

Luiz Otávio Freire Cangussu

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS
DE CLASSE II E A HEPATITE C CRÔNICA**

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2008

Luiz Otávio Freire Cangussu

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS
DE CLASSE II E A HEPATITE C CRÔNICA**

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Gastroenterologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosângela Teixeira
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais

Co-Orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho, Doutor em Imunologia, Pesquisador Titular.
Fundação Osvaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG

2008

C222a Cangussu, Luiz Otávio Freire.
Associação entre antígenos leucocitários humanos de classe II e a
hepatite C crônica [manuscrito]. / Luiz Otávio Freire Cangussu. - - Belo
Horizonte: 2008.
82f.: il.
Orientadora: Rosângela Teixeira.
Co-orientador: Olindo Assis Martins Filho.
Área de concentração: Gastroenterologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Hepatite C Crônica. 2. Antígenos HLA. 3. Cirrose Hepática. 4.
Dissertações Acadêmicas. I. Teixeira, Rosângela. II. Martins Filho, Olindo
Assis. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
IV. Título

NLM: WC 536

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

Vice-Reitora: Profa. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Jaime Arturo Ramirez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

Sub-coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. João Lúcio dos Santos Jr.

Chefe do Departamento de Clínica Médica: Prof. José Carlos Bruno da Silveira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Área de Concentração em Gastroenterologia: Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina – Área de Concentração em Gastroenterologia :

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Profa. Cláudia Alves Couto

Profa. Luciana Dias Moretzsohn

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Luiz Fernando Veloso (Representante Discente)

DEDICATÓRIA

À Luciane e Beatriz, pelo amor e compreensão.

À memória de meu pai Tertuliano, e à minha mãe Helena que sempre incentivaram meu aperfeiçoamento profissional.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Rosângela Teixeira, Profa. Associada do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG pelos ensinamentos, incentivos constantes e orientação desta tese.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho, Doutor em Imunologia, Pesquisador Titular, Chefe do Laboratório de Doença de Chagas, Instituto Osvaldo Cruz, Belo Horizonte, pelas valiosas sugestões, ensinamentos e orientação desta tese.

À Profa Dra. Maria Gerbase de Lima, Dra. em Imunologia, Profa. Livre-Docente da Universidade de São Paulo. Profa. Associada da disciplina de Alergia, Imunologia Clínica e Reumatologia do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de São Paulo, pela colaboração, ensinamentos e orientação na genotipagem dos alelos HLA, imprescindíveis para a realização deste projeto.

À Érika Ferreira Campos, Médica, Mestre em Nefrologia e pesquisadora do Instituto de Imunogenética da Universidade Federal de São Paulo, pela organização, planejamento e análise estatística descritiva deste estudo.

À Gisele Fabiane Rampim, Bióloga, Mestre e pesquisadora do Instituto de Imunogenética da Universidade Federal de São Paulo, pela coordenação da genotipagem dos alelos HLA.

À Profa. Dra. Virgínia Hora Rios Leite, pelos ensinamentos e pela revisão das lâminas de biópsias dos pacientes deste estudo.

À Profa. Dra. Lúcia Porto Fonseca, pelos ensinamentos e pela revisão das lâminas de biópsias dos pacientes deste estudo.

À Profa. Sueli Aparecida Mingoti, PhD. em estatística, Profa. Associada do Instituto de Ciências Exatas-ICEX da UFMG, pela orientação de toda a análise estatística deste estudo.

Ao Ivair Ramos Silva, Mestre em estatística, pela realização da análise estatística deste estudo.

À Rachel Muinhos, Bióloga, bolsista do Instituto Osvaldo Cruz, pelo trabalho cuidadoso na extração de DNA dos leucócitos dos pacientes.

Aos Acadêmicos do curso de Medicina da UFMG Carla dos Santos Simões, Rafael Augusto Castro Santiago Brandão, Lorraine Eloi Silva e Rafaela Cabral Fabiano, pelo auxílio na assistência aos pacientes e preenchimento do banco de dados.

Aos colegas da Pós-Graduação e do Ambulatório de Hepatites Virais, pelo trabalho em prol dos pacientes.

À Simone Veloso Faria de Carvalho, Gerente do Centro de Saúde Vista Alegre, da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, pelo apoio constante, incentivo e amizade.

À FAPEMIG E CNPq que apoiaram financeiramente este projeto.

Aos Pacientes que colaboraram em participar desse estudo, principais sujeitos do meu trabalho.

À Pós-Graduação em Medicina da UFMG por ter propiciado minha formação como pesquisador.

À Amanda Damasceno de Souza, pelo cuidadoso trabalho de organização e formatação do texto.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a realização deste estudo.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A influência de fatores imunogenéticos para iniciar ou regular a resposta imune na hepatite C crônica tem sido amplamente investigada recentemente. Os antígenos leucocitários humanos (HLA) constituem um dos fatores genéticos associados à suscetibilidade à infecção pelo HCV e à progressão da fibrose hepática. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar a influência dos alelos HLA de classe II DRB1 e DQB1 em pacientes portadores de hepatite C crônica.

PACIENTES E MÉTODOS: 99 pacientes com diagnóstico confirmado de hepatite C crônica (anti-HCV positivo, HCV RNA positivo) e de cor branca foram incluídos. 48/99 (48,5%) eram masculinos, média de idade de $51,5 \pm 12$ anos. A média do tempo de infecção foi $22,2 \pm 9,3$ anos. As biópsias hepáticas foram categorizadas segundo o escore METAVIR em fibrose avançada/cirrose (METAVIR F3-4) ou sem cirrose (METAVIR F0-2). 49/99 (49,5%) eram cirróticos. 103 indivíduos sadios brancos da população geral de São Paulo com tipagem HLA constituíram o grupo controle histórico (Morgun *et al.*, 2004). Pacientes e controles foram pareados por sexo e idade. As frequências fenotípicas (Ff) dos alelos HLA-DRB1*11, HLA-DRB1 (DRB1*1-16) e HLA-DQB1* foram determinadas pela PCR-SSP em ambos os grupos.

RESULTADOS: As frequências fenotípicas (Ff) do HLA-DRB1*11 foram 11/99 (11,1%) e 22/103 (21,4%) em pacientes e controles ($p=0,037$ OR=0,46 IC95% 0,00–0,95). As Ff foram semelhantes entre pacientes com fibrose avançada/cirrose ($n=6/49$, Ff:12,2%) e sem cirrose ($n=5/50$, Ff:10,0%) ($p=0,76$). Ao se comparar as Ff dos alelos DRB1*1101 e DRB1**1104 entre pacientes e controles, notou-se menor Ff entre pacientes, porém sem significância estatística (DRB1*1101= 7/99 [7,1%] vs 13/103 [12,6%]) e DRB1*1104= (4/99 [4%] vs 8/103 [7,8%] entre pacientes e controles, respectivamente) ($p=0,24$ e $p=0,37$). Na análise estendida, os resultados evidenciaram maior Ff do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes quando comparados aos controles (34,4% e 20,4%, $p=0,04$ OR=2,04 CI95% 1,03-4,09). Contudo, entre pacientes, categorizados como cirróticos e não cirróticos, observou-se maior Ff do

alelo HLA-DQB1*0501 em não cirróticos (F0-2)=21/48 [43,8%], F3-4=12/48 [25,0%]; $p=0,04$ OR=0,43 IC 95% 0,00-0,97). Na análise multivariada, a idade por ocasião da biópsia hepática e a presença do alelo HLA-DQB1*0501 foram fatores independentes associados à probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose ($p=0,002$ OR=1,06 IC 95% 1,02-1,11 e $p=0,026$ OR=0,34 IC95% 0,13-0,88, respectivamente).

CONCLUSÕES: A menor Ff do HLA-DRB1*11 em portadores do HCV pode sugerir um papel protetor desse alelo contra a infecção por esse vírus, enquanto a maior Ff do alelo HLA-DQB1*0501 em portadores de hepatite C crônica pode significar maior suscetibilidade à infecção pelo HCV. Não obstante, a maior Ff do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes sem cirrose, quando comparada à de cirróticos, pode significar proteção, conferida por esse alelo, contra a progressão da fibrose hepática para estádios mais avançados. Estes resultados contribuem para corroborar a provável influência dos fatores imunogenéticos na história natural da hepatite C crônica.

Palavras-chave: hepatite C crônica; antígenos HLA classe II, fibrose hepática.

