do perfil Th2 é promovido pela IL-4, que antagoniza o desenvolvimento de Th1, enquanto IFN- γ e IL-2 promovem o desenvolvimento de Th1 e antagoniza o desenvolvimento de Th2 (WICK *et al.*, 2013).

Esses dados sugerem um papel importante da citocina IL-4 em controlar o desenvolvimento de lesões hepáticas, no grupo de fibrose moderada, enquanto IL-2 poderia contribuir para a evolução da fibrose avançada, como sugerido por Sobue *et al.*, (2001) e Yamaki *et al.*, (2005). Estes autores demonstram que a troca de citocinas do perfil Th2 para Th1 tem sido associada com o aumento da atividade necroinflamatória e fibrose hepática.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que regula negativamente a expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias nas células apresentadoras de antígenos (STEINBRINK *et al.*, 1997), e inibe a ativação de células T via inibição da molécula co-estimulatória CD28 (TAYLOR *et al.*, 2007). A permanência da concentração de IL-10 aumentada durante a infecção pode promover persistência do processo patológico por suprimir as atividades de células T, contribuindo assim para o declínio da resposta efetora contra os vírus (COX *et al.*, 2005), no entanto também previne o desenvolvimento de lesões mediadas pela excessiva resposta imune protetora (MEGE *et al.*, 2006).

Tanto a deficiência ou superprodução de IL-10 pode ser responsável por lesões. A baixa produção desta citocina pode resultar no aumento das reações inflamatórias e consequentemente doenças autoimunes. Do contrário, a superprodução pode resultar no aumento da suscetibilidade a infecção viral ou câncer (MIYAZOE *et al.*, 2002).

No presente estudo a concentração de IL-10 no soro apresentou-se elevada somente nos indivíduos do grupo de fibrose moderada $\leq F2$ em relação ao grupo de fibrose avançada $\geq F3$, sugerindo uma atividade regulatória e anti-inflamatória protetora nesse grupo.

Estudos realizados por Aroucha *et al.*, (2013) indicam um papel protetor de IL-10 em pacientes com fibrose moderada, pois apresentaram maiores concentrações de IL-10 quando comparados com indivíduos com fibrose avançada, reforçando a nossa hipótese de que a IL-10 pode exercer um papel protetor na infecção pelo VHC em relação a evolução da fibrose hepática. Outros estudos enfatizaram o papel protetor de IL-10 utilizado no tratamento da hepatite C crônica, o qual teve diminuição da severidade da fibrose nos indivíduos envolvidos (NELSON *et al.*, 2000). Em outros estudos com modelos animais, foi demonstrado que a

ausência de IL-10 teve associação com a fibrose hepática (LOUIS *et al.*, 1997; THOMPSON *et al.*, 1998). Em contraste a estes dados em um estudo realizado por Abayli *et al.*, (2003) utilizando IL-10 e atividade histológica, não foi encontrada relação entre esses parâmetros.

Em resumo, a assinatura de citocinas demonstra que em pacientes com fibrose moderada $\leq F2$ foi caracterizado um aumento principalmente de IL-4 e IL-10, enquanto, nos pacientes com fibrose avançada $\geq F3$ foi caracterizado um aumento principalmente IL-2 e diminuição de IL-10, reforçando a nossa hipótese do efeito protetor de IL-10 nestes indivíduos, como citado anteriormente.

Portanto, a ação das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias é um evento dinâmico que vai influenciar a progressão da lesão hepática, contribuindo para amenizar os danos causados pelos agentes patogênicos ou ainda regulando a resposta excessiva de células efectoras. Conhecer os mecanismos que controlam a produção e secreção das citocinas, durante a progressão da fibrose hepática pode contribuir na identificação de um potencial marcador terapêutico para avaliar a evolução da doença e amenizar as complicações relacionadas à infecção pelo vírus da hepatite C.

6.4. Análise da produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes com Hepatite C

Para melhor caracterização das citocinas nos indivíduos VHC⁺, o próximo passo neste estudo foi determinar a concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 em cultura de PBMC. Nossos dados demonstraram que estas citocinas apresentaram MIF maior nos pacientes com hepatite C em relação ao controle. No entanto, não foi observada diferenças na concentração de IL-10 quando comparado os dois grupos, VHC⁺ e controle.

Dong *et al.*, 2004 compararam as citocinas no sobrenadante de PBMC de indivíduos com hepatite C e controle e demonstraram que a concentração de IFN- γ , TNF- α e IL-10 aumentou significativamente nos pacientes VHC⁺, enquanto IL-2, IL-4 e IL-12 não foram detectadas no sobrenadante das culturas, tanto de indivíduos com hepatite C, quanto grupo controle. Estes autores sugeriram que PBMC de pacientes infectados com VHC tendem a secretar citocinas do perfil Th2 e que a perda da secreção de IL-2 poderia ser devido ao escape viral do sistema imune e que a restauração do desequilíbrio de Th1/Th2 poderia ajudar a eliminar este vírus (DONG *et al.*, 2008).

Em contraste ao estudo acima, nossos dados demonstraram que PBMC de pacientes VHC+ secretam concentrações maiores de citocinas do que indivíduos saudáveis, com exceção a IL-10, que não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos. Apesar deste contraste, podemos inferir que diferentes mecanismos poderiam ocorrer nestes pacientes, causados pelo tempo da infecção, grau do desenvolvimento da doença e os diferentes genótipos do VHC. Portanto, novos estudos serão necessários para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nesta infecção.

6.5. Análise da frequência do polimorfismo de TNF- α – 308 em pacientes com hepatite C

As citocinas desempenham um importante papel na iniciação e regulação da resposta imune (GRUNHAGE *et al.*, 2010). A presença do polimorfismo na posição -308 G/A no gene da citocina TNF- α pode estar ligada a suscetibilidade de doenças infecciosas, inclusive hepatite C (YEE *et al.*, 2000; ROSEN *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Dogra *et al.*, (2011) demonstraram uma significativa associação do polimorfismo TNF- α - 308 G/A em pacientes com hepatite C quando comparados ao grupo controle. Em nossos estudos, nos pacientes com hepatite C, a frequência do genótipo TNF- α GG foi de 82%, enquanto no grupo controle foi de 77%. Com relação ao genótipo TNF- α – 308 GA foi de 23% e no grupo controle foi 14%. O genótipo TNF- α - 308 AA não foi detectado no grupo de pacientes com hepatite C, enquanto que no grupo controle representou 4%.

Jeng *et al.*, (2007) relataram que o alelo TNF- α -308 A está associado significativamente com fibrose hepática. Ho *et al.*, (2004) e Akkız *et al.*, (2009) demonstram que o alelo TNF- α – 308 A está associado com o risco aumentado de desenvolver cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Assim também como Chuang *et al.*, (2004) e Radwan *et al.*, (2012) demonstram que em paciente com as doenças citadas anteriormente, a frequência dos genótipos GA e AA foi significativamente maior do que nos indivíduos controle, e que o aumento da produção de TNF- α sérico foi observado em indivíduos com o genótipo AA. Isso pode sugerir que o polimorfismo TNF- α -308 G/A está diretamente relacionada à essas patologias por estimular maior produção de TNF- α .

A inflamação crônica combinada com a alta produção de TNF- α pode aumentar o risco de desenvolver carcinoma hepatocelular, o que indica que os indivíduos portadores do alelo A podem ser suscetíveis ao desenvolvimento destas complicações. Porém, em uma análise associando o polimorfismo de TNF- α – 308 G/A e características clínicas não houve diferenças significantes entre a distribuição dos genótipos ou frequência alélica entre os

pacientes, indicando que embora o polimorfismo possa contribuir na ocorrência e desenvolvimento de cirrose e carcinoma hepatocelular em pacientes com infecção crônica, isto pouco influencia na progressão do carcinoma hepatocelular, cujo desenvolvimento depende de vários fatores genéticos e ambientais (Radwan *et al.*, 2012).

Nos estudos realizados por Dogra *et al.*, (2011) foi demonstrado que a frequência do genótipo GG foi maior em indivíduos com hepatite C que responderam a terapia com IFN peguilado, do que naqueles pacientes que não responderam ao tratamento. Dai *et al.* (2006) mostraram que o alelo A pode ser um preditor independente na falha da terapia antiviral em pacientes com hepatite C, particularmente naquele com genótipo 1b. Pasha *et al.*, (2013) encontraram significativa associação do alelo A em pacientes com hepatite C e que não responderam ao tratamento, demonstrando que os genótipos GA e AA parecem afetar a produção de TNF- α e podem estar associados com a suscetibilidade a infecção pelo VHC e resistência a terapia antiviral.

Neste estudo não foi observada diferenças na produção séricas de TNF- α entre os diferentes genótipos GA e GG encontrados nos pacientes com hepatite C, assim também como não foi observada diferenças na produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ , com exceção da IL-10 que mostrou-se aumentada significativamente em indivíduos com genótipo GG.

Estudos realizados por Yee *et al.*, (2001), Donaldson *et al.*, (2002) relataram que o genótipo GG não contribui para a eliminação do VHC. Em contraste, Hohler *et al.* (1998) e Vidigal *et al.*, (2002) não encontraram diferenças na frequência dos genótipos TNF- α -308 G/A em pacientes infectados cronicamente. Além disso, Yee *et al.* (2000) e Yu *et al.* (2003) não demonstraram nenhuma associação entre variantes da região promotora de TNF- α -308 e resposta na terapia com IFN. Kusumoto *et al.* (2006) não detectaram nenhuma associação do polimorfismo de TNF- α com a eliminação do VHC. Pereira *et al.*, (2008) não demonstraram correlação entre o polimorfismo de TNF- α e suscetibilidade a infecção pelo VHC.

Talaat *et al.*, (2012) relataram que o polimorfismo de TNF- α – 308 não está associado com características clínicas da infecção, sugerindo que o polimorfismo pode não ser um fator genético do hospedeiro associado com a severidade da infecção pelo VHC, mas pode ser um fator de risco independente para o carcinoma hepatocelular.

Em conclusão, sugerimos que o polimorfismo de TNF- α , pode não ser suficiente para predizer a produção desta citocina sérica. Para tanto seria necessário uma associação com outros fatores genéticos do indivíduo, até mesmo, polimorfismos em outras citocinas, pois, essa associação poderia conduzir o curso da infecção pelo VHC por influenciar a produção de citocinas séricas e interferir na evolução da hepatite C.

————— *Conclusão* ———

CONCLUSÃO

- A porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com hepatite C equiparou-se ao encontrado em indivíduos saudáveis, sugerindo que possivelmente estas células estejam migrando para o fígado, local da infecção.
- O aumento de linfócitos T regs no sangue periférico de pacientes com hepatite C indica uma resposta regulatória, o que poderia estar relacionado com a o percentual de dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ encontrados no sangue durante esta avaliação.
- Os linfócitos T CD8⁺ encontram-se em maior porcentagem no tecido hepático do que no sangue periférico corroborando a nossa hipótese de que estas células estejam migrando para o local da infecção.
- Os dados demonstraram um padrão misto de liberação de citocinas no sangue, tanto pro-inflamatórias, como anti-inflamatórias e reguladoras.
- O aumento de IL-10 em pacientes com padrão de fibrose hepática $\leq$ F2 sugere um efeito protetor desta citocina nas lesões hepáticas induzidas pela resposta imune.
- A frequência do polimorfismo de TNF- α – 308 foi semelhante a outros estudos e mostrou maior prevalência de indivíduos homozigotos. No entanto, um número amostral maior seria necessário para resultados conclusivos.

Referências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abayli, B; Canataroglu, A; Akkiz H. **Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection.** Turk J Gastroenterol. 14:7–11, 2003.
- Abraham, LJ; French, MA; Dawkins, RL. **Polymorphic MHC ancestral haplotypes affect the activity of tumour necrosis factor-alpha.** Clin Exp Immunol. 92: 14–18, 1993.
- 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. 66:562–6, 1999.
- Acton, S; Rigotti, A; Landschulz Kt, Xu S, Hobbs Hh, **Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor.** Science. 271:518-520, 1996.
- Afdhal, NH & Nunes, D. **Evaluation of liver fibrosis: a concise review.** Am j Gastroenterol. 99:1160-1174, 2004.
- Akkız, H; Bayram, S; Bekar, A; Ozdil, B; Akgollu, E; Sumbu, AT; et al. **G-308A TNF-a polymorphism is associated with an increased risk of hepatocellular carcinoma in the Turkish population: case-control study.** Cancer Epidemiol. 33:261–4, 2009.
- Alatrakchi, N & Koziel M. **Regulatory T cells and viral liver disease.** J Viral Hepat. 16: 223–229, 2009.
- Alter, M. J. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** World J Gastroenterol. 17: 2436-41, 2007.
- Alvisi, G; Madan, V; Bartenschlager, R. **Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection.** RNA Biol. 8:258–269., 2011.
- Anderson, GM; Nakada, MT; DeWitte, M. **Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer.** Curr Opin Pharmacol 4:314–20, 2004.
- Appay, V; Dunbar, PR; Callan, M; et al. **Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections.** Nat Med. 8:379–85, 2002.
- Araújo, AR; Almeida, CM; Fraporti, L; et al. **Caracterização do vírus da hepatite C em pacientes com hepatite crônica: genótipos no Estado do Amazonas, Brasil.** Rev Soc Bras Med Trop. 44: 638-640, 2011.
- Aroucha, DC; do Carmo, RF; Moura, P; Silva, JL; Vasconcelos, LR; Cavalcanti, MS. **High tumor necrosis factor-a/interleukin-10 ratio is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.** Cytokine 62: 421–425, 2013.

- Ashfaq, U; Javed, T; Rehman, S; et al. **An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses.** Virol J. 8: 161, 2011.
 - Balasubramanian, SP; Brown, NJ; Reed, MWR. **Role of genetic polymorphisms in tumour angiogenesis.** Br J Cancer. 87:1057–65, 2002.
- Bedossa P, Poynard T. **An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group.** Hepatology.24:289–93, 1996.
- Belkaid Y. **Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity.** Nat Rev Immunol. 7: 875–888, 2007.
 - Blanchard, E. Belouzard, S; Goueslain, L; Wakita, T; Dubuisson, J; Wychowski, C; et al. **Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis.** J Virol. 80: 6964–6972, 2006.
 - Boulestin, A; Sandres-Sauné, K; Payen, JL; et al. **Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon- α .** J Med Virol. 68: 221-228, 2002.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico: hepatites virais.** Brasília: Ministério da Saúde, 2011
 - Butcher, EC; Williams, M; Youngman, K; Rott, L; Briskin, M. **Lymphocyte trafficking and regional immunity.** Adv Immunol.72: 209–253, 1999.
 - Cabrera, R; Tu, Z; Xu, Y; Firpi, RJ; Rosen, HR; Liu, C; Nelson, DR. **An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection.** Hepatology. 40: 1062-71, 2004.
 - Cacciarelli, TV; Martinez, OM; Gish, RG; Villanueva, JC; Krams, SM. **Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa.** Hepatology. 24: 6-9, 1996.
 - Carrasco, YR & Batista, FD. **B-cell activation by membrane-bound antigens is facilitated by the interaction of VLA-4 with VCAM-1.** EMBO J. 25, 889–899, 2006.
 - Chang, WK & Kyong, MC. **Hepatitis C virus: virology and life cycle. Clinical and Molecular.** Hepatology.19:17-25, 2013.
 - Chen, TY; Hsieh, YS; Wu, TT; Yang, SF; Wu, CJ; Tsay, GJ; et al. **Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection.** Transl Res. 150:116-21, 2007.

- Chigaev, A & Sklar, LA. **Aspects of VLA-4 and LFA- 1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion.** Frontier in immunology. 3: 242, 2012.
- Chuang, E; Del Vecchio, A; Smolinski, S; Song, XY; Sarisky, RT. **Biomedicines to reduce inflammation but not viral load in chronic HCV: what's the sense?.** Trends Biotechnol. 22:517–23, 2004.
- Claassen, MA; de Knecht, RJ; Tilanus, HW; Janssen, HL; Boonstra, A. **Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis.** J Hepatol. 52:315–21, 2010.
- Coulon, S; Heindryckx, F; Geerts, A; et al. **Angiogenesis in chronic liver disease and its complications.** Liver international, 146- 162, 2010.
- Cox, AL; Mosbruger, T; Lauer, GM; Pardoll, D; Thomas, DL; Ray, SC. **Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C.** Hepatology. 42: 104–112, 2005.
- Crispe, IN; Dao, T; Klugewitz, K; Mehal, WZ; Metz, DP. **The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field.** Immunol Rev. 174: 47-62 2000.
- Curtsinger, JM; Lins, DC; Johnson, CM; Mescher, MF. **Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytotoxicity.** J Immunol. 175:4392–9, 2005.
- Dai, CY; Chuang, WL; Chang, WY; Chen, SC; Lee, LP; Hsieh, MY; et al. **Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism at position 308 predicts response to combination therapy in hepatitis C virus infection.** J Infect Dis. 193: 98–101, 2006.
- Davey, PC; Zuzel, M; Kamiguti, AS; Hunt, JA; Aziz KA. **Activation-dependent proteolytic degradation of polymorphonuclear CD11b.** Br J Haematol. 111:934–942, 2000.
- Diamond, MS; Staunton, DE; de Fougères, AR; Stacker, AS; Garcia-Aguilar, J; Hibbs, ML; Springer, TA. **ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18).** J Cell Biol. 111:3129–3139, 1990.
- Dogra, G; Chakravarti, A; Kar, P; Chawla, Y. **Polymorphism of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene promoter region in chronic hepatitis C virus patients and their effect on pegylated interferon- α therapy response.** Human Immunol. 72:935–9, 2011.
- Donaldson, PT; Clare, M; Constantini, PK; Hadzic, N; Mieli-Vergani, G; Howard E; et al. **HLA and cytokine gene polymorphisms in biliary atresia.** Liver 22: 213-9, 2002.
- Dong, Y; Zhang, HF; Chen, H; Yang, XJ; Li, J; Shu, CL; Cheng, Y. **The cytokine secretion of peripheral blood mononucleocytes from patients infected with HCV[Abstract].** Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 20:331-333, 2004.

- Dong, Y; Zhang, HF; Chen, H; Li, J; Yang, XJ; Zhu, SS; Cheng, Y. **Level of the cytokine secreted by periferal blood mononuclear cells in patients with chronic hepatitis C before antiviral therapy** [Abstract]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 22: 364-6, 2008.
- Doucey, MA; Legler, DF; Faroudi, M; Boucheron, N; Baumgaertner, P; Naeher, D; Cebecauer, M; Hudrisier, D; Ruegg, C; Palmer, E; et al. **The beta1 and beta3 integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation**. *J. Biol. Chem.* 278: 26983–26991, 2003.
- Drummer, H E; Maerz, A; Pountourios, P. **Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins**. *FEBS Letters*. 546: 385-390, 2003.
- Dutton, RW; Bradley, LM; Swain, SL. **T cell memory**. *Annu Rev Immunol*. 16:201–23, 1998.
- Egger, D; Wolk, B; Gosert, R; Bianchi, L; Blum, HE; Moradpour, D; et al. **Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex**. *J Virol*. 76:5974–5984, 2002.
- El-hage, N & Luo, G. **Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA**. *Journal of General Virology*. 84: 2761-2769, 2003.
- Evans, MJ; Von Hahn, T; Tscherne, DM; Syder, AJ; Panis, M; et al. **Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry**. *Nature*. 446: 801–805, 2007.
- Fan X, Liu W, Li C. **Determination of serum cytokines in individuals with HCV infection**. [Abstract] *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*. 14:145-7, 2000.
- Fishman, SL & Branch, AD. **The quasispecies nature and biological implications of the hepatitis C virus**. *Infect Genet Evol*. 9:1158-1167, 2009.
- Foster, TL; Gallay, P; Stonehouse, NJ; Harris, M. **Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner**. *J Virol*. 85:7460–7464, 2011.
- Fried, MW; Shiffman, ML; Reddy, KR; Smith, C; Marinos, G; Gonçalves, FL; et al. **Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection**. *N Engl J Med*. 347:975–982, 2002.
- Gahmberg, CG. **Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules**. *Curr Opin Cell Biol*. 9:643–650, 1997.

- Gerlach, JT; Diepolder, HM; Jung, MC; et al. **Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T- cell response in acute hepatitis C.** Gastroenterology. 117:933–41, 1999.
- Gerlach, JT; Diepolder, HM; Zachoval, R; et al. **Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance.** Gastroenterology. 125: 80-88, 2003.
- Ghosh, S; Goldin, E; Gordon, FH; Malchow, HA; Rask-Madsen, J; Rutgeerts, P; Vyhnaek, P; Zadorova, Z; Palmer, T; Donoghue, S. **Natalizumab for active Crohn's disease.** N Engl J Med. 348:24–32, 2003.
- Gigi, E; Raptopoulou-gigi, M; Kalogeridis, A; et al. **Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1–TH2 cytokine profile in subjects with self-limited disease.** J Viral Hepat. 15: 145-154, 2008.
- Gitto, S; Micco, L; Conti, F; Andreone, P; Bernardi, M. **Alcohol and viral hepatitis: a mini review.** Dig Liver Dis. 41: 67Y70, 2009.
- Goffard, A; Callens, N; Bartosch, B; et al. **Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins.** J Virol. 79: 8400-8409, 2005.
- Gonzalez-Amaro, R; Mittelbrunn, M; Sanchez-Madrid, F. **Therapeutic anti-integrin (alpha4 and alphaL) monoclonal antibodies: two-edged swords?** Immunology. 116: 289–296, 2005.
- Gosert, R; Egger, D; Lohmann, V; Bartenschlager, R; Blum, HE; Bienz, K; et al. **Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons.** J Virol. 77: 5487–5492, 2003.
- Grabowska, AM; Lechner, F; Klenerman, P; Tighe, PJ; Ryder, S; Ball, JK; et al. **Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection.** Eur. J Immunol. 31:2388 –2394, 2001.
- Grakoui, A; Shoukry, NH; Woollard, DJ; Han, JH; Hanson, HL; Ghayeb, J; Murthy, KK; Rice, CM; Walker, CM. **HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help.** Science. 302: 659–662, 2003.
- Gruener, NH; Lechner, F; Jung, MC; Diepolder, H; Gerlach, T; Lauer G; et al. **Sustained dysfunction of antiviral CD8 T lymphocytes after infection with hepatitis c virus.** J Virol. 75:5550-5558, 2001.
- Grünhage, F & Nattermann, J. **Viral hepatitis: human genes that limit infection.** Best Practice Res Clin Gastroenterol 24: 709–23, 2010.

- Guidotti, LG & Chisari, FV. **Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response.** Annu Rev Immunol. 19:65– 91, 2001.
- Guidotti, LG & Chisari, FV. **Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis.** Annu Rev Pathol. 1:23-61, 2006.
- Hajarizadeh, B; Grebely, J; Dore, GJ. **Epidemiology and natural history of HCV infection.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Jul 2.
- Hajeer, AH & Hutchinson IV. **TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications.** Microsc Res Technol. 50:216–28, 2000.
- Harris, HJ; Davis, C; Mullins, J.G; Hu, K; Goodall, M; Farquhar, M.J; Mee, CJ; McCaffrey, K; Young, S; Drummer, H; et al. **Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry.** J. Biol. Chem. 285: 21092–21102, 2010.
- Hiroishi, K; Eguchi, J; Ishii, S; et al. **Immune Response of Cytotoxic T Lymphocytes and Possibility of Vaccine Development for Hepatitis C Virus Infection.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010, 2010.
- Hiroishi, K; Ito, T; Imawari, M. **Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence.** J Gastroenterol Hepatol. 23: 1473-1482, 2008.
- Ho, SY; Wang, YJ; Chen, HL; Chen, CH; Chang, CJ; Wang, PJ; et al. **Increased risk of developing hepatocellular carcinoma associated with carriage of the TNF2 allele of the -308 tumor necrosis factor- α promoter gene.** Cancer Causes and Control 15:657–63, 2004.
- Hofmann, SR; Ettinger, R; Zhou, YJ; Gadina, M; Lipsky, P; Siegel, R; Candotti, F; O'Shea JJ. **Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis.** Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2:495-506, 2002.
- Hohler, T; Kruger, A; Gerken, G; Schneider, PM; Meyer, KH; Rittner C. **Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism at position 2238 is associated with chronic active hepatitis C infection.** J Med Virol. 4:173–7, 1998.
- Hyun, YM; Lefort, C; Kim, M. **Leukocyte integrins and their ligand interactions.** Immunologic Research. 45: 195-208, 2009.
- Imai,Y; Shimaoka, M; Kurokawa, M. **Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system.** Int.J. Hematol. 91: 569–575, 2010.
- Jacobson, IM; McHutchison, JG; Dusheiko, G; Di Bisceglie, AM; Reddy, KR; Bzowej, NH; et al. **Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection.** N Engl J Med. 364: 2405–2416, 2011.

- Jang, JY & Chung, RT. **Chronic Hepatitis C.** Gut Liver. 5: 117-132, 2011.
- Jeng, JE; Tsaiz, JF; Chuangb, LY; Ho, MS; Linz, ZY; Hsiehz, MY; et al. **Tumor necrosis factor- α 308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma.** Neoplasia. 9:987–92, 2007.
- Kadioglu, A; DeFilippo, K; Bangert, M; Fernandes, VE; Richards, L; Jones, K; Andrew, PW; Hogg, N. **The integrins Mac-1 and α 4-beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection.** J. Immunol. 186: 5907–5915, 2011.
- Kaplan, DE; Sugimoto, K; Newton, K; Valiga, ME; Ikeda, F; Aytaman, A; Nunes, FA; Lucey, MR; Vance, BA; Vonderheide, RH; Reddy, KR; McKeating, JA; Chang KM. **Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C.** Gastroenterology. 132: 654–666, 2007.
- Kato, N; Yoshida, H; Ono-Nita, SK; Kato, J; Goto, T; Otsuka, M; Lan, K; Matsushima, K; Shiratori, Y; Omata, M. **Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C viral core is the most potent signal inducer.** Hepatology. 32:405-12, 2000
- Kusumoto, K; Uto, H; Hayashi, K; Takahama, Y; Nakao, H; Suruki, R; et al. **Interleukin-10 or tumor necrosis factor- α polymorphisms and the natural course of hepatitis C virus infection in a hyperendemic area of Japan.** Cytokine. 34:24–31, 2006.
- Laberge, S; Rabb, H; Issekutz, TB; Martin, JG. **Role of VLA-4 and LFA-1 in allergen-induced airway hyperresponsiveness and lung inflammation in the rat.** Am J Respir Crit Care Med. 151:822–829, 1995.
- Laffon, A; Garcia-Vicuna, R; Humbria, A; Postigo, AA; Corbi, AL; Landazuri, MO; Sanchez- Madrid, F. **Upregulated expression and function of VLA-4 fibronectin receptors on human activated T cells in rheumatoid arthritis.** J Clin Invest. 88:546–552, 1991.
- Lauer, GM & Walker, BD. **Hepatitis C virus infection.** N Engl J Med. 345:41–52, 2001.
- Lavanchy, D. **Evolving epidemiology of hepatitis C virus.** Clin Microbiol Infec. 17:107–15, 2011.
- Lebwohl, M; Tying, SK; Hamilton, TK; Toth, D; Glazer ,S; Tawfik, NH; Walicke, P; Dummer ,W; Wang, X; Garovoy, MR; Pariser, D. **A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis.** N Engl J Med. 349:2004–2013, 2003.
- Lechner, F; Wong, DK; Dunbar, PR; Chapman, R; Chung, RT; Dohrenwend, P; Robbins, G; et al. **Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus.** J Exp Med.191:1499-1512, 2000.

- Leibovich, SJ; Polverini, PJ; Shepard, HM; Wiseman, DM; Shively, V; Nuseir, N. **Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor alpha.** *Nature.* 329:630–2, 1987.
- Ley, K; Laudanna, C; Cybulsky, M; et al. **Getting To The Site Of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated.** *Nat Rev Immunol.* 9: 678-689, 2007.
- Lindenbach, B.D; Rice, C.M. **Flaviviridae: The viruses and their replication.** In *Fields virology*. D. Knipe, et al., editors. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Pennsylvania, USA, 2001. 991–1041
- Lobb, RR; Hemler, ME. **The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo.** *J Clin Invest.* 94:1722–1728, 1994.
- Louis, H; Le, MO; Peny, MO; Quertinmont, E; Fokan, D; Goldman, M; et al. **Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice.** *Hepatology.* 25:1382–9, 1997.
- Lucas, M; Vargas-Cuero, AL; Lauer, GM; Barnes, E; Willberg, CB; Semmo, N; Walker, BD; et al. **Pervasive influence of hepatitis C virus on the phenotype of antiviral CD8 T cells.** *J Immunol.* 172:1744-1753, 2004.
- Luiza-Silva, M; Campi-Azevedo, AC; Batista, MA; Martins, MA; Avelar, RS; Da Silveira Lemos, D; et al. **Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.** *J Infect Dis.* 204:873–83, 2011.
- Luo, BH; Carman, CV; Springer, TA. **Structural basis of integrin regulation and signaling.** *Annu Rev Immunol.* 25:619–647, 2007.
- Luster, AD; Alon, R; von Andrian, UH. **Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets.** *Nat Immunol.* 6:1182–1190, 2005.
- Manigold, T & Racanelli, V. **T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies.** *The Lancet Infectious Diseases.* 12: 804-813, 2007.
- Manns, MP; McHutchison, JG; Gordon, SC; et al. **Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial.** *Lancet.* 358:958–965, 2001.
- Mc Farland, HI; Nahill, SR; Maciaszek, JW; Welsh, RM. **CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection.** *J Immunol.* 149:1326–1333, 1992.
- Medzhitov R. **Origin and physiological roles of inflammation.** *Nature.* 454: 428–435, 2008.

- Medzhitov R. **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** Nature. 449: 819–826, 2007.
- Mege, JL; Meghari, S; Honstettre, A; Capo, C; Raoult, D. **Two faces of interleukin 10 in human infectious diseases.** Lancet Infect Dis. 6:557–69, 2006.
- Meredith, LW; Wilson, GK; Fletcher, NF; Mckeating, JA. **Hepatitis C virus entry: beyond receptors.** Rev Med Virol. 22:182-193, 2012.
- Miller, LJ; Bainton, DF; Borregaard, N; Springer, TA. **Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface.** J Clin Invest. 80:535–544, 1987.
- Miller, K; McArdle, S; Gale, MJ; Geller, DA; Tenoever, B; Hiscott, J; Gretch, DR; Polyak, SJ. **Effects of the hepatitis C virus core protein on innate cellular defense pathways.** J Interferon Cytokine Res. 24: 391-402, 2004.
- Miyazoe, S; Hamasaki, K; Nakata, K; Kajiya, Y; Kitajima, K; Nakao, K; et al. **Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus.** Am J Gastroenterol. 97:2086–92, 2002.
- Miyaaki, H; et al. **Study of liver-targeted regulatory T cells in hepatitis B and C virus in chronically infected patients.** Liver Int. 29:702–707, 2009.
- Mondelli, MU & Silini, E. **Clinical significance of hepatitis C virus genotypes.** J Hepatol. 31:65-70, 1999.
- Moradpour, D; Penin, F; Rice, CM. **Replication of Hepatitis C virus.** Nature. 5: 453-63, 2007.
- Nelson, DR; Lauwers, GY; Lau, JY; Davis, GL. **Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders.** Gastroenterology. 118:655–60, 2000.
- Neumann-Haefelin, C; Spangenberg, HC; Blum, HE; Thimme, R. **Host and viral factors contributing to CD8+ T cell failure in hepatitis C virus infection.** World J Gastroenterol. 13: 4839–4847, 2007.
- National Institutes of Health (NIH). **Gerenciamento da hepatite C.** 10-12, 2002
- Nguyen, MH; Keeffe, EB. **Chronic hepatitis C: genotypes 4 to 9.** Clin Liver Dis. 9:411-426, 2005.
- Noda, K; Nakao, S; Ishida, S; et al. **Leukocyte AdhesionMolecules in Diabetic Retinopathy.** Journal of Ophthalmology. 2012: 1- 6, 2012.