ABSTRACT

Background/Aims: The influence of immunogenetic factors to initiate or regulate the immune response in chronic hepatitis C has been explored recently. Human leucocyte antigen (HLA) is a crucial genetic factor related to susceptibility to HCV infection and progression of HCV liver injury. Hence, the aim of this study was to investigate the relationship of class II alleles HLA-DRB1 and DQB1 in patients with chronic hepatitis C.

Methods: Ninety-nine white patients with confirmed chronic hepatitis C (anti-HCV and HCV RNA tests positive) were included: 48/99 (48.5%) were male, mean age of 51.5 ± 12 anos, and mean time of HCV infection of 22.2 ± 9.3 years. Liver fibrosis, scored by METAVIR, was categorized as severe fibrosis/cirrhosis (METAVIR F3-4) or without cirrhosis (METAVIR F0-2). 49/99 (49.5%) patients were cirrhotic. Patients were matched with 103 uninfected historical controls of general population of São Paulo (Brazil) (Morgun *et al.*, 2004) and their class II allele fenotipic frequencies (Ff) were compared. HLA-DRB1*11, HLA-DRB1 (DRB1*1-16) e HLA-DQB1* alleles were determined by PCR-SSP in both groups.

Results: The Ff of HLA-DRB1*11 were 11/99 (11.1%) and 22/103 (21.4%) in patients and controls ($p=0.037$ OR=0.46 IC95% 0.00–0.95). The Ff did not differ among patients with advanced fibrosis/cirrhosis ($n=6/49$, Ff:12.2%) and without cirrhosis ($n=5/50$, Ff:10,0%) ($p=0.76$). When the Ff of alleles DRB1*1101 and DRB1*1104 were compared between patients and controls, a lower Ff was noted in patients, but without statistical significance (DRB1*1101= 7/99 [7.1%] vs 13/103 [12.6%]) and DRB1*1104= (4/99 [4%] vs 8/103 [7.8%] in patients and controls, respectively) ($p=0.24$ e $p=0.37$). In an extended analysis, the results highlighted an increased phenotypic frequency of HLA-DQB1*0501 allele in patients with chronic hepatitis C compared to controls (34.4% and 20.4%, $p=0.04$ OR=2.04 CI95% 1.03-4.09), especially when non-cirrhotic group was compared to severe fibrosis/cirrhosis group (43.8% and 25.0%, $p=0.04$ OR=0.43, CI95% 0.00-0.97). The multivariate analysis revealed that the age at biopsy and the presence of the allele HLA-DQB1*0501 were

independent variables associated with severe fibrosis/cirrhosis ($p=0.002$ OR=1.06 IC 95% 1.02-1.11 and $p=0.026$ OR=0.34 IC95% 0.13-0.88).

Conclusions: HLA-DRB1 allele might play a role in the protective mechanisms against HCV infection, in particular the HLA-DRB1*11 specificity. Although a higher frequency of HLA-DQB1*0501 represent a predisposing factor to chronic hepatitis C, it may also confers lower risk of developing more severe liver fibrosis. Our extended HLA analysis corroborates the influence of immunogenetic factors influencing the clinical course of chronic hepatitis C.

Key-words: Chronic hepatitis C, HLA antigens, liver fibrosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática da organização genética do genoma do HCV.....	21
FIGURA 2 - Mapa esquemático do MHC humano	27
FIGURA 3 - As ligações das moléculas MHC.	28
FIGURA 4 - Fenda de ligação ao peptídeo MHC de classe II.	29
FIGURA 5 - Exemplo de tipagem HLA-DRB1*11 alta resolução por PCR-SSP.....	51
FIGURA 6 - Exemplo de tipagem HLA-DQB1*0301 alta resolução por PCR-SSP....	51
FIGURA 7 - Frequência fenotípica das especificidades do HLA-DRB1* (DRB1*01-16) em pacientes portadores de hepatite C crônica.	54
FIGURA 8 - Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1* em pacientes portadores de hepatite C crônica	57
FIGURA 9 - Estimativas para as probabilidades dos pacientes apresentarem fibrose hepática avançada ou cirrose, conforme a idade e a presença ou não do alelo HLA-DQB1*0501.	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características dos estudos incluídos na metanálise da associação entre os alelos HLA de classe II DRB1*1101 e DQB1*0301 e o clareamento viral espontâneo do HCV.	34
TABELA 2 - Classificação METAVIR do grau de atividade necroinflamatória.	43
TABELA 3 - Classificação METAVIR do estágio de fibrose hepática.	43
TABELA 4 - Motivos de exclusão dos pacientes.	44
TABELA 5 - Características demográficas, virológicas, histológicas e bioquímicas de 99 portadores de hepatite C crônica.	47
TABELA 6 - Características de 99 portadores de hepatite C crônica categorizados pelo estágio de fibrose.	48
TABELA 7 - Comparação entre as frequências fenotípicas dos alelos HLA-DRB1* entre pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) e o grupo controle não infectado.	53
TABELA 8 - Comparação entre as frequências fenotípicas do alelo HLA-DRB1*11 em pacientes infectados pelo HCV e o grupo controle não infectado.	54
TABELA 9 - Comparação entre as frequências fenotípicas dos alelos HLA-DQB1* em indivíduos infectados pelo HCV e o grupo controle não infectado.	56
TABELA 10 - Distribuição da frequência fenotípica do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes infectados pelo HCV entre os estádios categorizados em F0-2 e F3-4, independente do tempo de infecção.	58
TABELA 11 - Probabilidades estimadas de o paciente ter escore METAVIR F3-4 de acordo com a idade e de possuir ou não o alelo HLA-DQB1*0501.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- Atividade inflamatória pelo escore METAVIR
AASLD	- Associação Americana para o estudo de doenças do fígado (do Inglês, <i>American Association for Study of liver diseases</i>)
AHEV	- Ambulatório de hepatites virais
ALT	- Alanino aminotransferase
AST	- Aspartato aminotransferase
cDNA	- DNA complementar
CVE	- Clareamento viral espontâneo
DHGNA	- Doença hepática gordurosa não alcoólica
DNA	- Ácido desoxiribonucléico
DP	- Desvio padrão
EDTA	- etilenodiamina (do inglês, <i>Diamino ethane tetraacetic acid</i>)
ELISA	- Método imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>) Imunoenzimático
F	- Gênero feminino ou estágio de fibrose METAVIR (de acordo com o contexto)
Ff	- Frequência fenotípica
HBV	- Vírus da hepatite B
HC	- Hospital das Clínicas
HCV	- Vírus da hepatite C
HIV	- Vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	- Antígenos leucocitários humanos
IAG	- Instituto Alfa de Gastroenterologia
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	- Intervalo de confiança
ICEX	- Instituto de Ciências Exatas
IL	- Interleucina
IMC	- Índice de massa corpórea
KIR	- Receptores das células naturais assassinas (do inglês, <i>immunoglobulin-like receptors</i>)

LPF	- Lúcia Porto Fonseca
LSN	- Limite superior do normal
LTCD4+	- Linfócito T auxiliar
LTCD8+	- Linfócito T citotóxico
M	- Gênero masculino
MS	- Ministério da Saúde
METAVIR	- Classificação histopatológica do grau de atividade necroinflamatória e estágio de fibrose hepática
MHC	- Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
n	- Número de indivíduos
Nm	- Nanômetro
NK	- Células naturais assassinas (do inglês, <i>natural killer cells</i>)
NS	- Não-estrutural ou Não significativo (de acordo com o contexto)
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OR	- Razão de chances (<i>Odds Ratio</i>)
ORF	- Região aberta de leitura
p	- Probabilidade de significância
pc	- Probabilidade de significância corrigida pelo método de Bonferroni
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
PCR-SSP	- Iniciadores seqüência específicos (do inglês, <i>Sequence Specific Primers</i>)
RNA	- Ácido ribonucléico
RVS	- Resposta virológica sustentada
RR	- Risco relativo
sDR	- Antígeno HLA-DR solúvel
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-beta	- Fator de crescimento tumoral β (do inglês, <i>tumor growth factor beta</i>)
USA	- Estados Unidos da América (do inglês, <i>United States of América</i>)
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
VHRL	- Virgínia Hora Rios Leite
X ²	- Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1- Aspectos clínicos e epidemiológicos da hepatite C	20
2.1-1- O vírus da hepatite C	20
2.1.2- Epidemiologia da hepatite C	21
2.1.3- História natural da hepatite C	23
2.2- O complexo principal de histocompatibilidade	24
2.2.1- O MHC e as doenças	30
2.2.2- O MHC e a hepatite C	32
2.2.2.1 <i>Relação entre o MHC e o clareamento do HCV</i>	32
2.2.2.2 <i>Associação entre o MHC e a hepatite C crônica</i>	35
2.2.2.3 <i>Associação entre o MHC, os genótipos e a hepatite C crônica</i>	38
2.2.2.4 <i>Associação entre o MHC e a resposta terapêutica na hepatite C</i>	38
3. OBJETIVOS	41
3.1- Objetivo geral	41
3.2- Objetivos específicos	41
4. PACIENTES E MÉTODOS	42
4.1- Pacientes	42
4.1.1- Características da população de estudo	45
4.2- Procedimentos laboratoriais	48
4.2.1 Genotipagem dos alelos HLA	48
4.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
5. RESULTADOS	53
5.1- Menor frequência fenotípica da especificidade HLA-DRB1*11 foi observada em portadores de hepatite C quando comparada com o grupo controle.	53
5.2- A frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1*11 não diferiu entre pacientes com hepatite C crônica quando comparados com controles.	54
5.3- Maior frequência fenotípica do alelo HLA-DQB1*0501 foi observada em pacientes com hepatite C crônica quando comparados com controles.	55
5.4- O alelo HLA-DQB1*0501 é mais freqüente em pacientes não cirróticos	57