- Pasha, HF; Radwan, MI; Hagrass, HA; Tantawy, EA; Emara, MH. **Cytokines genes polymorphisms in chronic hepatitis C: Impact on susceptibility to infection and response to therapy.** Cytokine 61: 478–484, 2013.
- Pawlotsky, JM. **Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease.** Trends Microbiol.12:96-102, 2004.
- Pereira, FA; Pinheiro, NN; Rodart, IF; Carmo, TM; Lemaire, DC; Reis, MG. **Association of TGF- β 1 Codon 25 (G915C) polymorphism with hepatitis C virus infection.** J Med Virol. 80:58–64, 2008.
- Perrey, C; Pravica, V; Sinnott, PJ; et al. **Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report.** Transpl Immunol. 6: 193–197, 1998.
- Phillipson, M; Heit, B; Colarusso, P; Liu, L; Ballantyne, CM; Kubes, P. **Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade.** J Exp Med. 203:2569–2575, 2006.
- Ploss, A; Evans, M. J; Gaysinskaya, VA; et al. **Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells.** Nature. 7231: 882-886, 2009.
- Poordad, F; McCone, J; Bacon, BR; Bruno, S; Manns, MP; Sulkowski, MS; et al. **Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection.** N Engl J Med. 364:1195–1206, 2011.
- Radwan, MI; Pasha, HF; Mohamed, RH; Hussien, HI; 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 60: 271–276, 2012.
- Rauch, A; Kutalik, Z; Descombes, P; et al. **Genetic variation in *IL28b* is associated with chronic hepatitis c and Treatment failure: a genome-wide association study.** Gastroenterology. 138:1338–1345, 2010.
- Rehermann, B. **Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence.** The Journal of Clinical Investigation. 119: 1745-1754, 2009.
- Reiser, M; Marousis, CG; Nelson, DR; Lauer, G; Gonzalez-Peralta, RP; Davis GL; et al. **Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection.** J Hepatol. 26:471-8, 1997.
- Rose, DM; Alon, R; Ginsberg, MH. **Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration.** Immunological Reviews. 218: 126–134, 2007.

- Rosen, HR; Mchutchison, JG; Conrad, AJ; Lentz, JJ; Gail, M; Rose, SL; et al. **Tumor necrosis factor genetic polymorphisms and response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C.** *Am J Gastroenterol.* 97:714–20, 2002.
- Rouse, BT; Sarangi, PP; Suvas, S. **Regulatory T cells in virus infections.** *Immunol Rev.* 212:272–286, 2006.
- Sakaki, M; Hiroishi, K; Baba, T; Ito, T; Hirayama, Y; Saito, K; Tonoike, T; Kushima, M; Imawari, M; et al. **Intrahepatic status of regulatory T cells in autoimmune liver diseases and chronic viral hepatitis.** *Hepatol. Res.* 38:354–361, 2008.
- Scarselli, E.; Ansuini, H.; Cerino, R; et al. **The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus.** *EMBO J.* 21: 5017-5025, 2002.
- Schulze, ZWJ; Ciuffreda, D; Lewis-Ximenez L; et al. **Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence.** *J Exp Med.* 209: 61–75, 2012.
- Semmo, N & Klennerman, P. **CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection.** *World J Gastroenterol.* 13: 4831-4838, 2007.
- Shepard, CW; Finelli, L; Alter, MJ. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infect Dis.* 5: 558–567, 2005.
- Shevach, EM. **CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers.** *Nat Rev Immunol.* 2: 389–400, 2002.
- Shimaoka, M & Springer, TA. **Therapeutic antagonists and the conformational regulation of integrin structure and function.** *Nat Rev Drug Disc.* 2: 703–716, 2003.
- Shoukry, NH; Grakoui, A; Houghton, M; et al. **Memory CD8 T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection.** *J Exp Med.* 197: 1645–1655, 2003.
- Simmons DL. **Anti-adhesion therapies.** *Curr Opin Pharmacol.* 5:398–404, 2005.
- Sobue, S; Nomura, T; Ishikawa, T; Ito, S; Saso, K; Ohara, H; et al. **Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection.** *J Gastroenterol.* 36:544-51, 2001.
- Sofian, M; Aghakhani, A; Farazi, AA; Banifazl, M; Eslamifar, A; Rashidi, N; Sadegh, AK; Ramezani, A. **Serum Profile of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines in Hepatitis C Virus Infected Patients.** *Hepatitis Monthly. Hepat Mon.* 2012;12:e6156.
- Spaan, M; Harry, LA; Boonstra, A. **Immunology of hepatitis C virus infections.** *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 26: 391–400, 2012.

- Spanakis, NE; Garinis, GA; Alexopoulos, EC; Patrinos, GP; Menounos, PG; Sklavounou A; Manolis, EN; Gorgoulis, VG; Valis D. **Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection.** J Clin Lab Anal. 16:40-6, 2002.
- Spangenberg, HC; Viazov, S; Kersting, N; Neumann-Haefelin, C; McKinney, D; Roggendorf, M; et al. **Intrahepatic CD8 T-Cell Failure During Chronic Hepatitis C Virus Infection.** Hepatology. 42:828-837, 2005.
- Springer, TA. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multi-step paradigm.** Cell. 76:301–314, 1994.
- Steinbrink, K; Wolfl, M; Jonuleit, H; Knop, J; Enk, AH. **Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.** J Immunol. 10: 4772–4780, 1997.
- Sturm, N; Thélou, MA; Camous, X; et al. **Characterization and role of intra-hepatic regulatory T cells in chronic hepatitis C pathogenesis.** J Hepatol. 53: 25-35, 2010.
- Sugimoto, K; Ikeda, F; Stadanlick, J; Nunes, FA; Alter, HJ; Chang, KM. **Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection.** Hepatology 38:1437-1448, 2003.
- Talaat, RM; Esmail, AA; Elwakil, R; Gurgis, AA; Nasr, MI. **Tumor necrosis factor alpha-308G/A polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis C virus-infected patients.** Chin J Cancer. 31:29–35, 2012.
- Tambur, AR; Ortegel, JW; Ben-Ari Z; et al. **Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients.** Transplantation. 71: 1475–1480, 2001.
- Taylor, A; Akdis, M; Joss, A; et al. **IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1.** J Allergy Clin Immunol. 120: 76–83, 2007.
- Taylor, DR; Shi, ST; Romano, PR; Barber, GN; Lai, MM. **Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein.** Science. 285:107–110, 1999.
- Thimme, R; Oldach, D; Chang, KM; Steiger, C; Ray, SC; Chisari, FV. **Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection.** J Exp Med. 194:1395-1406, 2001.
- Thomas, DL; Thio, CL; Martin, MP; et al. **Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus.** Nature. 461: 798-801, 2009.
- Thompson, K; Maltby, J; Fallowfield, J; Mcaulay, M; Millward-Sadler, H; Sheron, N. **Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis.** Hepatology. 28:1597–606, 1998.

- Torres, KL; Malheiro, A; Tatenno, A; Lima, TA; Maia, LPV; Pimentel, JPD; et al. **Hepatitis C vírus in blood donors, Brazil.** *Emerg Infect Dis.* 15:676-678, 2009.
- Tscherne, DM; Jones, CT; Evans, MJ; Lindenbach, BD; McKeating, JA; Rice CM. **Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry.** *J Virol.* 80:1734–1741, 2006.
- Udagawa, T; Woodside, DG; McIntyre, BW. **Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation.** *J. Immunol.* 157: 1965–1972, 1996.
- Ulyanova, T; Priestley, GV; Banerjee, ER; Papayannopoulou, T. **Unique and redundant roles of alpha4 and beta2 integrins in kinetics of recruitment of lymphoid vs myeloid cell subsets to the inflamed peritoneum revealed by studies of genetically deficient mice.** *Exp Hematol.* 35:1256–1265, 2007.
- Urbani, S; Amadei, B; Fisicaro, P; Tola, D; Orlandini, A; Sacchelli, L; Mori, C; Missale, G, Ferrari, C. **Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses.** *Hepatology.* 44: 126–139, 2006.
- Varga, G; Balkow, S; Wild, MK; Stadtbaeumer A, Krummen M, Rothoeft T; et al. **Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation.** *Blood.* 109:661-669, 2007.
- Vedder, NB & Harlan, JM. **Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium.** *J Clin Invest.* 81:676–682, 1988.
- Vidigal, PG; Germer, JJ; Zein, NN. **Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor-beta1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin.** *J Hepatol.* 36:271–7, 2002.
- Walker, CM. **Adaptive immunity to the hepatitis C virus.** *Adv Virus Res.* 78: 43–86, 2010.
- Wang, J; Holmes, TH; Cheung, R; Greenberg, HB; He, X-S. **Expression of chemokine receptors on intrahepatic and peripheral lymphocytes in chronic hepatitis C infection: its relationship to liver inflammation.** *J Infect Dis.* 190:989–97, 2004.
- Wang, J; Holmes, TH; Guevara, LL; Cheung, R; Wright, TL; He, XS; Greenberg, HB. **Phenotypic and Functional Status of Intrahepatic T Cells in Chronic Hepatitis C.** *The Journal of Infectious Diseases.* 194:1068–77, 2006.
- Wang, QQ; Li, H; Oliver, T; Glogauer, M.; Guo, J; He, Y.W. **Integrin beta1 regulates phagosome maturation in macrophages through Rac expression.** *J. Immunol.* 180: 2419–2428, 2008.

- Wedemeyer, H; He, XS; Nascimbeni, M; Davis, AR; Greenberg, HB; Hoofnagle, JH; et al. **Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8_T cells in chronic hepatitis C virus infection.** J Immunol. 169: 3447-3458, 2002.
- Wick, G; Grundtman, C; Mayerl, C; Florian, T; et al. **The Immunology of Fibrosis.** Annu. Rev. Immunol. 31:107–35, 2013.
- Wilson, AG; Giovine, FS; Blakemore, AI; Duff, GW. **Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product.** Hum Mol Genet. 1:353–9, 1992.
- Wilson, AG; Symons, JA; McDowell, TL; et al. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.** Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 3195–3199, 1997.
- Wilson, AG; Vries, N; Pociot, F; et al. **An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor a promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles.** J Exp Med. 177: 557–560, 1993.
- World Health Organization. Media centre: **Hepatitis C**, fact sheet N 164, june de 2011. Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acessado em 06 de dezembro de 2011.
- Wynn, TA. **Cellular and molecular mechanisms of fibrosis.** The Journal of Pathology. 214: 199-210, 2008.
- Yamaki, K; Uchida, H; Li, X; Yanagisawa, R; Takano, H; Hayashi, H; et al. **Effect of varying types of anti-arthritis drugs on Th1 and Th2 immune responses in mice.** Int J Immunopathol Pharmacol. 18:133-44, 2005.
- Yang, F; Robotham, JM; Nelson, HB; Irsigler, A; Kenworthy, R; Tang, H. **Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro.** J Virol. 82:5269–5278, 2008.
- Yednock, TA; Cannon, C; Fritz, LC; Sanchez-Madrid, F; Steinman, L; Karin, N. **Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin.** Nature. 356:63–6, 1992.
- Yee, LJ; Tang, J; Gibson, AW; Kimberly, R; Van Leeuwen, DJ; Richard, A; et al. **Interleukin 10 polymorphisms as predictors of sustained response in antiviral therapy for chronic hepatitis C infection.** Hepatology. 33:708–12, 2001.

- Yee, LJ; Tang, J; Herrera, J; Kaslow, RA; Van Leeuwen, DJ. **Tumor necrosis factor gene polymorphisms in patients with cirrhosis from chronic hepatitis C virus infection.** Genes Immun. 1:386–90, 2000.
- Young, MH; Craig, TL; Minsoo, Kim. **Leukocyte integrins and their ligand interactions.** Immunol Res. Author manuscript; available in PMC. 23, 2010
- Yu, ML; Dai, CY; Chiu, CC; Lee, LP; Lin, ZY; Chen, SC; et al. **Tumor necrosis factor promoter polymorphisms at position 308 in Taiwanese chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha.** Antiviral Res. 59:35–40, 2003.
- Zeuzem, S; Andreone, P; Pol, S; Lawitz, E; Diago, M; Roberts, S; et al. **Telaprevir for retreatment of HCV infection.** N Engl J Med. 364:2417–2428, 2011.
- Zhang, LJ & Wang X,Z. **Interleukin-10 and chronic liver disease.** World J Gastroenterol. 12:1681–168520, 2006.
- Zhang, L; Miao, L; Han, F; Dou, XG. **Cytokine levels in serum of patients with chronic hepatitis C and its significance** [abstract]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 27: 301-3, 2011.
- Zhu, H; Zhao, H; Collins, CD; Eckerrode, SE; Ruan, Q; et al. **Gene expression associated with interferon alfa antiviral activity in an HCV replicon cell line.** Hepatology. 37: 1180–1188, 2003.
- Zhu, J & Paul, WE. **Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors.** Immunol Rev. 238: 247–62, 2010.
- Zhu, N; Khoshnan, A; Schneider, R; Matsumoto, M; Dennert, G; Ware, C; Lai, MM. **Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis.** J Virol. 72 :3691-7, 1998.
- Ziol, M; Handra, LA; Kettaneh, A; Christidis, C; Mal, F; Kazemi, F; et al. **Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C.** Hepatology. 41: 48- 54, 2005.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice 01: Termo de aprovação do comitê de ética



Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Av. Pedro Teixeira, 25 – Dom Pedro
Cep: 69040-000
Manaus – Amazonas - Brasil



APROVAÇÃO Nº 2002

Registro CEP Nº2339-09

CAAE – 0033.0.114.000-09

Processo Nº2339/2009-FMT-AM

Projeto de Pesquisa: Avaliação da angiogênese hepatocelular em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (VHC) portadores de Doenças Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA).

Pesquisador responsável: Flamir da Silva Victória

Instituição Sediadora: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas

Instituição Vinculada: Não se aplica

Área Temática Especial: Não se aplica

Patrocinador: FAPEAM

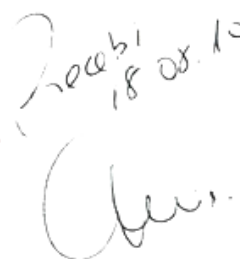
Registro para armazen. de mat. Biológico humano: Não se aplica

Ao se proceder à análise relativo do Projeto em questão, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-AM), em sessão ordinária do dia 11 de junho de 2010 e de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Situação do Protocolo: APROVADO

Manaus, 11 de junho de 2010.


Luiz Carlos de Lima Teixeira
Coordenador de Ética em Pesquisa
FMT-AM


18.08.10

Obs: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP, os relatórios parciais e finais sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10.10.1996, inciso IX. 2 letra "c") conforme o Formulário de acompanhamento dos Projetos aprovados no CEP, disponível em nossa home Page.

Apêndice 2: Termo de Consentimento Livre E Esclarecido (TCLE) dos pacientes com hepatite C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado para participar de um estudo que irá avaliar os efeitos provocados pelo vírus **da hepatite e pela gordura depositada nas células do seu fígado**, este estudo será conduzido na FMTAM, av pedro teixeira no 25, manaus am, fone 3238 17 11, tendo como investigador principal o médico **Flamir da Silva Victoria Fone (092) 998-20583, CRM AM 2166**.

As autoridades de saúde exigem que você tome conhecimento do propósito e possíveis riscos desta investigação. Pedimos que você lesse este formulário de consentimento completamente e faça todas as perguntas que você possa ter antes de concordar em participar deste estudo.

PROPÓSITO(S) DO ESTUDO:

Determinar o nível de funcionamento do seu fígado na presença de esteatohepatite (tipo de hepatite provocada por depósito de gordura nas células do seu fígado); Estudar os fatores risco para o desenvolvimento de alterações em outros órgãos; Avaliar as reações de defesa de seu organismo com esta forma de hepatite.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO:

Se você for um voluntário para este estudo, será solicitado durante as consultas que responda a perguntas sobre seu histórico médico e será feito um exame físico. Serão coletadas amostras de sangue de uma de suas veias do braço para confirmar a presença do vírus da hepatite B, C, D ou HIV em seu sangue. Outros testes de sangue também irão verificar como o seu fígado funcionando e como o seu organismo reage a este tipo de doença. Se você não estiver infectado por um destes vírus, estiver grávida, apresentar etnia indígena ou tiver menos que 18 anos ou mais que 65 anos não irá participar deste estudo ou apresentar cirrose descompensada. Você deverá ser submetido a um exame de ultrassom do fígado para verificar o tamanho e o aspecto do órgão.