5.5- Associação das variáveis demográficas e genéticas (alelo) com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose, através do modelo de regressão logística múltipla	58
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÕES	66
8. PROPOSIÇÕES PARA INVESTIGAÇÕES SUBSEQÜENTES.....	67
9. REFERÊNCIAS.....	68
10. ANEXOS	78

1. INTRODUÇÃO

A identificação do vírus da hepatite C (HCV) por Choo *et al.* (1989) permitiu o reconhecimento de uma verdadeira pandemia de hepatite C, um dos maiores desafios para a saúde pública do atual milênio. Anteriormente atribuída à hepatite pós-transfusional não-A e não-B, a hepatite C tem motivado as crescentes investigações a respeito de seus aspectos epidemiológicos, história natural, imunopatogênese e tratamento, e as razões que contribuem para que o HCV se caracterize como um dos mais persistentes entre os vírus conhecidos.

As razões para explicar as altas taxas de cronicidade na infecção pelo vírus C, de 55 a 85% (Pearlman, 2004; Alberti, *et al.*, 2005), vêm sendo amplamente investigadas. O HCV replica a uma taxa extraordinária de 10^{12} vírions ao dia pela ação de seu RNA dependente da RNA polimerase, o que favorece a seleção de variantes virais pela pressão seletiva da resposta imune celular e humoral. Esse fato pode levar à emergência de mutações do HCV, chamadas quasispécies, um dos mecanismos de escape desse vírus à ação do sistema imune (Thimme *et al.*, 2006).

O tratamento da hepatite C tem evoluído rapidamente nos últimos anos. Após o advento dos interferons peguilados associados à ribavirina, houve substancial aumento das chances de resposta virológica sustentada (RVS). Assim, são descritos índices de RVS de cerca de 80% nos casos de infecção pelos genótipos 2 e 3 e próximos de 50% para o genótipo 1 (Manns *et al.*, 2001, Fried *et al.*, 2002, Hadzyannis *et al.*, 2004). O tratamento é complexo em razão de eventos adversos, como intolerância, contra-indicações, altas taxas de interrupção ou redução de doses que interferem na resposta virológica, e do alto custo para o sistema público de saúde.

No Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das clínicas da UFMG (AHEV/IAG/HC/UFMG) segue-se o protocolo de assistência, em conformidade com as normas preconizadas para o atendimento desses pacientes (MS/BRASIL, Portaria 863, 2002; AASLD/Strader *et al.*, 2004/).

Mais recentemente, Bruijne *et al.* (2008) relataram taxas de RVS de 41 a 52% em pacientes portadores do genótipo 1, quando tratados por 48 semanas com interferon peguilado. Foram observadas taxas de RVS que variaram de 79 a 93% com tratamento por 24 semanas para pacientes com genótipos 2 e 3, semelhante às taxas de RVS de 76 a 88% com tratamento por 48 semanas. Esses autores relataram, a partir de três trabalhos randomizados e um não randomizado, que o tratamento para pacientes com genótipos 1 e 4 pode ser por 24 semanas quando houver negativação do RNA HCV na quarta semana de tratamento (resposta virológica rápida), e por 12 a 16 semanas para pacientes com genótipos 2 e 3. Entretanto, estes resultados deverão ser confirmados em outros trabalhos controlados e randomizados. Portanto, a duração do tratamento antiviral é dependente do genótipo e da carga viral do RNA do HCV ao início do tratamento.

A célula hepática estrelada, ou célula de Ito, tem sido extensivamente investigada nos últimos anos, em razão de sua importância no processo fibrogênico, quando ativada por agentes agressores de diversas etiologias: virais, álcool, auto-ímmunes, metabólicos e tóxicos, entre outros. A reversão da fibrose hepática, um novo paradigma dos anos recentes, tem sido demonstrada em estudos experimentais e em humanos (Bedossa e Paradis, 1995; Li e Friedman, 1999; Nelson *et al.*, 2000; Friedman 2003, 2004, 2005; Friedman e Bansal, 2006).

Embora ainda controverso, tem-se discutido amplamente na literatura que são os fatores do hospedeiro e não os virais os mais importantes na história natural da hepatite C (Powell *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2005; Poynard *et al.*, 2001, 2003a; Pearlman, 2004; McHutchinson, 2004; Shepard *et al.*, 2005; Massard *et al.*, 2006; Boccatto *et al.*, 2006; Lloyd *et al.*, 2007).

Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são moléculas glicoprotéicas presentes na superfície de membrana de todas as células do organismo. Esses antígenos são produtos gênicos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), presentes no braço curto do cromossomo 6 humano. Sabe-se que o HLA de classe I se liga a linfócitos LTCD8+ e os de classe II aos linfócitos LTCD4+. Essa seleção

determinante de o linfócito ser LTCD4+ ou LTCD8+ ocorre no timo, órgão onde ocorre o contato dos linfócitos T com suas células epiteliais.

A grande importância dos alelos HLA é que o seu polimorfismo peculiar os torna notáveis na ativação da resposta imune através da sua enorme capacidade de ligar peptídeos virais em sua fenda molecular. Estima-se que uma célula apresente cerca de 100.000 a 300.000 moléculas HLA de classe I ou II em sua superfície (Klein e Sato, 2000). Uma vez que todas as moléculas HLA expressas na superfície celular contêm peptídeos, cada célula pode expor, em sua superfície, milhares de peptídeos. A afinidade de ligação peptídeo-HLA é inferior ao da ligação antígeno-anticorpo, porém com constantes de dissociação lentas, de horas a dias, o bastante para permanecer ligado ao peptídeo viral até ser apresentado aos LTCD4+ e culminar com a ativação e a amplificação da resposta imune (Klein e Sato, 2000).

A ligação de determinados peptídeos são fenômenos cruciais na eliminação ou não do agente agressor (Klein e Sato, 2000; Ward *et al.*, 2002; Abbas e Lichtman, 2005a). Anteriormente atribuídos somente à rejeição de enxertos, tem-se reconhecido, na atualidade, novas associações entre HLA e doenças, a partir do primeiro relato da associação entre doença de Hodgkin e HLA-B5-B35-B18 em 1967, (Rood, 2004). Assim, tem-se intensificado, nos últimos anos, as pesquisas a respeito de sua importância e função na apresentação de antígenos virais aos linfócitos T CD4+ e T CD8+ visando eliminar a infecção viral do hospedeiro (Klein e Sato, 2000; Harcourt, *et al.*, 2001; Hong, *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2007). Por exemplo, Wang *et al.* (2005) realizaram estudo de associação entre alelos HLA e carga viral (CV) e concluíram que pacientes com o haplótipo A*34, B*56, DRB1*1502 possuíam CV significativamente inferior à daqueles sem esses alelos ($p=0,0074$, $0,0039$ e $0,016$ respectivamente). Ao contrário, os pacientes com HLA-B*4001 apresentavam CV significativamente mais elevada do que os indivíduos sem esse alelo ($p=0,0026$).

Há cerca de uma década diversos estudos têm reportado a participação do MHC de classes I e II na eliminação do vírus HCV, especialmente o MHC de classe II. Assim, há evidências que sugerem que o clareamento viral espontâneo (Minton *et al.*, 1998; Thursz *et al.*, 1999; Mangia *et al.*, 1999; Mckiernan *et al.*, 2000; Harcourt *et al.*, 2001;

Lloyd *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2008) ou a evolução para a cronicidade (Peano *et al.*, 1994; Zavaglia *et al.*, 1998; Kuzushita *et al.*, 1998; Corghi, 2005) na infecção pelo HCV dependem, entre outros fatores, da herança de determinados alelos MHC. Esses estudos de clareamento viral foram confirmados em duas metanálises (Yee, 2004; Hong *et al.*, 2005).

Outros estudos também têm demonstrado que alelos HLA específicos possuem relação com a evolução da hepatite C crônica para os diversos estádios de fibrose, que varia de discreta a acentuada, ou cirrose, em diferentes indivíduos (Peano *et al.*, 1994; Kuzushita *et al.*, 1998; Asti *et al.*, 1999). Por exemplo, há relatos de que o alelo DQB1*0501 pode estar associado ao clareamento viral espontâneo (McKiernan *et al.*, 2000; Thio *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007) ou proteção contra a evolução para cirrose hepática (Thursz *et al.*, 1999).

Em síntese, têm-se demonstrado que a herança de determinados alelos HLA têm influência no desfecho da infecção pelo HCV: no clareamento viral, na persistência do HCV e na evolução da fibrose hepática para os diversos estádios. Contudo, a despeito da recente ampliação de relatos da associação entre os alelos HLA, especialmente os de classe II e a hepatite C em populações européias, americanas e japonesas, são, ainda, escassas, as investigações dessa associação na população brasileira. Portanto, a identificação desses alelos em portadores de hepatite C crônica na população do sudeste do Brasil é oportuna e necessária uma vez que o seu conhecimento poderá contribuir, juntamente com outros fatores, para ampliar o conhecimento a respeito de diversos aspectos evolutivos da hepatite C crônica no nosso meio.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Aspectos clínicos e epidemiológicos da hepatite C

2.1-1- O vírus da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) é constituído de uma fita simples de ácido ribonucléico (RNA) envolvido por um nucleocapsídeo (core) que, por sua vez, é envolvido por um envelope protéico. Este vírus foi descoberto e clonado por Choo *et al.*, (1989), e pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Hepacivirus*.

Trata-se de um vírus constituído por uma partícula esférica de 55 nanômetros (nm) de diâmetro à microscopia eletrônica. Seu genoma possui 9333 a 9397 nucleotídeos de comprimento e uma região aberta de leitura (ORF) que codifica uma proteína de aproximadamente 3010 a 3033 aminoácidos. Esta proteína é clivada em pelo menos quatro proteínas estruturais: core, E1, E2, NS1, e seis não estruturais: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Figura 1).

O HCV se replica preferencialmente nos hepatócitos, mas não é diretamente citopático. As mutações freqüentes, em razão da heretogeneidade de seu genoma, podem explicar o escape do sistema imune do hospedeiro (Terrault e Wright, 1998).

São seis genótipos principais do HCV e 16 subtipos mais comuns (1 a-c, 2 a-c, 2k, 3 a, 3b, 3k, 4a, 5a, 6a, 6b, 6d, 6g, 6h, 6k), podendo chegar a mais de 50 subtipos (Simmonds *et al.*, 2005). As chamadas quasispécies são HCV geneticamente relacionados que ocorrem no mesmo paciente infectado resultante de mutações que ocorrem durante a replicação viral. O genótipo 1 é mais prevalente nos Estados Unidos, Europa e Brasil (Lauer e Walker, 2001; Cristina, 2005) e responde menos ao tratamento quando comparado aos genótipos 2 e 3 (Manns *et al.*, 2001, Fried *et al.*, 2002, Hadzyannis *et al.*, 2004).

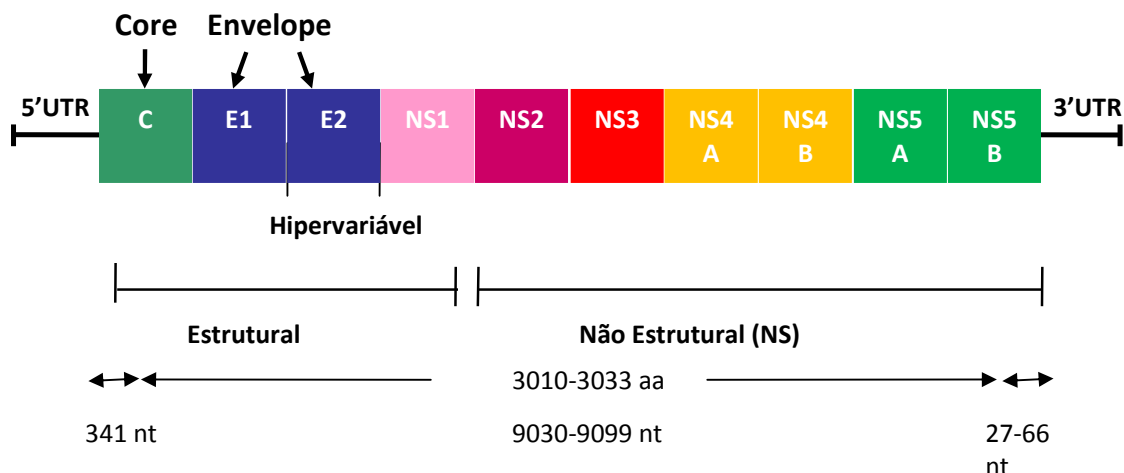


FIGURA 1 - Representação esquemática da organização genética do genoma do HCV.

Notas: Na posição 5' existem os gens estruturais e na posição 3' os não estruturais. A região mais variável do genoma do HCV é região hipervariável E2.

2.1.2- Epidemiologia da hepatite C

As previsões a respeito do impacto da hepatite C até o ano de 2015 são preocupantes. Estima-se um aumento de 61% nos casos de cirrose hepática, de 279% de cirrose descompensada, de 68% de carcinoma hepatocelular (CHC) e maior que 500% na demanda de transplante hepático. Estima-se também que entre 2010 e 2019 haverá cerca de 166.000 óbitos relacionados à hepatopatia crônica induzida pelo HCV, e 27.200 óbitos causados somente pelo CHC. Em 1995, foram realizadas 26.700 internações hospitalares, nos Estados Unidos da América, totalizando US\$ 514 milhões. Este custo, extrapolado pela morbidade associada ao HCV, somou US\$ 1,5 bilhão no ano de 1995 (Afdhal, 2004; Shepard *et al.*, 2005). Portanto, trata-se de um sério problema de saúde pública mundial.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) e outros autores, a prevalência mundial do HCV é da ordem de 3% e representa de 170 a 200 milhões de indivíduos infectados (WHO, 1999; Shepard *et al.*, 2005; Boccatto *et al.*, 2006). A prevalência varia de 0,1 a mais de 22%, dependendo do país. A taxa estimada de incidência é de 1 a 3 casos por 100.00 indivíduos por ano, apesar de a incidência atual ser provavelmente maior pelo fato da infecção aguda ser assintomática na maioria dos casos.

O pico da incidência da hepatite C está previsto por volta do ano de 2015 (Shepard *et al.*, 2005; Boccatto *et al.*, 2006). Nações com as maiores taxas de prevalência estão na África e Ásia; regiões de menor prevalência incluem a América do Norte, oeste e norte da Europa e Austrália. No Brasil, estima-se a prevalência geral próxima de 1,5 %, o que significa cerca de 2,8 milhões de indivíduos infectados (Silva *et al.*, 1995; Foccacia *et al.*, 1998; Zarife *et al.*, 2006). Os índices de mais baixa prevalência indicam Canadá (0,8%), Alemanha (0,6%), França (1,1%), e Austrália (1,1%). Países com prevalência um pouco mais elevada são os Estados Unidos (1,8%), Japão (1,5 a 3,3%) e Itália (2,2%). A China, cuja população contabiliza 20% da população mundial, possui prevalência de 3,2% (amostra representativa nacional de 68.000 indivíduos) e a Índia, que também possui 20% da população do planeta, tem prevalência de 0,9% (estudo de base populacional). A prevalência na Indonésia é de 2,1% em pré-doadores de sangue. No Paquistão, a maioria dos relatos indica que as taxas variam de 2,4 a 6,5 %. No Egito, com população de 73 milhões de indivíduos, constatou-se soro prevalência de 22%, a mais elevada do mundo (Shepard *et al.*, 2005).