NOVOS ACHADOS:

Você será informado sobre qualquer nova informação obtida durante o curso do estudo, que possa afetar a evolução da sua doença.

CONFIDENCIALIDADE:

Você tem o direito à privacidade. Todas as informações obtidas neste estudo que possam ser identificadas com o seu nome permanecerão de forma confidencial tanto quanto possível. Seu nome não será revelado em nenhum relatório ou publicação resultante deste estudo sem seu expresso consentimento. Os indivíduos envolvidos neste estudo e em seus cuidados médicos, monitores qualificados e autoridades de saúde podem inspecionar e copiar seus registros médicos quando apropriados e necessários.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir por não participar deste estudo. Uma vez que você decida por participar neste estudo, você pode retirar seu consentimento e finalizar sua participação a qualquer momento. Se você decidir por não participar ou se retirar a sua participação do estudo, você não será punido ou perderá quaisquer benefícios aos quais você tem direito. Isto não irá afetar seus cuidados médicos futuros.

DESCONTINUAÇÃO DO ESTUDO:

Seu médico, o responsável pelo estudo ou seu representante legal poderá finalizar a sua participação neste estudo a qualquer momento sem seu consentimento. Você será retirado do estudo caso você deixe de seguir as orientações para a participação no estudo.

COMPENSAÇÃO DE DANOS:

Se você vier a sofrer qualquer dano físico como resultado direto do estudo, você receberá todos os cuidados médicos providos pela Instituição na qual o estudo se realizou. A reparação de eventuais danos está disponível a você sem quaisquer compensações financeiras decorrentes do dano. Você não abrirá mão de seus direitos legais ao assinar o termo de consentimento informado.

DÚVIDAS:

Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa ou seus direitos como paciente de pesquisa durante ou após o estudo, você pode contatar o Dr Flamir da Silva Victoria no telefone (092) 9982-0583. Você pode também contatar o presidente do Comitê de Ética da FMTAM Dr Luis Carlos Lima Ferreira no telefone 3238-1711 (ramal 241).

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

Eu li neste formulário de consentimento. Tive a oportunidade de fazer todas as perguntas referentes a este estudo e minhas dúvidas foram respondidas. Os riscos e benefícios deste estudo foram explicados a mim. Concordo livremente em participar deste estudo. Eu receberei uma cópia deste acordo.

Paciente_____

Responsável _____

Sexo do paciente: Masculino () Feminino ();

Idade do paciente: _____anos;

RG (do paciente ou do responsável legal);_____CPF_____

Endereço_____

Cidade_____ Estado: AM

CEP_____ Fone_____

Assinatura do Paciente ou Representante Legal

Apêndice 3: Termo para a realização de biópsia hepática em pacientes com hepatite C

TERMO PARA A REALIZAÇÃO DE BIÓPSIA HEPÁTICA

O paciente abaixo identificado e firmado declara, para todos os efeitos legais, que foi informado de todas as contra-indicações, potenciais riscos e benefícios, e advertências relativas à indicação e contra-indicação da coleta da biópsia hepática.

O paciente abaixo identificado e firmado declara que foi informado pelo seu médico assistente **abaixo identificado e firmado** que apresenta evidências primárias de uma hepatopatia (doença hepática), porém, sem outros elementos de juízo (clínicos, laboratoriais, por diagnóstico de imagem) que permitam chegar a um diagnóstico adequado. Expressa, ainda, sua concordância e vontade em submeter-se ao procedimento cirúrgico (biópsia hepática) indicado e já referido, assumindo inteira responsabilidade e risco pelos eventuais efeitos indesejáveis que venham a ocorrer em decorrência do mesmo.

Assim declara que:

1. Foi claramente informado pelo seu médico assistente **abaixo identificado e firmado** que a indicação da biópsia hepática estaria explícita em um instrumento de diagnóstico, avaliação prognóstica e possível indicação e/ou monitorização terapêutica.

2. Foi claramente informado pelo seu médico assistente **abaixo identificado e firmado** que a realização de biópsia hepática apresenta as seguintes contra-indicações:

Concentração de protrombina inferior a 65%;

Plaquetas inferiores a 80.000;

Evidências de diversas diáteses hemorrágicas, previamente diagnosticadas;

Níveis de glicemia superior a 200 mg/dL;

Níveis de albumina sérica menor que 1,5 g/dL;

Empiema pleural direito ou abscesso sub-frênico;

Existência de cisto hidático, abscesso ou hemangiomas (tumor vascular) do fígado;

Processo séptico peritoneal;

Icterícia obstrutiva extra-hepática com colangite;

Falta de colaboração do paciente (psicoses, estados demenciais, excitação psicomotora);

Estados extremos de desnutrição ou caquexia;

Qualquer tipo insuficiência respiratória;

Impossibilidade de poder delimitar a maciez hepática.

3. Foi claramente informado pelo seu médico assistente **abaixo identificado** e firmado que será internado na Unidade Hospitalar da Fundação de Medicina Tropical, com os seguintes exames de rotina, realizados previamente (uma semana antes da biópsia):

- Bilirrubinas
- Glicemia
- Albumina
- TAP/RNI
- Hemograma
- Ultra-som hepático

4. Foi claramente informado pelo seu médico assistente abaixo identificado e firmado que antes (24 horas) da internação, vários exames laboratoriais serão realizados, para avaliação (prévia) do ato e risco cirúrgico:

5. Foi claramente informado pelo seu médico assistente abaixo identificado e firmado das possíveis complicações e que os acidentes devidos a biópsia hepática são raros. A mortalidade habitualmente é menor que 0,002%. As complicações mais freqüentes são:

- Dor no local da punção (25% dos casos);
- Sensação de queimação na pele em decorrência da solução anestésica;
- Sensação de queimação na pele em decorrência da solução anti-séptica;
- Dor epigástrica no ato inspiratório;
- Hemorragia, com aparecimento nas primeiras 24 horas, caracterizando-se por: dor abdominal espontânea ou na palpação, a princípio localizada no hipocôndrio direito, podendo estender-se para todo o abdome; quadro de abdome agudo cirúrgico; quadro de hipotensão (pressão baixa); choque (falência de alguns órgãos);
- Hemotórax (sangue na pleura) f) pneumotórax (ar no pulmão);
- Peritonite (infecção abdominal);
- Punção de outras vísceras, tipo intestino delgado ou grosso (pneumoperitônio);
- Reações desfavoráveis pos anestésicos.

6. Foi claramente informado pelo seu médico assistente abaixo identificado e firmado que a coleta da biópsia hepática no centro cirúrgico da Fundação de Medicina Tropical será da seguinte maneira e procedimentos:

- ☐ Jejum há 12 horas;

- ☐ Anestesia será local;
- ☐ Uma pequena quantidade (aproximadamente 15 mm) de tecido hepático será retirada de seu fígado por aspiração através de uma agulha, denominada de agulha de Menghini;
- ☐ Após a biópsia, será mantido repouso absoluto no leito cirúrgico 2 horas;
- ☐ Continuar o repouso absoluto no leito (domiciliar) por 24 horas;
- ☐ Manter repouso relativo no domicílio por 72 horas.
- ☐ O critério de alta do paciente deverá ser avaliado pelo médico assistente, sempre 72 horas pós-biópsia hepática, sempre que necessário.
- ☐ Foi claramente informado pelo seu médico assistente **abaixo identificado e firmado** que após alta hospitalar seguirá piamente as seguintes orientações médicas:
- ☐ Evitar esforços por 72 horas (relação sexual, caminhadas, levantar-se bruscamente quando deitado ou sentado, andar de cavalo, subir escadas, carregar peso, etc);
- ☐ Evitar esforços exagerados por 1 semana (andar de bicicleta, correr, nadar, jogar futebol, trabalhos que exijam esforços físicos como levantar peso etc).

Declaração final de consentimento

O paciente declara estar ciente de que pode suspender este procedimento a qualquer momento, inclusive no centro cirúrgico, sem que este ato implique em qualquer forma de constrangimento entre ele e seu médico, o qual se dispõe a continuar a orienta-lo e tratá-lo em quaisquer circunstâncias.

O paciente declara, ainda. Eu li este formulário de consentimento. Tive a oportunidade de fazer todas as perguntas referentes a este procedimento cirúrgico **e firmo abaixo** que todas as minhas dúvidas foram respondidas. Os riscos e benefícios deste procedimento cirúrgico foram explicados a mim. Concordo livremente em realizar tal procedimento cirúrgico (biópsia hepática). Eu receberei uma cópia deste acordo.

Finalmente, assim, o paciente faz sua adesão ao procedimento cirúrgico (biópsia hepática) de forma livre, por espontânea vontade e por decisão conjunta dele com seu médico assistente.

Paciente: _____

Responsável Legal (quando for o caso): _____

Sexo do paciente: () Masculino () Feminino; Idade do paciente: _____(anos)

R.G. (do paciente ou responsável legal): _____

CPF (do paciente ou representante legal): _____

Endereço: _____

Cidade:_____UF_____CEP_____Telefone_____

Assinatura do Paciente

Assinatura do Representante Legal

(quando for o caso)

Investigador Responsável: Flamir da Silva Victoria, CRMAM 2166, CPF: 19069430010.
Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25, Manaus. AM – Amazonas, CEP: 690400-00 Fone: (092)
32381711.

Apêndice 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) dos candidatos a doadores de sangue.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado para participar do grupo controle de pessoas saudáveis do projeto intitulado “Avaliação da angiogênese hepatocelular em pacientes infectados pelo *vírus da hepatite C* (VHC), portadores de Doença Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA)”, este estudo será conduzido na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHEMOAM em parceria com a FMT-HVD.

O objetivo do projeto é estudar a angiogênese hepatocelular e traçar um perfil imunológico dos pacientes infectados pelo *vírus da hepatite C* no Amazonas.

Se você for um doador de sangue voluntário e aceitar participar deste estudo, será solicitado durante a doação sanguínea a coleta de 20 ml do seu sangue periférico, que serão distribuídos em tubos com EDTA e gel separador, os quais serão processados com a finalidade de investigar as células do seu sistema imunológico e compará-las com as células de pessoas infectadas com o *vírus da hepatite c*. Assim poderá se observar quais as diferenças entre as células de pessoas saudáveis e pessoas infectadas com o *vírus da hepatite c*. Em nenhum momento você ou o seu sangue entrará em contato com o sangue de outro doador ou paciente.

Todas as informações obtidas neste estudo que possam ser identificadas com o seu nome permanecerão de forma confidencial. Seu nome não será revelado em nenhum relatório ou publicação resultante deste estudo sem seu expresso consentimento.

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir por não participar deste estudo. Uma vez que você decida participar neste estudo, você pode retirar seu consentimento e finalizar sua participação a qualquer momento.

Se você tiver alguma dúvida sobre a pesquisa ou seus direitos como doador de sangue para a pesquisa durante ou após o estudo, você pode contatar Soriane de Souza Cruz , presencialmente ou pelos fones (092) 93569981/81816577.

Eu li este formulário de consentimento livre e esclarecido e tive a oportunidade de fazer todas as perguntas referentes a este estudo e minhas dúvidas foram respondidas. Os riscos e benefícios deste estudo foram explicados a mim. Concordo livremente em participar deste estudo como doador de sangue para representar o grupo controle saudável. Eu receberei uma cópia deste acordo.

Voluntário doador de sangue _____

Sexo do paciente: Masculino () Feminino (); Idade do paciente: _____ anos;

RG: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ Fone: _____

Assinatura do doador de sangue

Anexos

ANEXOS

Anexo 01: Artigo de Revisão

FIBROSIS PROGRESSION IN CHRONIC HEPATITIS C

PROGRESSÃO DA FIBROSE NA HEPATITE C CRÔNICA

Soriane de Souza Cruz^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,2}

1. Programa de Pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, AM. 2. Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – FHEMOAM, Manaus, AM. 3. Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD.

Endereço para correspondência: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas-FHEMOAM, Av. Constantino Nery, N° 4.397, CEP: 69050- 002, Chapada, Manaus, Amazonas, Brasil;

Tel: 55 92 3655-0013; 9114-9478

E-mail: malheiroadriana@yahoo.com.br

Resumo: A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a doença hepática relacionada com os maiores índices de morbidade e mortalidade devido as recorrentes complicações como progressão da fibrose e evolução para cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Em resposta a infecção pelo VHC, diferentes tipos celulares, como miofibroblastos, células epiteliais e células imunes são ativadas e ocorre liberação de citocinas inflamatórias e fibrogênicas para a eliminação viral. As falhas em eliminar o vírus resultam em agressão persistente do fígado, criando um ambiente favorável à fibrose, caracterizada pelo acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, que inclui colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, proporcionando um rearranjo histológico e molecular no tecido hepático. Este mecanismo conduz a uma diminuição funcional e em alguns casos falência do fígado. Estudos epidemiológicos revelam que a fibrose em pacientes expostos a infecção pelo VHC é altamente variável, pois, fatores do hospedeiro, incluindo consumo de álcool, co- infecção com VHB ou HIV são co- fatores que influenciam a evolução da doença. O conhecimento da progressão fibrose hepática tem implicações importantes para o prognóstico de doenças e indicam não somente resposta ao tratamento mas também reflete o desenvolvimento de cirrose.

Descritores: Hepatites C, Fibrose, Cirrose

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) infection is related to higher rates of morbidity and mortality due to recurrent complications such as fibrosis progression, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In response to HCV infection , different cell types such as myofibroblasts , epithelial cells and immune cells are activated and occurs release of inflammatory and fibrogenic cytokines for viral clearance . The failure to eliminate the virus results in persistent liver injury, creating a favorable environment for fibrosis , characterized by excessive accumulation of extracellular matrix components , including collagen, fibronectin and hyaluronic acid , providing a histologic and molecular rearrangements in liver tissue . This mechanism leads to a decrease and in some cases functional failure of the liver. Epidemiological studies show that fibrosis in patients exposed to HCV infection is highly variable , therefore, host factors , including alcohol consumption , co -infection with HBV or HIV are co - factors that influence disease progression . The knowledge about liver fibrosis progression has important implications for the prognosis of disease, indicating not only treatment response, but also reflects the development of cirrhosis.

Keywords: Hepatitis c, fibrosis, cirrhosis

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) é a principal causa de doenças hepáticas em todo mundo. Estima-se que 170 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus, o que representa 3% da população mundial⁴⁵. Em média 12% a 25% dos pacientes infectados alcançam a eliminação viral de forma espontânea e a maioria desenvolve a forma crônica da doença⁹ com evolução principalmente para fibrose, cirrose hepática e o carcinoma hepatocelular³⁶. Por ano, mais de 350.000 mortes relacionadas à infecção pelo VHC são registradas⁴⁵.

A via de transmissão do VHC ocorre principalmente por exposição percutânea direta com sangue contaminado. Assim, o principal grupo de risco para adquirir a infecção são os usuários de drogas injetáveis, pessoas que realizaram transfusões sanguíneas antes de 1992 e profissionais da área de saúde¹³.

A maioria dos indivíduos com hepatite C não demonstra qualquer sintoma durante a fase aguda da infecção, dessa forma, muitos não sabem que tem doença, o que dificulta conhecer e investigar a fase inicial. No entanto, vários estudos têm demonstrado que 81% dos pacientes durante a fase aguda apresentaram diversos sintomas, que inclui fadiga, dor abdominal, falta de apetite, febre moderada e mialgia^{5,22,43}.

O tratamento para hepatite C realizado com interferon peguilado e ribavirina é frequentemente mal tolerado. Atualmente, outras terapias aprovadas são com os inibidores de protease viral, telaprevir e boceprevir que agem diretamente no vírus e reabrem maiores chances de eliminação viral¹⁰, o que pode prevenir a evolução da doença em sua forma mais severa e assim diminuir os impactos na saúde global.

O VÍRUS DA HEPATITE C

O *vírus da hepatite C* é um vírus de RNA envelopado de fita simples com polaridade positiva pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* e codificado por uma poliproteína de aproximadamente 3.000 aminoácidos. Essa poliproteína é processada para produzir as proteínas estruturais Core, E1 e E2, a viroporin p7 e as proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B²⁴.

A core forma o nucleocapsídeo viral e pode afetar as funções celulares do hospedeiro como transcrição gênica, metabolismo lipídico, apoptose e várias vias de sinalização⁴¹. As glicoproteínas do envelope viral, E1 e E2 são altamente glicosiladas e desempenham um importante papel na entrada do vírus nos hepatócitos^{7,12}.

As proteínas estruturais e não estruturais são separadas por uma membrana peptídica p7, que contribui na reunião de partículas virais juntamente com a NS2³⁸. A NS3 forma um complexo estável com o co-fator NS4A e contribui para a clivagem da poliproteína viral. A NS4B induz alterações de membranas intracelulares, que participam no processo de replicação viral, com a contribuição da NS5A e NS5B que é a polimerase RNA dependente¹⁸.

O VHC tem 6 genótipos e subtipos descritos. Os genótipos 1 e 3 são mundialmente distribuídos e representam mais de 60% das infecções por VHC no mundo todo. O genótipo 2 é frequentemente mais encontrado na Europa. O genótipo 3 é endêmico no sudeste da Ásia, o genótipo 4 é característico do oriente médio, Egito e África Central. Os genótipos 5 e 6 são encontrados respectivamente na África do Sul e Ásia¹⁷.

O CICLO DO VHC

A entrada do VHC nos hepatócitos é dependente da molécula CD81⁵⁰ e outros fatores adicionais como o receptor *scavenger* classe B tipo I (SR-B1), que junto com CD81 são as principais moléculas para a ligação da E2 do vírus na célula alvo³⁵, além da proteína claudina 1 (CLDN-1), bem como as CLDN-6, CLDN-9²³ e a ocludina²¹. O VHC também liga a outras moléculas como os glicosaminoglicanos, o receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e algumas lectinas³³.

Após se ligar nos receptores das células alvos através de suas moléculas de ligação, o VHC faz a internalização e seu nucleocapsídeo é dispensado no citoplasma da célula. O RNA é então liberado do nucleocapsídeo e usado para a tradução de proteínas e replicação viral. A tradução do RNA viral começa pela ligação do iniciador 5'-IRES (sítio de entrada do ribossomo interno) ao ribossomo no retículo endoplasmático e produz uma única poliproteína processada por proteases celular e viral⁸.

A proteína NS5A replica o genoma pela síntese da fita de RNA negativa, que serve como molde para a síntese da fita de RNA positiva. O processo de formação do nucleocapsídeo acontece no retículo endoplasmático. Posteriormente, o nucleocapsídeo envelopado matura-se no complexo de Golgi e novos vírus são produzidos e liberados por exocitose e começarão um novo ciclo²⁷.

Para continuar seu processo de replicação, o VHC interfere em várias vias de sinalização das respostas imunes antivirais através de processos de mutação que suas partículas sofrem e falhas nas respostas, 4nj das células T específicas².

IMUNOPATOGENESE DO VHC

A primeira linha de defesa imunológica contra a infecção viral são os Interferons tipo I (IFNs I), uma citocina que combate a replicação viral nas células por estimular as respostas imunes inatas e adaptativas³⁹.

Na infecção pelo VHC, o IFN-I produzido células dendríticas plasmocitóides ativam as células naturais killer (NK) para eliminarem os hepatócitos infectados e assim estimulam as células dendríticas mielóides a secretarem o interferon-gama (IFN- γ), que por sua vez, ativa os macrófagos residentes no fígado, iniciando assim o processo inflamatório hepático¹⁶.

As células dendríticas mielóides capturam os antígenos do VHC no fígado e seguem para os linfonodos, onde maturam e expressam o antígeno leucocitário humano (HLA) classe I e classe II e moléculas co- estimulatórias em sua superfície e iduzem as células T helper (Th) “*naive*” a se diferenciarem através da produção da citocina IL-12 em células Th1, que quando ativadas secretam IL-2 e IFN- γ e conduz à ativação e proliferação de células NK e linfócitos T citotóxicos (CTLs), que vão reconhecer os peptídeos do vírus junto ao HLA classe I na superfície da célula dendrítica e posteriormente seguirão para o fígado, onde reconhecem os antígenos do VHC na superfície do hepatócitos infectados e liberaram perforinas, granzimas e TNF- α , conduzindo à morte das células infectadas, aumento do processo inflamatório e o desenvolvimento da hepatite C¹⁶.

A atividade inflamatória e formação de novas estruturas são fatores recorrentes na fisiopatologia das doenças hepáticas crônicas e suas complicações. Estes processos de reparo aos danos teciduais podem progredir para fibrose, cirrose, esteatose, carcinoma hepatocelular e morte⁴.

PROGRESSÃO DA FIBROSE NA HEPATITE C CRÔNICA

A infecção pelo *vírus da hepatite C* é a doença hepática relacionada com os maiores índices de morbidade e mortalidade devido as recorrentes complicações como progressão da fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular^{20, 32}.

Durante o processo de agressão hepática, a resposta inicial ao agente patológico é a inflamação aguda, nesta fase as alterações do fígado são transitórias e a arquitetura hepática pode ser restaurada em sua composição normal. Porém, se a lesão e inflamação crônica forem mantidas podem conduzir a uma substituição progressiva do parênquima hepático por tecido cicatricial¹⁵.

O recrutamento de células inflamatórias é um processo fundamental nas primeiras etapas do reparo tecidual. Inicialmente a inflamação é caracterizada por uma rápida infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, acompanhados pelos monócitos, que se diferenciam em macrófagos na resposta às lesões e fazem parte da primeira linha de defesa da resposta imune^{37,25}.

A ativação de neutrófilos e macrófagos libera citocinas inflamatórias e fibrogênicas¹⁹ conduzindo a erradicação do agente patogênico. As falhas em eliminar os patógenos resultam em agressão persistente no local de infecção e inflamação crônica, criando um ambiente favorável à fibrose³. A inflamação crônica e a fibrose contribuem em 45% das mortes no hemisfério ocidental⁴⁶.

A fibrose é caracterizada pelo acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular (CME), que inclui colágeno, fibronectina e ácido hialurônico, provenientes da interação entre diferentes tipos celulares, como os macrófagos, miofibroblastos e células epiteliais. Este mecanismo proporciona um rearranjo histológico e molecular no tecido lesionado, o que pode conduzir a uma diminuição funcional e em alguns casos falência do órgão afetado⁴⁷.

A fibrose hepática é uma resposta dinâmica da lesão no fígado e resulta em deposição de matriz extracelular no espaço de Disse, área entre o hepatócito e sinusóide hepático no quais as células estreladas hepáticas residem e são as principais responsáveis pela fibrogenese do órgão, embora muitas células hepáticas sejam envolvidas neste processo. Nas fases iniciais, as células estreladas agem principalmente como reservatório de vitamina A e são ativadas pelas citocinas produzidas em resposta às lesões e macrófagos, promovendo a inflamação e fibrose³⁴.

Os macrófagos ativados regulam os CME através da liberação de quimiocinas, citocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e fatores de crescimento. Os fragmentos hialurônicos são fortes ativadores de células mononucleares e fibroblastos, assim induzem a expressão de várias citocinas (IL-1, IL-12 e TNF- α), quimiocinas (MIP-1A, MCP-1, IL-8), síntese de óxido nítrico induzível (iNOS) e disparam a expressão e secreção de macrófagos derivados da matriz metaloproteinases (MMP)⁴⁰, enzima essencial na fibrose hepática, onde usam MMP-13 para remodelar o tecido fibrótico.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) causam lesão através das mutações de DNA, oxidação de lipídios, proteínas e são produzidos em diversas doenças hepáticas como hepatites virais, doenças induzidas por álcool e doença hepática gordurosa. Nos hepatócitos infectados pelo VHC, a proteína core fixa-se a membrana mitocondrial e altera a homeostase do cálcio, aumentando a produção de ERO²⁶.

As células e citocinas do sistema imune desempenham importante papel no início e progressão da fibrose³⁰. Estudos detectaram que há correlação entre as concentrações de citocinas do perfil Th1 e injúria hepática progressiva em pacientes com hepatite C crônica, o que pode levar a fibrose hepática, enquanto as citocinas do perfil Th2 suprimem as respostas de Th1 e tornam a resposta imune mais branda¹¹.

Na hepatite C crônica a persistência do processo de fibrose progressiva pode resultar em cirrose hepática. O estabelecimento da cirrose é tipicamente variável e lento, desenvolvendo-se por mais de 20 a 40 anos em pacientes com lesão hepática crônica. Esse ritmo de progressão é influenciado pelos fatores genéticos e ambientais¹⁵.

Estudos epidemiológicos revelam que a fibrose em pacientes expostos a infecção pelo VHC é altamente variável, pois fatores do hospedeiro, incluindo consumo de álcool, co-infecção com o vírus da hepatite B (VHB) ou HIV são co-fatores que influenciam a evolução da doença^{14,31,6}.

A idade avançada é um dos fatores de risco mais importante para a progressão da fibrose hepática, que se desenvolve lentamente e demonstra baixa prevalência em pacientes mais jovens⁴⁴. Os mecanismos exatos pelo quais a progressão da fibrose é mais acelerada na idade avançada não estão bem definidos. As alterações da capacidade de regeneração do fígado e alterações do sistema imune podem desempenhar papéis importantes nesse processo²⁹.

O gênero também pode influenciar na progressão da fibrose, pois, entre os homens acontece de forma mais acelerada que nas mulheres²⁸, sugerindo que os fatores hormonais podem ser importantes na regulação desse processo. A duração prolongada da infecção também tem sido associada com maior grau de fibrose hepática⁴⁹.

As respostas de células T específicas na hepatite crônica, apesar de diminuídas, são as principais responsáveis pelo desenvolvimento de fibrose e cirrose hepática, apesar dos indivíduos com a forma aguda da hepatite C possuírem respostas anti-virais de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas quantitativamente maiores que os indivíduos com a forma crônica²⁹.

Para avaliar a extensão e progressão da fibrose é realizada a biópsia hepática e posteriormente análises histológicas. No entanto, a extensão e classificação ainda não são precisas, pois a progressão da fibrose pode não ser linear^{48,29,42}

O conhecimento da progressão fibrose hepática tem implicações importantes para o prognóstico de doenças. As informações sobre os estados da fibrose na hepatite C não somente indicam resposta ao tratamento mas também refletem o desenvolvimento de cirrose^{1,51}.

CONCLUSÃO

A imunopatogênese da hepatite C é alvo de constantes estudos, no entanto muitos mecanismos que conduzem a forma crônica da doença devem ser exaustivamente investigados, principalmente os aspectos imunológicos e os fatores que interferem na resposta imune e que consequentemente determinam as principais complicações relacionadas ao *vírus da hepatite C*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa do Amazonas (Fapeam) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Afdhal NH & Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am j Gastroenterol.* 99:1160-1174, 2004.
2. Ashfaq U, Javed T, Rehman S. et al. An overview of HCV molecular biology, replication and immune responses. *Virol J.* 8: 161, 2011.
3. Botha P, Archer L, Anderson RL, Lordan J, Dark JH, Corris PA, Gould K, Fisher AJ. *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome, *Transplantation.* 85: 771–774, 2008.
4. Coulon S, Heindryckx F, Geerts A. et al. Angiogenesis in chronic liver disease and its complications. *Liver international,* 146- 162, 2010.
5. Deterding K, Wiegand J, Gruner N, Hahn A, Jackel E, Jung M, et al. The German Hep-Net acute hepatitis C cohort: impact of viral and host factors on the initial presentation of acute hepatitis C virus infection. *Z Gastroenterol.* 47 :531 40, 2009.
6. Di Martino V. *et al.* The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users: a long-term retrospective cohort study. *Hepatology.* 34:1193-9, 2001.
7. Drummer HE, Maerz A, Pountourios P. Cell surface expression of functional hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins. *FEBS Letters.* 546: 385-390, 2003.
8. El-hage N & Luo G. Replication of hepatitis C virus RNA occurs in a membrane-bound replication complex containing nonstructural viral proteins and RNA. *Journal of General Virology.* 84: 2761-2769, 2003.
9. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology.* 125: 80-88, 2003.
10. Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 54:1433-1444, 2011.
11. Gigi E, Raptopoulou-gigi M, Kalogeridis A, et al. Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1–TH2 cytokine profile in subjects with self-limited disease. *J Viral Hepat.* 15: 145-154, 2008.
12. Goffard A, Callens N, Bartosch B, et al. Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *J Virol.* 79: 8400-8409, 2005.

13. Grebely J, Prins M, Hellard M, Cox AL, Osburn WO, Lauer G, et al. Hepatitis C virus clearance, reinfection, and persistence, with insights from studies of injecting drug users: towards a vaccine. *Lancet Infect Dis.* 12:408–14, 2012.
14. Harris DR, *et al.* The relationship of acute transfusion-associated hepatitis to the development of cirrhosis in the presence of alcohol abuse. *Ann Intern Med.* 134:120-4, 2001.
15. Hernandez-Gea V & Friedman SL. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 6:425–56, 2011.
16. Hiroishi K, Ito T, Imawari M. Immune responses in hepatitis C virus infection and mechanisms of hepatitis C virus persistence. *J Gastroenterol Hepatol.* 23: 1473-1482, 2008.
17. Jang JY & Chung R T. Chronic Hepatitis C. *Gut Liver.* 5: 117-132, 2011.
18. Jo J, Lohmann V, Bartenschlager R, et al. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *Journal of General Virology.* 92: 477–493, 2011.
19. Kisseleva T & Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis, *Exp. Biol. Med.* 233: 109–122, 2008
20. Lauer GM & Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 345:41–52, 2001.
21. Liu S, Yang W, Shen L, et al. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Control Hepatitis C Virus Entry and Are Downregulated during Infection To Prevent Superinfection. *J Virol.* 83: 2011-2014, 2009.
22. Loomba R, Rivera M, McBurney R, Park Y, Haynes-Williams V, Rehmann B, et al. The natural history of acute hepatitis C: clinical presentation, laboratory findings and treatment outcomes. *Aliment Pharmacol Ther.* 33:559–65, 2011.
23. Meertens L, Bertaux C, Cukierman L, et al. The Tight Junction Proteins Claudin-1, -6, and -9 Are Entry Cofactors for Hepatitis C Virus. *J Virol.* 82: 3555-3560, 2008.
24. Moradpour D, Penin F, Rice, J. Replication of Hepatitis C virus. *Nature.* 5: 453-63, 2007.
25. Murray PJ & Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets, *Nat. Rev. Immunol.* 11: 723–737, 2011.
26. Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, et al. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology.* 122: 366–375, 2002.

27. Penin F, Brass V, Appel N, et al. Structure and Function of the Membrane Anchor Domain of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 40835-40843, 2004.
28. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 22,349(9055):825–32, 1997.
29. Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, et al. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 38:257–65, 2003.
30. Prakobwong S, et al. Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteases, cytokines and collagens in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury. *Int. J. Parasitol.* 39:825–835, 2009.
31. Ragni MV, Belle SH. Impact of human immunodeficiency virus infection on progression to end-stage liver disease in individuals with hemophilia and hepatitis C virus infection. *J Infect Dis.* 183:1112-5, 2001.
32. Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al. Genetic variation in *IL28b* is associated with chronic hepatitis c and Treatment failure: a genome-wide association study. *Gastroenterology*. 138:1338–1345, 2010.
33. Rehermann, B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of Clinical Investigation*. 119: 1745-1754, 2009.
34. Saile B & Ramadori G. Inflammation, damage repair and liver fibrosis--role of cytokines and different cell types. *Z Gastroenterol*. 45: 77-86, 2007.
35. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R, et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*. 21: 5017-5025, 2002.
36. Semmo N & Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*. 13: 4831-8, 2007.
37. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nat. Rev. Immunol.* 8: 349–361, 2008.
38. Steinmann E, Penin F, Kallis S, et al.: Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* 3:e103, 2007.