Os fatores de risco mais freqüentemente citados para a transmissão do HCV no mundo são: a hemotransfusão, o uso de drogas injetáveis e as injeções terapêuticas inseguras. Nos países desenvolvidos, como Estados Unidos da América, Austrália e países da Europa ocidental, as evidências acumuladas mostram que a fonte predominante de novos casos de infecção é o uso de drogas injetáveis, diferente dos países em desenvolvimento, cujos principais meios de transmissão são transfusão de hemoderivados e injeções terapêuticas inseguras (Shepard *et al.*, 2005). A prevalência da transmissão ocupacional do HCV entre os profissionais da saúde é de 0,3%; a transmissão vertical varia de 2,7 a 8,4% (Poynard *et al.*, 2003b; Shepard *et al.*, 2005). Foi observado que a transmissão vertical ocorre quando a mãe possui viremia acima de 10 milhões de cópias/ml, com taxa de transmissão perinatal de 4 a 7% (Roberts e Yeung, 2002). Outras formas de transmissão do HCV ocorrem em pacientes portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise, portadores de hemoglobinopatias, além de tatuagens, compartilhamento de barbeador, acupuntura e *piercing* (Teixeira e Velasco, 2005).

2.1.3- História natural da hepatite C

A infecção aguda pelo HCV é raramente observada na prática clínica, em razão de ser assintomática na maioria dos indivíduos que adquirem o vírus. Em cerca de sete a oito semanas podem ocorrer alterações nos níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST) e da alaninoaminotransferase (ALT). Contudo, a viremia ocorre mais precocemente, cerca de uma a três semanas após a infecção. O aparecimento de anticorpos anti-HCV pode demorar entre 60 a 90 dias.

A infecção aguda pode cronicar em 55 a 85% dos pacientes (Pearlman, 2004; Wawrzynowicz-Syczewska *et al.*, 2004; Alberti *et al.*, 2005). Quinze a 45% dos pacientes com hepatite C aguda podem eliminar o vírus espontaneamente. A fase crônica ocorre seis meses após a aquisição do HCV e se caracteriza por sintomas inespecíficos ou ausentes. Contudo, tem-se descrito que a fadiga é freqüente durante a infecção crônica (Pearlman, 2004). Na cirrose hepática mais avançada, os pacientes podem apresentar hemorragia digestiva alta, encefalopatia hepática, peritonite bacteriana espontânea e carcinoma hepatocelular (Afdhal, 2004; McHutchinson, 2004; Shepard *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2005; Chen e Morgan, 2006).

Cerca de 30% dos indivíduos portadores de hepatite C crônica evoluem para fibrose hepática avançada, culminando em cirrose hepática 20 a 30 anos após a aquisição do vírus C. As complicações inerentes à cirrose hepática têm constituído na atualidade a principal indicação de transplante hepático em diversos países europeus e nos Estados Unidos (Afdhal, 2004; Boccatto *et al.*, 2006; Chen e Morgan, 2006). Evidências recentes também sugerem que a cirrose hepática causada pelo HCV tem sido uma das principais causas de carcinoma hepatocelular em todo o mundo (Afdhal, 2004; McHutchinson, 2004; Shepard *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2005; Boccatto *et al.*, 2006; Chen e Morgan 2006, Lloyd *et al.*, 2007). Depois de estabelecida a cirrose, o carcinoma hepatocelular pode se desenvolver em uma incidência de 2 a 5% ao ano (Pearlman, 2004, Shepard *et al.*, 2005; McHutchinson e Bacon, 2005; Alberti *et al.*, 2005; Boccatto *et al.*, 2006; Chen e Morgan 2006).

Diversos fatores, virais e do hospedeiro, associados à progressão da fibrose hepática, têm sido investigados na hepatite C crônica. Contudo, têm-se demonstrado que são os fatores do hospedeiro, e não os virais, os principais responsáveis pela evolução da fibrose hepática (Pearlman, 2004; Alberti *et al.*, 2005; Chen e Morgan, 2006; Lloyd *et al.*, 2007). Dentre os fatores do hospedeiro citam-se a idade, a duração da infecção, a idade à aquisição do vírus, o gênero masculino, o consumo de álcool, a co-infecção com o HIV, a baixa contagem de células CD4, alguns distúrbios metabólicos como a obesidade e o *diabetes mellitus* (Pearlman, 2004; Ratziu *et al.*, 2005; Alberti *et al.*, 2005; Massard *et al.*, 2006; Boccatto *et al.*, 2006).

A respeito dos fatores do hospedeiro, têm-se discutido amplamente a associação entre os fatores imunes e a infecção crônica. Assim, alguns alelos para antígenos leucocitários humanos (HLA) têm sido descritos como associados ao clareamento do vírus. Sabe-se que a alta taxa de evolução para a forma crônica da doença tem relação com as mutações virais e também com a deficiência de manutenção de uma resposta imune vigorosa de linfócitos T citotóxicos em resposta à infecção (Harcourt *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2002; Bowen e Walker, 2005; Thimme *et al.*, 2006).

2.2- O complexo principal de histocompatibilidade

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC, de *Major Histocompatibility Complex*) é uma região cromossômica identificada e definida originalmente em camundongos.

Em 1940 George Snell e colaboradores criaram técnicas genéticas para analisar a rejeição de tumores e de outros órgãos transplantados entre linhagens diferentes de camundongos. Em meados dos anos 1950, acreditava-se que aglutininas de leucócitos seriam auto-anticorpos induzidos por drogas. Bernard Amos foi o primeiro a reconhecer que as aglutininas de leucócitos reconheciam o MHC murino e eram alo e não auto-anticorpos. Um ano mais tarde, Dausset percebeu que transfusões sanguíneas induziam aglutinina de leucócitos, confirmando serem eles alo imunes (So, 1994; Abbas e Lichman, 2005b). Em 1956, Van Loghem publicou artigo no qual demonstrou que anticorpos de leucócitos induzidos por hemotransfusão poderiam

induzir reações não hemolíticas pós-transfusionais. Este autor demonstrou que essas reações poderiam ser evitadas com a remoção dos leucócitos do sangue (Rood, 2004).

Portanto, foi na década de 1950 que foram descobertos os primeiros produtos HLA codificados por genes MHC, produzidos por pacientes politransfundidos ou por mulheres múltiplas, que reagem com leucócitos alogênicos (de outros indivíduos da mesma espécie). Posteriormente, foi reconhecido o papel desses antígenos na reação de rejeição a transplantes alogênicos, levando ao nome de antígenos de histocompatibilidade.

Nos anos 1960 e 1970, foi descoberto que os genes MHC eram fundamentais para todas as respostas imunológicas a antígenos protéicos. Linhagens endogâmicas de cobaias e de camundongos diferiam na sua habilidade em produzir anticorpos contra polipeptídeos sintéticos simples. Os genes relevantes foram denominados de genes da resposta imune, e todos foram encontrados no mapa do MHC.

A organização dos genes do MHC foi determinada através de clonagem gênica. As primeiras informações sobre o locus do MHC foram obtidas pela técnica de clonagem com DNA complementar (cDNA), baseando-se em seqüências de proteínas conhecidas. Utilizou-se cDNA para clonar o DNA genômico do locus do MHC, e verificou-se possuir a extensão de 3.600 kilobases (So, 1994).

O MHC humano é constituído por um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6. (Abbas e Lichman, 2005b; Sullivan e Amos, 1986; Watson, 1997; Klein e Sato, 2000).

O MHC é a região do genoma que apresenta maior densidade de genes, sendo que mais de 220 *loci* já foram identificados, e esta região possui os genes mais polimórficos (genes de classe I e II) quando comparado com todo o genoma.

O polimorfismo, ou seja, o grande número de alelos (variedade de genes que podem ocupar, alternativamente, um locus) garante uma enorme variedade de antígenos leucocitários humanos (HLA) classes I e II no indivíduo e nas populações. Acredita-

se que as infecções representem a grande pressão evolutiva responsável pelo polimorfismo MHC. Em uma situação de uma epidemia com alta taxa de mortalidade, pelo menos alguns indivíduos sobreviveriam por possuírem os genes do MHC adequados.