39. Taniguchi T & Takaoka A. The interferon- α/β system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current Opinion in Immunology*. 14: 111-116, 2002.
40. Tedgui A & Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: Pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 86:515–581, 2006.
41. Tellinghuisen TL & Rice CM. Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors. *Current Opinion in Microbiology*. 5: 419-427, 2002.
42. Thein HH, Yi Q, Dore GJ, Krahn MD. Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression. *Hepatology*. 48:418–431, 2008.
43. Vogel M, Deterding K, Wiegand J, Gruner NH, Baumgarten A, Jung MC, et al. Initial presentation of acute hepatitis C virus (HCV) infection among HIV-negative and HIV-positive individuals-experience from 2 large German networks on the study of acute HCV infection. *Clin Infec Dis*. 49 :317–9, 2009.
44. Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl A, Zeller A, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med*. 16:866–70, 1999.
45. World Health Organization. Media centre: Hepatitis C, fact sheet N 164, june de 2011. Disponível em URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>. Acessado em 06 de dezembro de 2011.
46. Wynn, TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *J. Pathol.* 214: 199–210, 2008.
47. Wynn TR. Ramalingam, Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease, *Nat. Med.* 18: 1028–1040, 2012.
48. Yano M, Kumada H, Kage M, et al. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 23:1334–1340, 1996.
49. Yasuda M, Shimizu I, Shiba M, Ito S. Suppressive effects of estradiol on dimethylnitrosamine-induced fibrosis of the liver in rats. *Hepatology*. 29: 719–27, 1999.
50. Zhang J, Randall G, Higginbottom A, et al. CD81 Is Required for Hepatitis C Virus Glycoprotein-Mediated Viral Infection. *J Virol*. 78: 1448-1455, 2004.
51. Ziol M, Handra LA, Kettaneh A, Christidis C, Mal F, Kazemi F, et al. Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 41: 48- 54, 2005.

Anexo 02: Artigo Original**Produção de citocinas séricas e papel anti- fibrogênico de IL-10 em pacientes com hepatite C**

Soriane de Souza Cruz^{1,2}; Andréa Monteiro Tarragô^{1,2}; Allysson Guimarães da Costa^{1,2}; Ericka Pires², Lorene de Paula², Marilu Barbieri³, Adriana Malheiro^{1,2}, Flamir da Silva Victória³

¹Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas- UFAM, Manaus, AM, Brasil, ²Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- Hemoam, Manaus, AM, Brasil, ³Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado- FMT-HVD, Manaus, AM, Brasil

Palavras Chaves: Hepatite C, Citocinas, IL-10, Fibrose

Endereço para correspondência: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas- Hemoam, Av. Constantino Nery, Nº 4.397, CEP: 69050, Chapada, Manaus, Amazonas, Brasil;

Telefone: 55 92 3655- 0013, 91149478

E-mail: malheiroadriana@yahoo.com.br

Instituição financeira: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

RESUMO

A infecção pelo *vírus da hepatite C* (VHC) afeta aproximadamente 180 milhões de pessoas em todo mundo, representando um importante problema de saúde global. As principais complicações decorrentes da forma crônica desta doença são fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular e estão relacionadas com altas taxas de morbidade e mortalidade. A resposta imune na infecção pelo VHC é mediada principalmente por células e citocinas, proteínas com funções pleiotrópicas essenciais contra agentes infecciosos. Neste estudo, investigamos as citocinas séricas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17 por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) e relacionamos ao grau de fibrose, após biópsia hepática de 30 pacientes com hepatite c crônica e comparamos ao grupo controle sem infecção pelo VHC. Indivíduos com hepatite c mostraram média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas aumentadas com relação ao grupo controle. No grupo diagnosticado com fibrose severa $\geq F3$ (N=10) foi caracterizada relevante frequência de indivíduos com alta produção de IL-2 (MIF acima do *cut off* 123.69) e baixa produção de IL-10 (MIF abaixo do *cut off* 95.81), enquanto na fibrose moderada $\leq F2$ foi caracterizada relevante frequência de indivíduos com alta produção de IL-4 (MIF acima do *cut off* 132.99) e IL-10 (MIF acima do *cut off* 95.81). Conclusão: A alta produção de IL-10 foi associada com um papel anti- fibrogênico em pacientes com hepatite C. A atividade de citocinas inflamatórias e anti- inflamatórias é um evento dinâmico que pode influenciar a lesão hepática. O conhecimento sobre o mecanismo que controla a produção e secreção de citocinas durante a fibrose hepática pode contribuir para a identificação de um potencial marcador terapêutico para prever a progressão da doença e amenizar as complicações relacionadas à hepatite c.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo *vírus da hepatite C* afeta aproximadamente 180 milhões de pessoas em todo mundo, representando um importante problema de saúde global (SHEPARD et al., 2005; ALTER, 2007; LAVANCHY, 2011; HAJARIZADEH et al., 2013). Em média 12% a 25% dos pacientes infectados alcançam a eliminação viral espontânea, no entanto, a maioria desenvolve a forma crônica da doença (GERLACH et al., 2003). As principais complicações da hepatite c incluem fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular e estão relacionadas com altos índices de morbidade e mortalidade (Lauer & Walker, 2001; Rauch et al., 2010).

A resposta imune na hepatite C contribui não somente com a eliminação viral e imunidade protetora, mas também em alguns casos tem um potencial de ocasionar lesão hepática na resposta imune excessiva (Rehermann, 2009), que pode ser mediada por citocinas, proteínas secretadas por células imunes ativadas e apresentam funções pleiotrópicas essenciais contra agentes infecciosos (Hofmann et al., 2002).

Estudos demonstraram que na hepatite C crônica, há correlação entre as concentrações de citocinas do perfil Th1 e lesão hepática progressiva, enquanto as citocinas do perfil Th2 suprimem as respostas de Th1 e tornam a resposta imune mais branda (GIGI et al., 2008). A inflamação no fígado e destruição dos hepatócitos infectados estão associadas à produção de citocinas e pode resultar em fibrose (Pawlotsky, 2004).

A fibrose hepática tem implicações importantes para o prognóstico de doenças e decisões de terapia. As informações sobre os estados da fibrose não somente indicam resposta ao tratamento mas também refletem o desenvolvimento das principais complicações como a cirrose hepática (Afdhal et al., 2004; Ziol et al., 2005).

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos Éticos: Os métodos utilizados no estudo e o termo de compromisso livre e esclarecido assinado por todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa foram aprovados pelo comitê de Ética da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado através do protocolo CAAE: 00330114000-09 e estão de acordo com a resolução 196/96.

Pacientes: Amostras de sangue periférico e tecido hepático foram coletados de 30 pacientes infectados pelo *vírus da Hepatite C* antes do início do tratamento para a infecção na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT- HVD) em Manaus- Amazonas, Brasil, no período de setembro de 2011 a fevereiro de 2013. Foram incluídos no estudo pacientes com a infecção pelo VHC, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos. Foram excluídos os pacientes co-infectados com os vírus da hepatite A, B, D, E, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), os que já haviam iniciado o tratamento para hepatite C e aqueles que apresentaram cirrose descompensada (Child-Pugh B ou C). O grupo controle para as análises das citocinas foi a partir de candidatos a doadores de sangue da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas que não apresentaram resultados positivos nos testes de triagem sorológica, que incluem hepatites virais, HIV, Sífilis, Doença de Chagas e HTLV I e II.

Análise histológica: para determinar a fibrose hepática, foi realizada biópsia do fígado em 30 pacientes com a infecção pelo VHC, seguida de análise histológica no centro de patologia da FMT-HVD. O tecido hepático foi fixado em formaldeído tamponado a 3,7% e após desidratado com alcoóis e clareficado com xilol. Em seguida foi incluída em um bloco de parafina para os cortes de 4-5µm, os quais foram colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina, reticulina, tricromina e PERLS. As lâminas histológicas foram

examinadas ao microscópio e suas imagens capturadas digitalmente para obtenção dos resultados de acordo com o escore METAVIR, que avalia a fibrose em F0, F1, F2, F3, F4, onde 0 representa a ausência de fibrose e 4 representa cirrose hepática. Foram diagnosticados 20 pacientes com grau de fibrose moderada ($\leq F2$) e 10 pacientes com grau de fibrose avançada ($\geq F3$).

Dosagem de citocinas no soro: A dosagem das citocinas séricas IL-2, IL- 4, IL-6, IL- 10, TNF- α , IFN- γ e IL- 17 foi realizada por citometria de fluxo, utilizando o kit *Cytometric Bead Array* (CBA, BD Biosciences Pharmigen, USA) de acordo com as especificações do fabricante.

Análise Estatística: Para as análises estatísticas foi utilizado o software *GraphPad prism* (San Diego, CA, EUA). As características clínicas e demográficas e a média de intensidade de fluorescência das cticocinas séricas entre os grupos controle e pacientes com hepatite C foram analisadas com o teste não paramétrico *Mann- Whitney*.

Análise de indivíduos com alta produção de citocinas e assinatura de citocinas: Para esta análise foi utilizada a média de intensidade de fluorescência (MIF) das citocinas para realizar a comparação do perfil das citocinas entre os grupos controle, $\leq F2$ e $\geq F3$. Os grupos foram reunidos para obter-se um valor de *cut off* para cada citocina. Foi considerado indivíduo com alta produção de citocina quando o valor de MIF de cada citocina for acima do *cut off*, e com baixa produção de citocina o indivíduo abaixo do *cut off*. Esta análise referenciada como “assinatura de citocinas” proposta por Luiza- Silva et al., (2011) considera relevante quando a frequência (%) de indivíduos com alta produção de citocinas for acima do percentil 50.

RESULTADOS

Características da população de estudo

Os pacientes com Hepatite C mostraram a média de faixa etária maior que os indivíduos do grupo controle (50 anos e 40 anos). O gênero masculino predominou o gênero feminino nos dois grupos estudados. Os genótipos do VHC nos indivíduos infectados foram representados em 70% pelo genótipo VHC- 1, 13% pelo genótipo VHC- 2 e 17% pelo genótipo VHC- 3. As transaminases AST e ALT mostraram-se significativamente em maiores concentrações nos paciente com relação ao grupo controle (**Tabela 1**).

Indivíduos com hepatite C crônica mostram altos níveis de citocinas na circulação

A análise das citocinas séricas demonstrou um aumento significativo das citocinas pro- inflamatórias e de perfil Th1 (IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ), perfil Th2, IL-4, perfil Th17, IL- 17 e a regulatória IL-10 nos indivíduos com hepatite C crônica quando comparada aos doadores saudáveis (**Figura 1**).

Indivíduos com alta produção de citocinas entre grupos controle e pacientes com fibrose moderada e fibrose avançada na hepatite c crônica.

Na análise de indivíduos com alta produção de citocinas, foi calculado o *cut off* de cada citocina reunindo todos os grupos (Controle, $\leq F2$, $\geq F3$) e obtendo *cut off* de IL- 2= 123.69 , IL-4= 132.99, IL- 6= 147.29, IL- 10= 95.81, TNF- α = 85.08, IFN- γ = 58.63 e IL- 17= 62.20. Foram considerados baixos produtores de citocinas aqueles indivíduos com os valores de MIF abaixo do *cut off*, e altos produtores os indivíduos com os valores das MIF acima do *cut off* (**Figura 2**). A partir do *cut off* de cada citocina, foi utilizados os diagramas para calcular a frequências (%) dos indivíduos com alta produção de citocina em cada grupo (**figura 3**). Esta frequência foi utilizada para traçar o perfil de citocinas ascendente,

referenciado com assinatura de citocinas para cada grupo e posteriormente essas frequências foram sobrepostas com ilustra a **Figura 4**.

No grupo controle nenhum indivíduo apresentou alta produção de citocinas, enquanto nos grupos $\leq F2$ e $\geq F3$ observou-se indivíduos com alta produção de IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-17. A citocina IL-10 mostrou-se no limite mínimo do percentil 50 no grupo de fibrose severa $\geq F3$, portanto não considerada com alta produção nos indivíduos deste grupo.

Na fibrose severa $\geq F3$ é caracterizada uma assinatura de citocinas pro-inflamatórias, enquanto na fibrose moderada $\leq F2$ é caracterizada uma assinatura de citocinas anti-inflamatórias.

Na assinatura de citocinas é demonstrado alta produção de IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL-17, nos indivíduos com hepatite c na fibrose moderada $\leq F2$ e fibrose avançada $\geq F3$, enquanto o grupo controle não demonstrou esses parâmetros. A frequência de indivíduos com alta produção de IL-2 foi mais relevante na fibrose avançada $\geq F3$, enquanto a frequência de indivíduos com alta produção de IL-4 foi a mais relevante na fibrose moderada $\leq F2$ (**Figura 4**).

A alta produção de IL-10 tem um papel anti fibrogênico nos indivíduos com fibrose moderada $\leq F2$ em relação aos indivíduos com fibrose avançada $\geq F3$

A frequência de indivíduos com alta produção de IL-10, foi relevante somente no grupo de fibrose moderada $\leq F2$, quando comparados grupos (Controle, fibrose moderada $\leq F2$ e fibrose avançada $\geq F3$). Quando comparados somente os grupos (Fibrose moderada $\leq F2$ e Fibrose avançada $\geq F3$), obteve-se *cut off* de IL-2= 201.63, IL-4= 161.59, IL-6= 175.17, IL-10= 101.53, TNF= 120.835, IFN= 62.92, IL-17= 104.39. Foi observado que a frequência de indivíduos com alta produção de IL-10 permaneceu relevante no grupo de fibrose moderada, sendo a única frequência acima do percentil 50 entre as citocinas neste grupo, enquanto no

grupo de fibrose avançada, a frequência de indivíduos com alta produção de IL-10 não mostrou-se relevante, sendo a de menor frequência (**Figura 5**).

DISCUSSÃO

A hepatite C é a doença hepática relacionada com os maiores índices de morbidade e mortalidade devido as recorrentes complicações como fibrose, cirrose hepática e carcinoma hepatocelular (Lauer & Walker, 2001; Rauch et al., 2010). A resposta imune na hepatite C tem um potencial de contribuir não somente com a eliminação viral e em alguns casos imunidade protetora, mas também ocasionar lesão hepática (Rehermann, 2009).

Neste estudo, foram comparadas as citocinas do soro de pacientes com hepatite C e grupo controle. Nossos dados demonstram que as citocinas do perfil inflamatório, Th1 (IL-2, IFN- γ , IL-6, TNF- α), anti-inflamatório Th2 (IL-4) e Th17 (IL-17) e a regulatória IL-10 tem concentrações significativas no soro dos indivíduos com hepatite C do que no grupo controle.

Dados semelhantes foram demonstrados em alguns estudos que relataram o aumento das citocinas do perfil Th1, como IFN- γ e IL-2, as do perfil Th2, IL-4 e a regulatória IL-10 no soro de pacientes com hepatite C em relação ao grupo controle, apesar do perfil Th2 ter sido mais relevante que Th1 (Cacciarelli *et al.*, 1996). Outros estudos enfatizam que em pacientes com hepatite C o perfil Th2 predomina ao Th1 (Fan *et al.*, 2000). No entanto, alguns autores relatam uma diminuição de IL-4 (Spanakis et al., 2002) e IL-2 (Zhang et al., 2011), enquanto em outros estudos foi relatado um aumento significativo de IL-4 e IL-10 em pacientes com hepatite c com relação ao grupo controle (Reiser *et al.*, 1997; Abayli et al., 2003; Chen et al., 2007). Em contraste, outros autores não mostraram diferenças significativas entre os grupos estudados (Zekri et al., 2005). No entanto, outros estudos demonstram que tanto as concentrações de IL-2 e IFN- γ , quanto de IL-4 e IL-10 apresentaram-se aumentadas no soro de pacientes com VHC em relação ao grupo controle (Sofian et al., 2012).

Na análise de indivíduos com alta e baixa produção de citocinas séricas entre o grupo controle e os grupos de pacientes com hepatite c com fibrose moderada (<F2) e o de fibrose avançada (>F3), demonstrou-se que o grupo controle não apresenta frequência relevante de indivíduos com alta produção de citocinas, enquanto no grupo de fibrose moderada (<F2) observou-se uma elevada frequência de indivíduos com alta produção de IL-4 (perfil Th2), principalmente, seguida de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ e IL-10, enquanto o grupo de fibrose avançada >F3 demonstrou frequência elevada de indivíduos com alta produção de IL-2 (do perfil Th1), principalmente, seguido de TNF- α , IL-4, IL-6, IL-17, IFN- γ . A frequência de indivíduos com alta produção de IL-10 não mostra-se relevante nesse grupo. Estudos relatam que o desenvolvimento do perfil Th2 é promovido pela IL-4 e antagoniza o desenvolvimento de Th1, enquanto IFN- γ e IL-2 promovem o desenvolvimento de Th1 e antagoniza o desenvolvimento de Th2 (Wick et al., 2013).

Esses dados sugerem um papel importante da citocina IL-4 em controlar o desenvolvimento de lesões hepáticas, no grupo de fibrose moderada, enquanto IL-2 poderia contribuir para a evolução da fibrose avançada. Estudos demonstram que a troca de citocinas do perfil Th2 para Th1 tem sido associada com o aumento da atividade necroinflamatórias e fibrose hepática (Sobue et al., 2001; Yamaki et al., 2005).

No presente estudo a frequência de indivíduos com alta produção de IL-10 no soro mostrou-se relevante no grupo de fibrose moderada <F2 em relação ao grupo de fibrose avançada >F3, sugerindo uma atividade regulatória e anti-fibrogenica nesse grupo.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que regula negativamente a expressão de MHC II e moléculas co-estimulatórias nas células apresentadoras de antígenos (Steinbrink et al., 1997), e inibe a ativação de células T via inibição da molécula co-estimulatória CD28 (Taylor et al., 2007). A permanência da concentração de IL-10 aumentada durante a infecção pode promover persistência do processo patológico por suprimir as atividades de células T,

contribuindo assim para o declínio da resposta efetora contra os vírus (Cox et al., 2005), no entanto também previne o desenvolvimento de lesões mediadas pela excessiva resposta imune protetora (Mege et al., 2006).

Tanto a deficiência ou superprodução de IL-10 pode ser responsável por lesões. A baixa produção desta citocina pode resultar no aumento das reações inflamatórias e consequentemente doenças autoimunes. Do contrário, a superprodução pode resultar no aumento da suscetibilidade a infecção viral ou câncer (Miyazoe et al., 2002).

Estudos realizados por Aroucha et al. (2013) indicam um papel protetor de IL-10 em pacientes com fibrose moderada, pois apresentaram maiores concentrações de IL-10 quando comparados com indivíduos com fibrose avançada, reforçando a nossa hipótese de que a IL-10 pode exercer um papel protetor na infecção pelo VHC em relação a evolução da fibrose hepática. Outros estudos enfatizaram o papel protetor de IL-10 utilizado no tratamento da hepatite C crônica, o qual teve diminuição da severidade da fibrose nos indivíduos envolvidos (Nelson et al., 2000). Em outros estudos com modelos animais, foi demonstrado que a ausência de IL-10 teve associação com a fibrose hepática (Louis et al., 1997; Thompson et al., 1998). Em contraste a estes dados em um estudo realizado por Abayli et al., 2003, utilizando IL-10 e atividade histológica, não foi encontrada relação entre esses parâmetros.

Em resumo, a assinatura de citocinas demonstra que em pacientes com fibrose moderada <F2 foi caracterizado maior frequência de indivíduos com alta produção de IL-4 principalmente e presença de frequência relevante para IL-10, enquanto na fibrose avançada >F3 foi caracterizado maior frequência de indivíduos com alta produção de IL-2 principalmente e menor frequência de IL-10, reforçando a hipótese do efeito protetor de IL-10 nos indivíduos com fibrose moderada, como citado anteriormente.

Portanto, a ação das citocinas inflamatórias, anti-inflamatórias e regulatórias é um evento dinâmico que vai influenciar a progressão da lesão hepática, contribuindo para

amenizar os danos causados pelos agentes patogênicos ou ainda regulando a resposta excessiva de células efectoras. Conhecer os mecanismos que controlam a produção e secreção das citocinas, durante a progressão da fibrose hepática pode contribuir na identificação de um potencial marcador terapêutico para avaliar a evolução da doença e amenizar as complicações relacionadas à infecção pelo *vírus da hepatite C*.

Tabela 1

Características clínicas, epidemiológicas e demográficas de pacientes com hepatite c e grupo controle.

Características		Controle (n= 28) [média ± SD]	Pacientes (n=30) [média ± SD]	<i>P value</i>
Idade		40,29 ± 9,05	50,27 ± 8,65	-
Masculino/Feminino		20/8	19/11	-
Genotipos VHC	G- 1	-	21 (70%)	-
	G- 2	-	4 (13%)	-
	G- 3	-	5 (17%)	-
Fibrose hepática	≤ F2	-	20 (75%)	-
	≥ F3	-	10 (25%)	-
AST (U/L)		26,75 ± 13,72	69,83 ± 65,13	< 0,0001
ALT (U/L)		38,89 ± 38,27	95,93 ± 75,73	< 0,0001

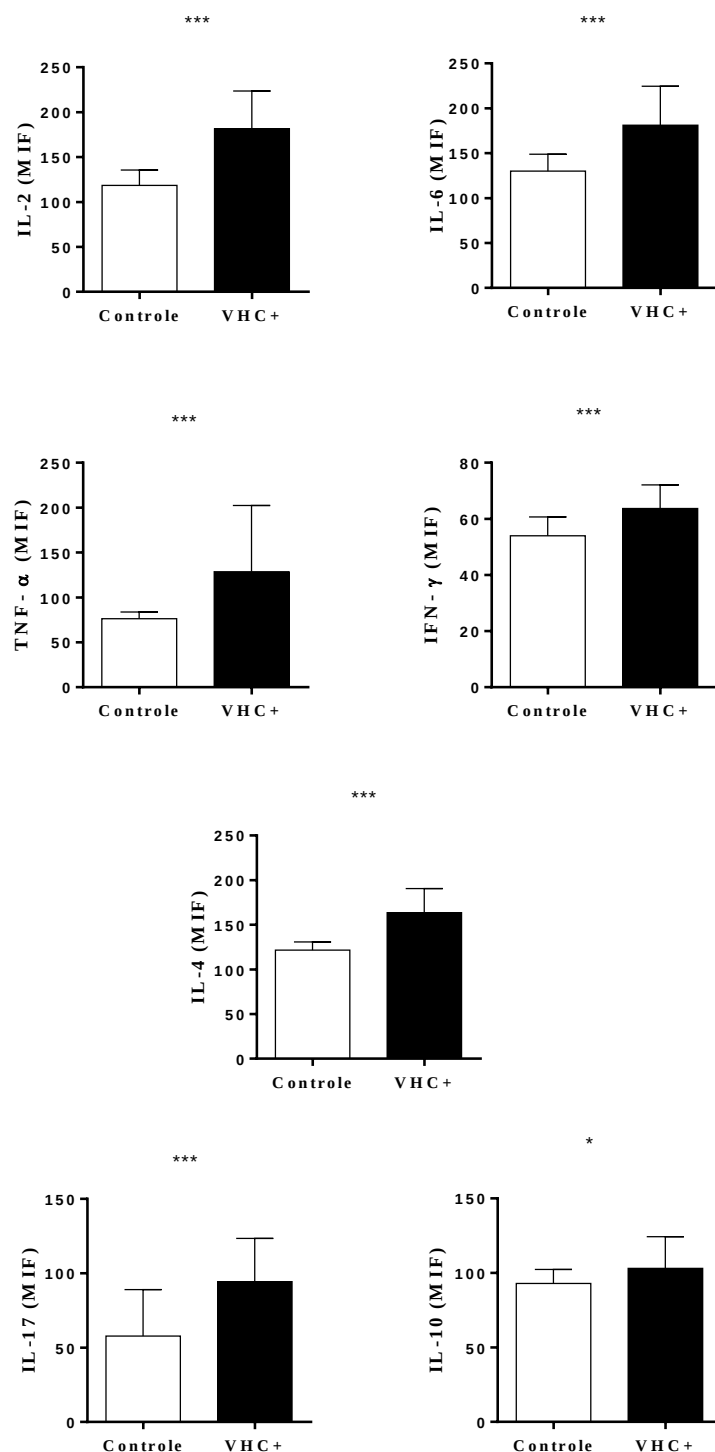
Figura 01

Figura 1. Média de intensidade de fluorescência (MIF) de citocinas séricas IL-2 (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e IFN- γ (D), IL-4 (E), IL-17 (F), IL-10 (G) entre grupo controle (□) e pacientes com Hepatite C (■). As citocinas foram determinadas por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric beads array). Os resultados são expressos com média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não paramétrico *Mann Whitney*. Foi considerada diferença estatística significativa quando $p < 0,05$, representado por “*”.

Figura 02

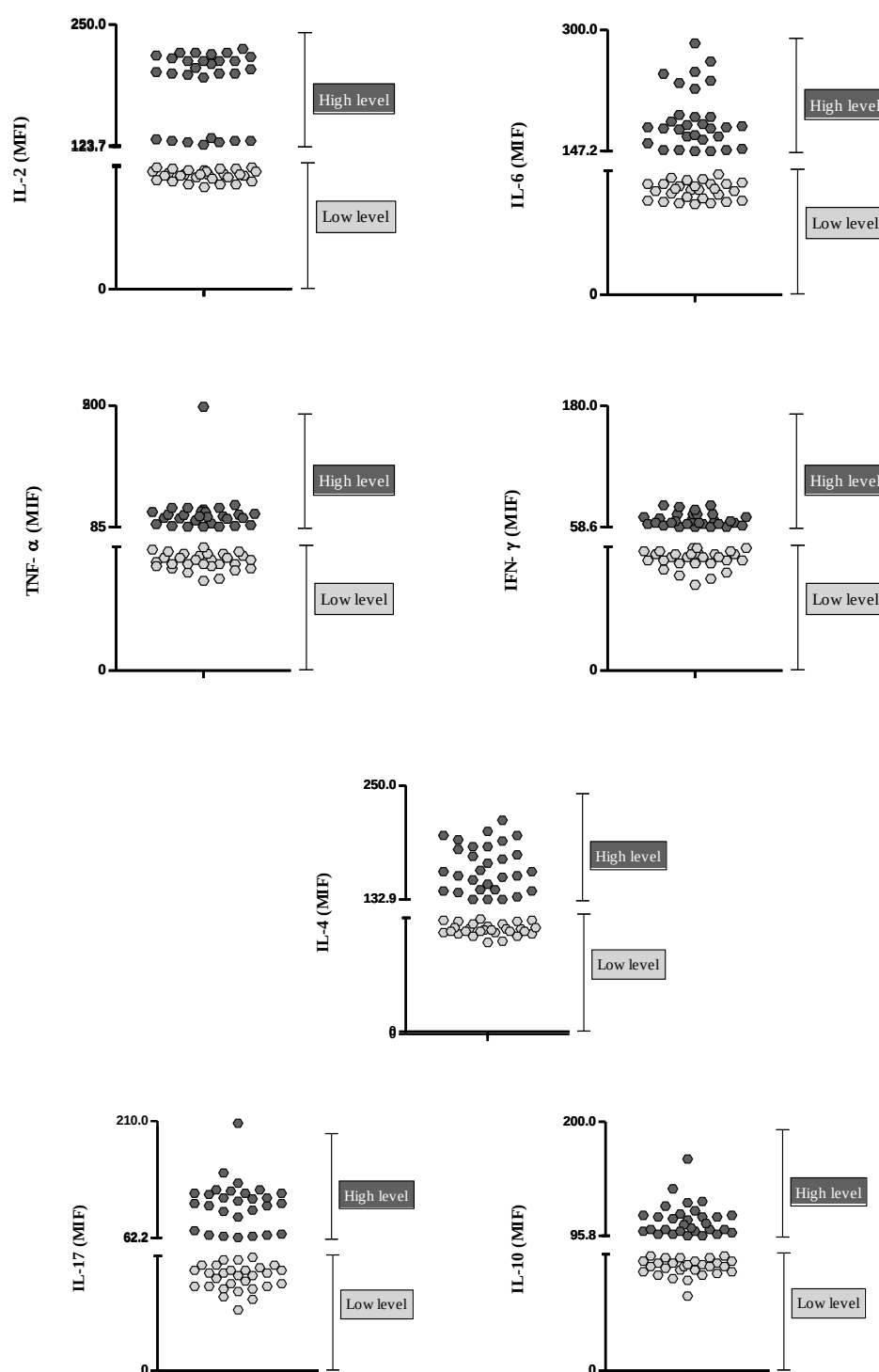


Figura 2. Cut off de citocinas séricas entre grupo controle, pacientes VHC+ fibrose moderada, pacientes VHC+ fibrose avançada. Resultados são apresentados em média de intensidade de fluorescência (MIF). Indivíduos com valor de MIF acima da mediana (*cut off*) foram considerados com alta produção de citocinas (●). Indivíduos com valor de MIF abaixo da mediana (*cut off*) foram considerados com baixa produção de citocinas (○).