Cerca de 40% dos genes do MHC participam de alguma forma da resposta imune (Campbell e Trowsdale, 1997; Klein e Sato, 2000). Um grupo desses genes codifica glicoproteínas de membrana, chamados antígenos leucocitários humanos, ou HLA.

Existem 20 genes de classe I na região do MHC, sendo três deles, HLA A, B e C, os chamados clássicos. O gene de classe Ia são os principais agentes da resposta imune. Esses subgrupos apresentam estruturas semelhantes, mas diferem nas seqüências de aminoácidos da molécula, conferindo-lhes especificidade e a distinção entre próprio e não próprio e estão relacionadas à rejeição de enxertos, além de participar da resposta imune do indivíduo. As moléculas HLA de classe I estão presentes em todas as células nucleadas do organismo. Outro grupo de genes codifica glicoproteínas de classe II, denominadas HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ (Figura 2). Esses subgrupos estão envolvidos na imunorregulação e são expressos em células do sistema imune especializadas na captação, no processamento e na apresentação do antígeno no meio extracelular através dos macrófagos, linfócitos B e células dendríticas (encontradas nos linfonodos e outros tecidos linfóides). Dessa forma, as moléculas HLA classe I apresentam antígenos de origem intracelular às células T CD8+, enquanto que as de classe II apresentam antígenos de origem extracelular às células T CD4+ (Figura 3). O MHC de classe III codifica proteínas do complemento. (Sullivan e Amos, 1986; Watson, 1997; Klein e Sato, 2000).

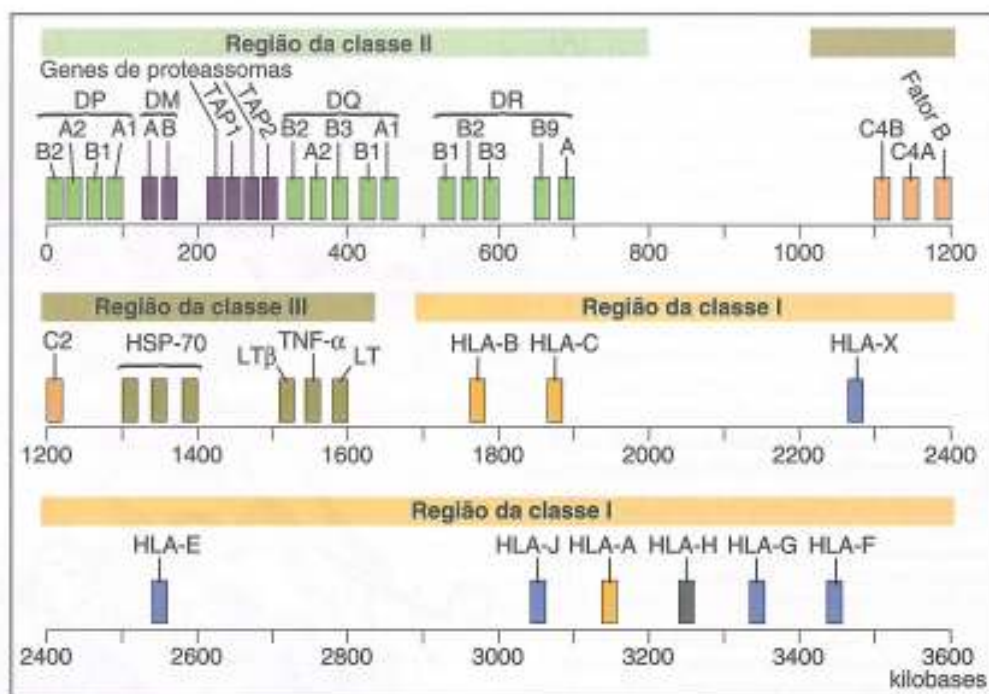


FIGURA 2 - Mapa esquemático do MHC humano.

Fonte: Abbas e Lichman, 2005b, p. 68.

Nota: Figura publicada com autorização da Editora Elsevier

O haplótipo é a denominação dada a uma série de alelos do MHC presentes em cada cromossomo. Todos os indivíduos heterozigotos têm dois haplótipos, e o conjunto de dois haplótipos constitui o genótipo HLA.

Os haplótipos HLA conhecidos incluem no mínimo seis *loci* genéticos: HLA-A, B e C (genes classe I) e a região HLA-D, os *loci* DR, DP e DQ (genes classe II). Os produtos gênicos do HLA são expressos de forma codominante, sendo que cada indivíduo expressa dois antígenos por locus. A probabilidade de dois irmãos serem HLA idênticos, HLA haplo-idênticos ou HLA distintos, isto é, compartilharem dois, um ou nenhum dos haplótipos parentais, é de 25%, 50% e 25%, respectivamente.

Klein e Sato (2000) relataram a terminologia atual do sistema HLA. A primeira letra refere-se à classe em consideração (por exemplo, D). A segunda à família (M, O, P, Q, R) e a terceira (A ou B) a cadeia (alfa) ou (beta), respectivamente. Segue-se um número arábico que indica qual o gene está sendo considerado entre os genes de uma mesma sub-região (por exemplo, DRB1). Após um asterisco, segue-se um

código de quatro dígitos em que os dois primeiros dígitos designam, exceto em raras exceções, a especificidade à qual os alelos correspondem e, os dois últimos representam o alelo propriamente dito, caracterizado por uma seqüência específica de nucleotídeos. Portanto, no caso do alelo DRB1*0104, D denota a classe, R a família; B a cadeia Beta; 1 o locus do gene 1; 01 a especificidade e 04 o alelo em questão. Reserva-se a denominação de especificidades HLA para denotar as variedades polimórficas caracterizadas através de técnicas sorológicas ou moleculares, e o termo alelo para o gene propriamente dito (Bodmer, 1997; Shreuder *et al.*, 1999).

Determinadas combinações de alelos, em diferentes *loci* do complexo HLA, são herdadas em conjunto com uma freqüência maior do que a esperada pela distribuição aleatória, ou seja, maior que o número obtido pela multiplicação da freqüência de cada um dos alelos. Este fenômeno é denominado desequilíbrio de ligação.

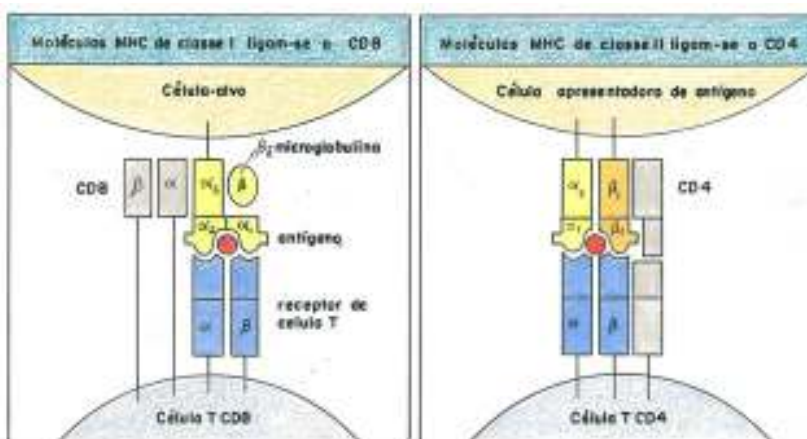


FIGURA 3 - As ligações das moléculas MHC.

Notas: As moléculas MHC de classe I ligam-se às células CD8, e as moléculas MHC de classe II ligam-se às células CD4. O co-receptor CD8 liga-se ao domínio α_3 da cadeia pesada do MHC de classe I, assegurando que a molécula MHC apresente peptídeos somente às células CD8 (à esquerda). De modo complementar, o co-receptor CD4 liga-se ao domínio β das moléculas MHC de classe II, certificando que os peptídeos ligados pelo MHC de classe II estimulem somente as células T CD4 (à direita).

Fonte: Adaptado de Parham, 2001, p.64.

Cada peptídeo que pode gerar uma resposta imunológica deve conter alguns aminoácidos que contribuem para o acoplamento nas fendas das moléculas do MHC e também devem conter aminoácidos que se projetem das fendas para que possam ser reconhecidos pelas células T. Os aminoácidos de um peptídeo podem possuir cadeias laterais que se encaixam nas chamadas bolsas existentes nas fendas de ligação, e se ligam a aminoácidos complementares na molécula HLA. Tais aminoácidos dos peptídeos são chamados de âncoras, pois são os fatores que contribuem para a estabilidade da ligação do peptídeo com a molécula HLA (Klein e Sato, 2000) (Figura 4).