Figura 03

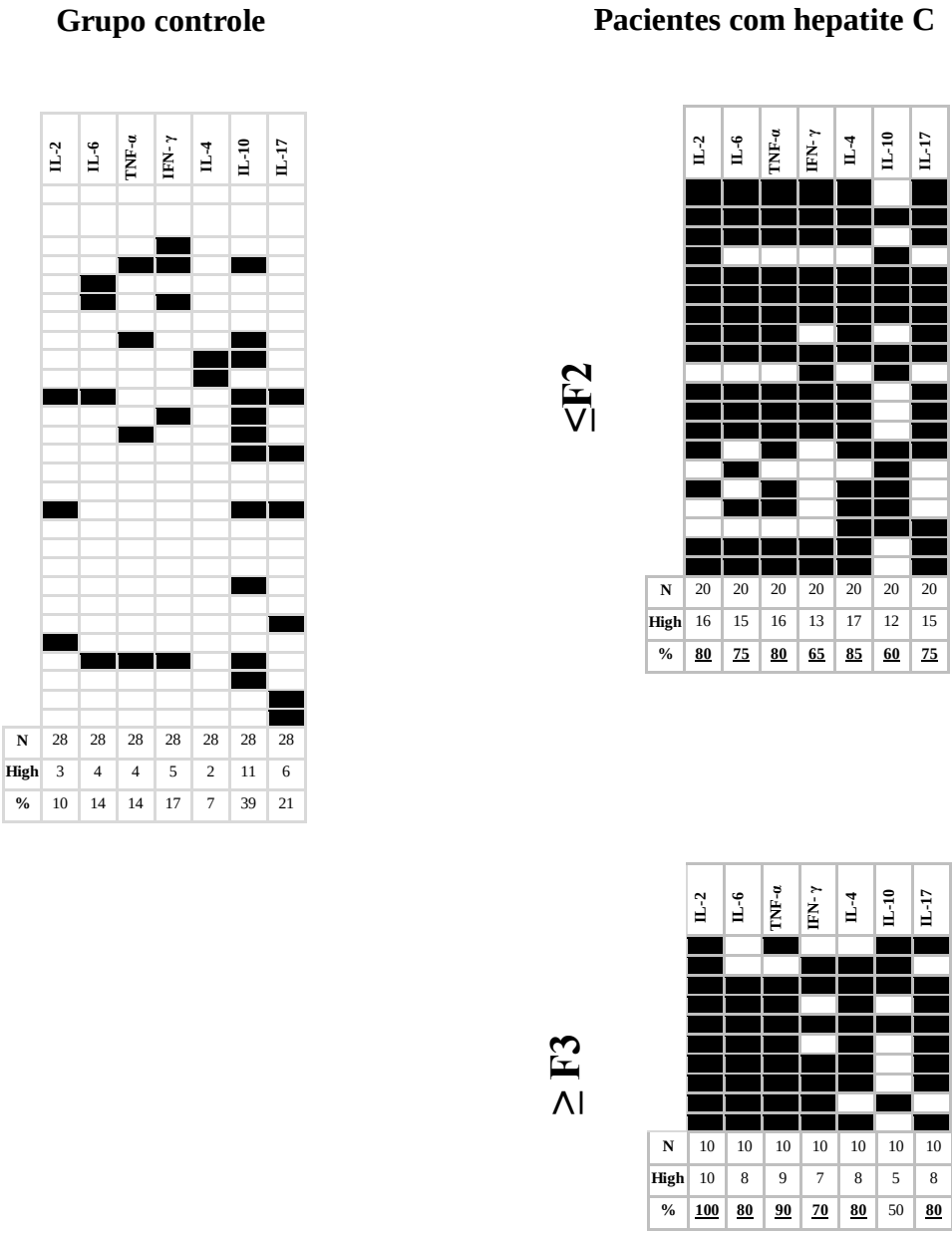


Figura 04

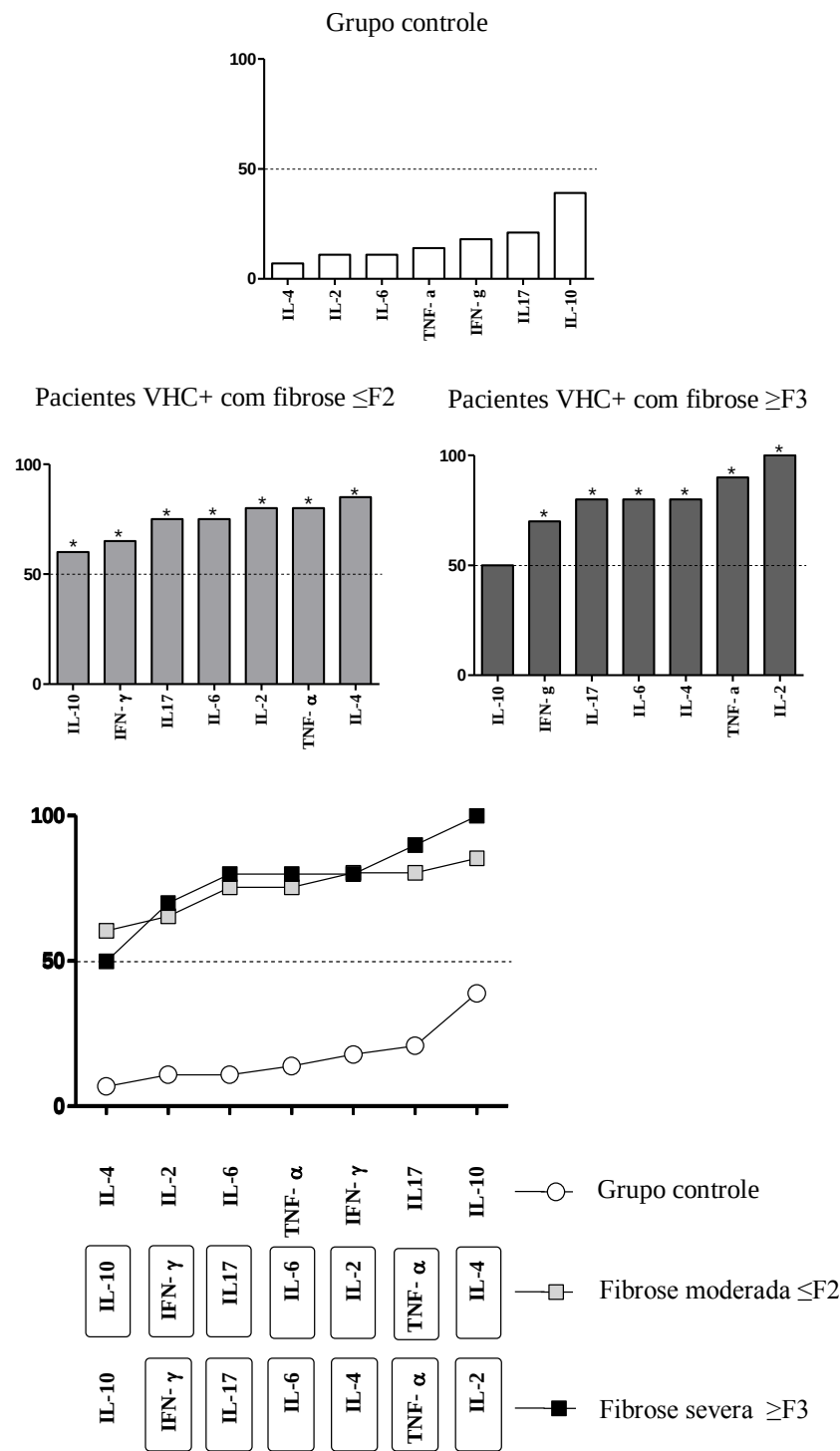


Figura 4: Assinatura de citocinas do grupo controle, pacientes VHC+ com fibrose moderada e paciente VHC+ com fibrose avançada (A). A frequência ascendente de indivíduos com alta produção de citocinas séricas reunidas e expressas no gráfico. A frequência foi considerada relevante quando o valor foi acima do percentil 50 e destacado pelo (*). (B) Sobreposição das assinaturas de citocinas entre grupo controle, pacientes VHC+ com fibrose moderada e paciente VHC+ com fibrose avançada. Foram consideradas relevantes apenas as frequências acima do percentil 50 e destacadas por um retângulo

Figura 5

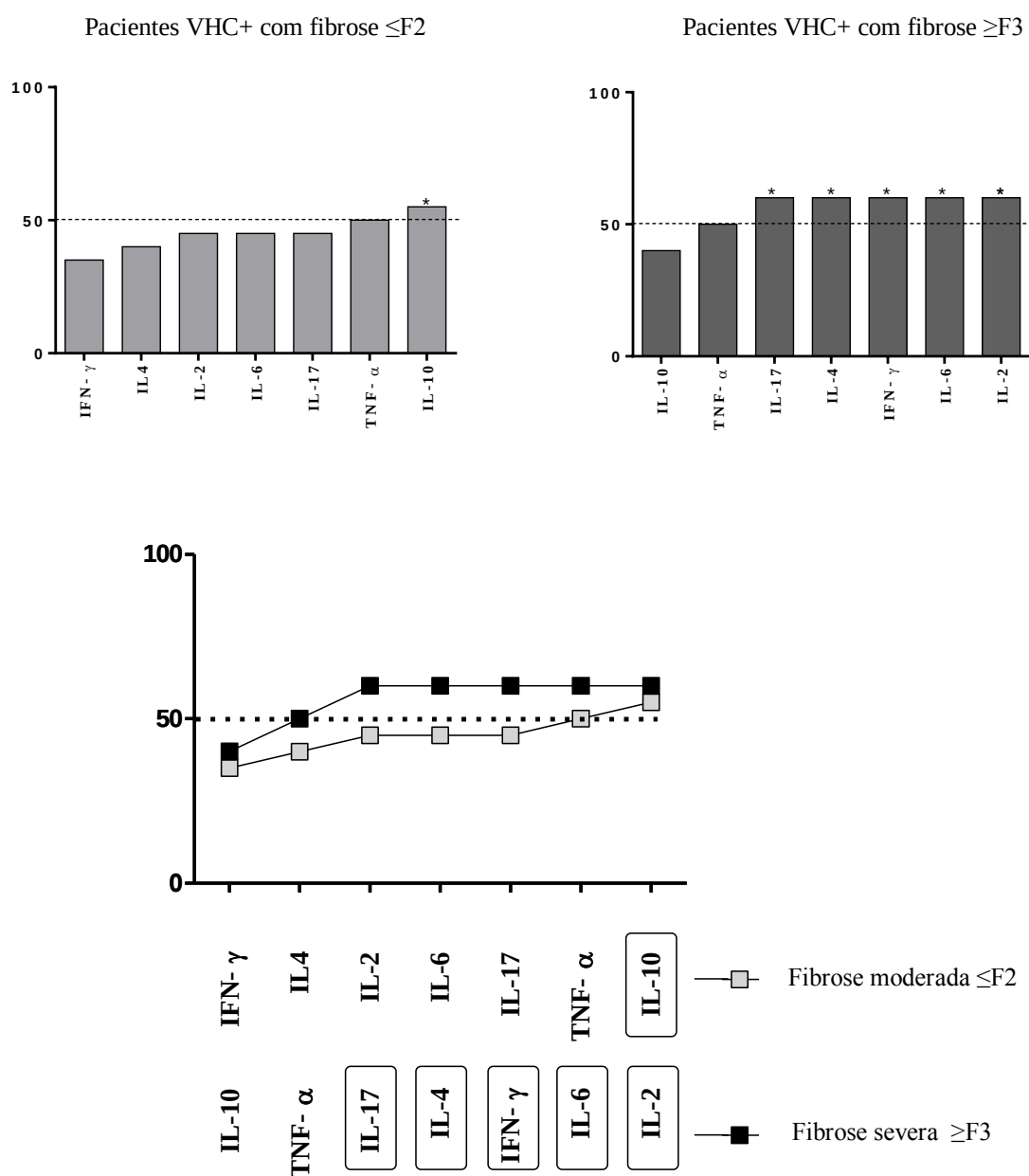


Figura 5: Assinatura de citocinas entre pacientes VCH+ com fibrose moderada e paciente VHC+ com fibrose avançada (A). A frequência ascendente de indivíduos com alta produção de citocinas séricas reunidas e expressas no gráfico. A frequência foi considerada relevante quando o valor foi acima do percentil 50 e destacado pelo (*). (B) Sobreposição das assinaturas de citocinas entre pacientes VCH+ com fibrose moderada e paciente VHC+ com fibrose avançada. Foram consideradas relevantes apenas as frequências acima do percentil 50 e destacadas por um retângulo.

REFERÊNCIAS

1. Shepard, CW; Finelli, L; Alter, MJ. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** Lancet Infect Dis. 5: 558–567, 2005.
2. Alter, M. J. **Epidemiology of hepatitis C virus infection.** World J Gastroenterol. 17: 2436-41, 2007.
3. Lavanchy, D. **Evolving epidemiology of hepatitis C virus.** Clin Microbiol Infec. 17:107–15, 2011.
4. Hajarizadeh, B; Grebely, J; Dore, GJ. **Epidemiology and natural history of HCV infection.** Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Jul 2. doi: 10.1038/nrgastro.2013.107.
5. Gerlach, JT; Diepolder, HM; Zachoval, R; et al. **Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance.** Gastroenterology. 125: 80-88, 2003.
6. Lauer, GM & Walker, BD. **Hepatitis C virus infection.** N Engl J Med. 345:41–52, 2001.
7. Rauch, A; Kutalik, Z; Descombes, P; et al. **Genetic variation in *IL28b* is associated with chronic hepatitis c and Treatment failure: a genome-wide association study.** Gastroenterology. 138:1338–1345, 2010.
8. Rehermann, B. **Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence.** The Journal of Clinical Investigation. 119: 1745-1754, 2009.
9. Hofmann, SR; Ettinger, R; Zhou, YJ; Gadina, M; Lipsky, P; Siegel, R; Candotti, F; O'Shea JJ. **Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis.** Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2:495-506, 2002.
10. Gigi, E; Raptopoulou-gigi, M; Kalogeridis, A; et al. **Cytokine mRNA expression in hepatitis C virus infection: TH1 predominance in patients with chronic hepatitis C and TH1–TH2 cytokine profile in subjects with self-limited disease.** J Viral Hepat. 15: 145-154, 2008.
11. Pawlotsky, JM. **Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease.** Trends Microbiol.12:96-102, 2004.
12. Afdhal, NH & Nunes, D. **Evaluation of liver fibrosis: a concise review.** Am j Gastroenterol. 99:1160-1174, 2004.
13. Ziol, M; Handra, LA; Kettaneh, A; Christidis, C; Mal, F; Kazemi, F; et al. **Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C.** Hepatology. 41: 48- 54, 2005.

14. Luiza-Silva, M; Campi-Azevedo, AC; Batista, MA; Martins, MA; Avelar, RS; Da Silveira Lemos, D; et al. **Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.** J Infect Dis. 204:873–83, 2011.
15. Cacciarelli, TV; Martinez, OM; Gish, RG; Villanueva, JC; Krams, SM. **Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa.** Hepatology. 24: 6-9, 1996.
16. Fan X, Liu W, Li C. **Determination of serum cytokines in individuals with HCV infection.** [Abstract] Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi.14:145-7, 2000.
17. Spanakis, NE; Garinis, GA; Alexopoulos, EC; Patrinos, GP; Menounos, PG; Sklavounou A; Manolis, EN; Gorgoulis, VG; Valis D. **Cytokine serum levels in patients with chronic HCV infection.** J Clin Lab Anal. 16:40-6, 2002.
18. Zhang, L; Miao, L; Han, F; Dou, XG. **Cytokine levels in serum of patients with chronic hepatitis C and its significance** [abstract]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi. 27: 301-3, 2011.
19. Reiser, M; Marousis, CG; Nelson, DR; Lauer, G; Gonzalez-Peralta, RP; Davis GL; et al. **Serum interleukin 4 and interleukin 10 levels in patients with chronic hepatitis C virus infection.** J Hepatol. 26:471-8, 1997.
20. Abayli, B; Canataroglu, A; Akkiz H. **Serum profile of T helper 1 and T helper 2 cytokines in patients with chronic hepatitis C virus infection.** Turk J Gastroenterol. 14:7–11, 2003.
21. Chen, TY; Hsieh, YS; Wu, TT; Yang, SF; Wu, CJ; Tsay, GJ; et al. **Impact of serum levels and gene polymorphism of cytokines on chronic hepatitis C infection.** Transl Res. 150:116-21, 2007.
22. Sofian, M; Aghakhani, A; Farazi, AA; Banifazl, M; Eslamifar, A; Rashidi, N; Sadegh, AK; Ramezani, A. **Serum Profile of T Helper 1 and T Helper 2 Cytokines in Hepatitis C Virus Infected Patients.** Hepatitis Monthly. Hepat Mon. 2012;12:e6156.
23. Wick, G; Grundtman, C; Mayerl, C; Florian, T; et al. **The Immunology of Fibrosis.** Annu. Rev. Immunol. 31:107–35, 2013.
24. Sobue, S; Nomura, T; Ishikawa, T; Ito, S; Saso, K; Ohara, H; et al. **Th1/Th2 cytokine profiles and their relationship to clinical features in patients with chronic hepatitis C virus infection.** J Gastroenterol. 36:544-51, 2001.
25. Yamaki, K; Uchida, H; Li, X; Yanagisawa, R; Takano, H; Hayashi, H; et al. **Effect of varying types of anti-arthritic drugs on Th1 and Th2 immune responses in mice.** Int J

- Immunopathol Pharmacol. 18:133-44, 2005.
26. Steinbrink, K; Wolfl, M; Jonuleit, H; Knop, J; Enk, AH. **Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.** J Immunol. 10: 4772–4780, 1997.
 27. Taylor, A; Akdis, M; Joss, A; et al. **IL-10 inhibits CD28 and ICOS costimulations of T cells via src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1.** J Allergy Clin Immunol. 120: 76–83, 2007.
 28. Cox, AL; Mosbruger, T; Lauer, GM; Pardoll, D; Thomas, DL; Ray, SC. **Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C.** Hepatology. 42: 104–112, 2005.
 29. Mege, JL; Meghari, S; Honstettre, A; Capo, C; Raoult, D. **Two faces of interleukin 10 in human infectious diseases.** Lancet Infect Dis. 6:557–69, 2006.
 30. Miyazoe, S; Hamasaki, K; Nakata, K; Kajiya, Y; Kitajima, K; Nakao, K; et al. **Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus.** Am J Gastroenterol. 97:2086–92, 2002.
 31. Aroucha, DC; do Carmo, RF; Moura, P; Silva, JL; Vasconcelos, LR; Cavalcanti, MS. **High tumor necrosis factor- α /interleukin-10 ratio is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C.** Cytokine 62: 421–425, 2013.
 32. Nelson, DR; Lauwers, GY; Lau, JY; Davis, GL. **Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders.** Gastroenterology. 118:655–60, 2000.
 33. Louis, H; Le, MO; Peny, MO; Quertinmont, E; Fokan, D; Goldman, M; et al. **Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice.** Hepatology. 25:1382–9, 1997.
 34. Thompson, K; Maltby, J; Fallowfield, J; Mcaulay, M; Millward-Sadler, H; Sheron, N. **Interleukin-10 expression and function in experimental murine liver inflammation and fibrosis.** Hepatology. 28:1597–606, 1998.