A formação intracelular das moléculas HLA de classes I e II foi previamente descrita (Klein e Sato, 2000; Abbas e Lichtman, 2005b).

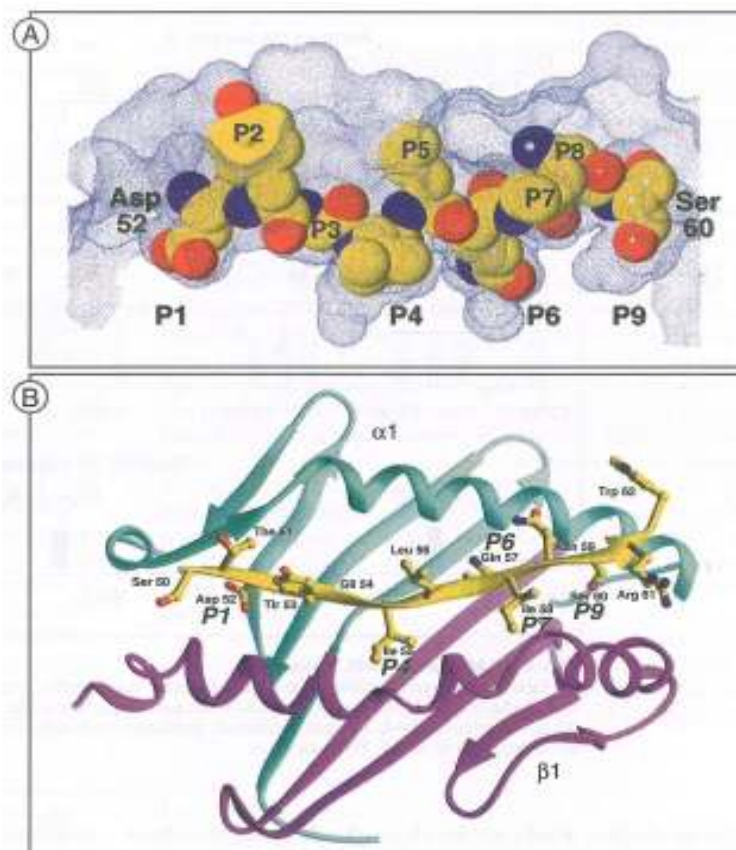


FIGURA 4 - Fenda de ligação ao peptídeo MHC de classe II.

Fonte: Abbas e Lichtman, 2005b, p.77

Notas: Aminoácidos de ligação do MHC e contato do receptor de antígenos da célula T com um modelo de peptídeo antigênico. Os aminoácidos envolvidos no reconhecimento pelas células T se projetam para cima e ficam disponíveis para serem reconhecidos pelas células T.

Figura publicada com autorização da Editora Elsevier.

2.2.1- O MHC e as doenças

A primeira descrição da associação entre HLA e doença foi relatada no Terceiro Simpósio Internacional de Histocompatibilidade em Turin, na Itália, em 1967. Amiel (*apud* Thorsby, 1997) relatou a associação entre HLA-B5-B35-B18 que foi significativamente mais freqüente em pacientes com Doença de Hodgkin (51%) comparado com indivíduos sadios (27%). Desde então, se iniciaram trabalhos na busca de novas associações entre HLA e doenças. A associação do HLA e doenças são causadas por uma interação entre diferentes genes do MHC e fatores ambientais, sendo que os genes geralmente conferem a predisposição genética mais preponderante (Thorsby, 1997).

A associação mais robusta já descrita de associação entre alelos HLA e doenças é a da espondilite anquilosante (EA), uma doença inflamatória crônica que acomete as articulações sacro-ilíacas, a coluna vertebral e, freqüentemente, articulações periféricas. Aproximadamente 95% dos pacientes portadores de EA portam HLA-B27, o que torna esta doença, assim como a narcolepsia, as condições patológicas humanas mais fortemente associadas com o MHC (Brewerton *et al.*, 1973; Thorsby, 1997). Outra descrição clássica é a suscetibilidade para desenvolver *diabetes mellitus* tipo I associada ao HLA-DR3, DQ2/DR4, DQ8 em heterozigotos e HLA-DR3, DQ2/DR3, DQ2 ou HLA-DR4, DQ8/DR4, DQ8 em homozigotos.

Outros exemplos de associação entre HLA e patologias específicas são a doença de Crohn (alelos HLA-A2, HLA-DR4 e HLA-DR1-DQ5) (Kornbluth *et al.*, 1998) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) (alelo HLA-DRB1*1501). Há relatos de maior gravidade da RCUI associada aos haplótipos HLA-DR3-DQ2 e HLA-DRB1*0103 na comunidade européia (Jewell, 1998). A associação entre a colangite esclerosante primária e o HLA-B8 de classe I foi previamente descrita com evidências de que o curso acelerado dessa doença está associado ao alelo HLA-DR4 (Sherlock e Dooley, 2002).

Em relação à hepatite B, Han *et al.* (2005) relataram resultados de estudo dos alelos HLA-DRB1* e HLA-DQB1* de baixa resolução e maior suscetibilidade à infecção crônica, mostrando que as freqüências dos alelos HLA-DRB1*06, HLA-DRB1*08 e

HLA-DRB1*16 foram significativamente maiores em pacientes (n=72) quando comparados com controles sadios (n=200) (2,1% vs 0%, OR=3,84, p=0,02 IC95% 3,3-4,4; 11,1% vs 5,5%, OR=2,15 IC95% 1,1-4,2, p=0,03; e 6,9% vs 3,0%, OR=2,41 p=0,05 IC95% 1,02-5,7 respectivamente). Ao contrário, a especificidade HLA-DRB1*07 foi menos freqüente em pacientes do que em controles (2,8% vs 7,8%, OR=0,34, p=0,05 IC95% 0,1-1,0). A freqüência do HLA-DRB1*14 foi maior em 11 pacientes respondedores ao interferon comparados com 24 não respondedores (18,2% vs 2,1%, OR=10,44, p=0,03 IC95% 1,1-99,9) e o inverso ocorreu com o alelo HLA-DQB1*07 (9,1% vs 37,5%, OR=0,17, p=0,02 IC95% 0,04-0,80). Os autores concluem que, na infecção pelo vírus da hepatite B, os alelos HLA-DRB1*06, DRB1*08 e DRB1*16 podem estar associados à hepatite B crônica, o HLA-DRB1*07 teria papel protetor contra a infecção por esse vírus, o HLA-DRB1*14 à resposta virológica sustentada ao interferon, e sugerem-se associação entre o HLA-DQB1*07 e baixas taxas de resposta nesta doença.

Em outro estudo realizado em pacientes chineses, Jiang *et al.* (2003) verificaram que os alelos HLA-DRB1*0301, DQA1*0501 e HLA-DQB1*0301 foram relacionados à evolução para a cronicidade da hepatite B e, de forma semelhante aos achados para hepatite C, os alelos HLA-DRB1*1101/1104 tiveram menor freqüência no grupo de pacientes com infecção crônica pelo HBV quando comparado com o grupo com hepatite B aguda (0,96% vs 13,33%, RR=18,55 pc=0,015). O alelo HLA-DRB1*0301 teve maior freqüência em pacientes portadores de hepatite B crônica quando comparado com indivíduos controle (17,3% vs 5,7%, RR=4,2, pc=0,007) sugerindo a participação desse alelo na suscetibilidade à infecção pelo HBV.

Pelos exemplos acima, pode-se afirmar que a importância e função do sistema MHC está hoje bem estabelecida. O papel das moléculas HLA na apresentação de peptídeos aos linfócitos T é a primeira etapa fundamental da resposta imune adaptativa. A herança dos alelos HLA pode influenciar na interação entre vírus e hospedeiro, através do sistema imune-complexo MHC, com conseqüente eliminação ou persistência do agente agressor. Grandes esforços têm sido feitos para o melhor entendimento da interação das moléculas HLA e peptídeos, suas bases moleculares e as características dos peptídeos que os permite ligarem às moléculas HLA. O

estudo dos alelos HLA permite estabelecer correlação com doenças, prognósticos evolutivos das doenças, assim como resposta a seus tratamentos. A caracterização dos peptídeos imunogênicos do vírus da hepatite C poderá ser utilizada no desenvolvimento de vacinas inserindo-se seqüências de aminoácidos chave a antígenos para serem utilizados para imunização.

2.2.2- O MHC e a hepatite C

2.2.2.1 Relação entre o MHC e o clareamento do HCV

Diversos autores demonstraram a implicação dos alelos HLA-DRB1*11 e HLA-DQB1*0301 no processo de clareamento do HCV (Peano *et al.*, 1994; Alric *et al.*, 1997; Cramp *et al.*, 1998; Minton *et al.*, 1998; Mangia *et al.*, 1999; Vejbaesya *et al.*, 2000; Alric *et al.*, 2000; Fanning *et al.*, 2000; Thio *et al.*, 2001; Azocar *et al.*, 2003; Spada *et al.*, 2004). Estes estudos foram confirmados em duas metanálises (Yee, 2004; Hong *et al.*, 2005) (Tabela 1).

Há evidências sugestivas de que a associação entre os haplótipos HLA classe II (DQB1*0301 e DRB1*1101) e o clareamento do HCV deve-se à ativação e manutenção da resposta sustentada por linfócitos T auxiliares CD4+ ativados contra o HCV. Estudos com linfócitos T citotóxicos demonstram que as respostas dirigidas contra mais de um epitopo são mais freqüentes entre pacientes que curam espontaneamente a infecção, quando comparados aos indivíduos com infecção persistente (Thursz *et al.*, 1999; Harcourt *et al.*, 2001). Resultados encontrados por Chang *et al.* (2001) deram suporte a essa hipótese ao demonstrarem que a proliferação da resposta TCD4+ vigorosa multiespecífica é mantida indefinidamente após o clareamento da infecção pelo HCV; por outro lado, essa resposta vigorosa não é observada nos pacientes que evoluem para a infecção crônica.

Em estudo de metanálise recente, Hong *et al.* (2005) estudaram a associação entre o polimorfismo do HLA de classe II DRB1*1101 e HLA-DQB1*0301 e o clareamento viral espontâneo (CVE) a partir de 11 estudos prévios. As freqüências dos alelos HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0301 em indivíduos com CVE foram comparadas com a de pacientes com infecção crônica pelo HCV. Os resultados do estudo de

metanálise mostraram que as frequências dos alelos HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0301 foram estatisticamente maiores no grupo com CVE quando comparado com o grupo de pacientes com infecção persistente para o efeito dos alelos HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0301, respectivamente. Os autores concluíram que esses resultados suportam a hipótese de que alelos HLA específicos podem influenciar a evolução da infecção pelo vírus HCV. Ambos os alelos HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0301 são protetores e indivíduos portadores desses alelos apresentam menor risco de evolução para hepatopatia crônica pelo HCV.

Mais recentemente, Harris *et al.* (2008) confirmaram as observações anteriores ao demonstrarem que os alelos HLA-DRB1*11 e HLA-DQB1*03 estão associados ao CVE. De forma interessante, esses autores identificaram uma nova associação com o CVE, o alelo HLA-DRB3*02. Estas observações foram feitas apenas em pacientes caucasianos e não foram observadas em Afro-Americanos.

TABELA 1 - Características dos estudos incluídos na metanálise da associação entre os alelos HLA de classe II DRB1*1101 e DQB1*0301 e o clareamento viral espontâneo do HCV.

AUTOR E ANO	PAÍS DE ORIGEM	RESOLUÇÃO ESPONTÂNEA	INFECÇÃO PERSISTENTE	PARÂMETROS	TESTES ANTI-HCV	Metodologia
Alric (1997)	França	25; M/F; 9/16; Idade 40,6 ± 15,7 anos	103; M/F; 58/45; Idade 45,4 ± 12,4 anos	Gênero, idade, origem da infecção HCV, HCV soropositivo	2G EIA e RIBA	PCR-SSOP
Cramp (1998)	Reino Unido	49; M/F; 30/19 Duração: 15,5 (3-42) anos	55; M/F; 31/24; Duração: 14,2 (2-40) anos	Gênero, idade, origem da infecção HCV e duração	2G linha imunoensaio	PCR-SSOP
Minton (1998)	Reino Unido	35; M/F; 19/16 Idade: 37,9 ±10,8 anos	138; M/F; 87/51; Idade: 37.2 ±10,1 anos	Gênero, idade e origem da infecção HCV	2G ELISA e RIBA	PCR-SSOP
Mangia (1999)	Itália	35	149	Gênero, HCV soropositivo, idade não, duração não	RIBA e 3G EIA	PCR-SSP
Thursz (1999)	N.I, Europa	85; M/F; 37/48; Idade: 45 ±14 anos	170; M/F; 74/96; Idade: 50 ±16 anos	gênero, centro, idade não	ELISA e RIBA	PCR-SSP
Vejbaesya (2000)	Tailândia	43; doador de sangue; M/F; 25/18	57; M/F; 31/18	Gênero	2G EIA e RIBA	PCR-SSOP
Alric (2000)	França	63; M/F; 21/42; Idade: 42,1 ±15,4 anos	282; M/F; 150/132; Idade: 46 ±12,3 anos	Idade, origem da infecção HCV e duração, gênero não	2GEIA e RIBA	PCR-SSOP
Fanning (2000)	Irlanda	85; mulheres	72; mulheres	De uma única origem	RIBA	Reverse line probe by hybridization
Thio (2001)	América do Norte	200; M/F; 166/34; Idade: 25,7 anos	374; M/F; 310/64; Idade: 27,8 anos	Idade, gênero e raça	2G EIA e RIBA	PCR-SSP e PCR-SSCP
Azocar (2003)	Espanha	40; M/F; 33/7; Idade: 37.9 anos	72; M/F; 54/18; Idade: 39,2 anos	Idade e gênero	EIA e RIBA	PCR-SSO e PCR-SSP
Spada (2004)	Itália	10; M/F; 5/5; Idade: 40,5 (20-61) anos	24; M/F; 22/2; Idade: 29 (20-56) anos	Gênero não, idade, origem da infecção HCV, e HCV soropositivo	3G ELISA e RIBA	PCR-SSP

Legenda: EIA = Imunoensaio enzimático; RIBA = Ensaio recombinante por imunoblot; ELISA = Imunoensaio enzimático; 2G = Segunda geração; 3G = Terceira geração; SSOP = Sondas oligonucleotídeo seqüência específica; SSP = iniciadores seqüência específicos; SSC = Polimorfismo conformacional de fita única. PCR-SSP= Reação em cadeia da polimerase por primers (iniciadores) seqüência específicos. Reverse line probe by hybridization ou hibridização por sondas. HCV= vírus da hepatite C. M = gênero masculino, F = gênero feminino. Fonte: Adaptado de Hong *et al.*, 2005, p.7303.

2.2.2.2 Associação entre o MHC e a hepatite C crônica

Em 1994, em estudo pioneiro realizado por Peano *et al.*, os autores observaram que a freqüência do alelo HLA-DR-5 foi inversamente proporcional à gravidade da fibrose hepática, sugerindo um papel protetor conferido por esse alelo contra a evolução para cirrose hepática. Observou-se também maior freqüência fenotípica de pacientes assintomáticos, anti-HCV positivos, com exames bioquímicos normais, por mais de um ano, quando comparado com pacientes portadores de hepatite C crônica (19/36 (52,8%) x 7/51 (13,7%), $p=0,005$, $RR=0,142$, $IC95\%$ 0,19-0,59). Posteriormente, Tibbs *et al.* (1996) realizaram a genotipagem HLA de 104 pacientes caucasianos com hepatopatia crônica pelo HCV e compararam os resultados com os de 177 indivíduos do grupo controle com características demográficas semelhantes às dos pacientes. Os alelos HLA-DQA1*03 e HLA-DQB1*0302 estavam presentes em menores freqüências no grupo de pacientes em relação ao grupo controle (19/92 (20,7%) x 73/177 (41,2%), $X^2=11,41$, $RR=0,37$, $p=0,0007$, $p=0,05$ e 10/88 (11,4%) x 54/177 (30,5%), $X^2=11,76$, $p=0,0006$, $p=0,04$ respectivamente). Entretanto, não houve associação entre o estágio de fibrose e o genótipo HLA.

Zavaglia *et al.* (1998) verificaram que os alelos HLA-DQA1 ou HLA-DQB1, isoladamente, não influenciaram na suscetibilidade ou proteção contra a infecção crônica pelo HCV. O haplótipo HLA-DRB1*1104-HLA-DQA1*0501-HLA-DQB1*0301 foi significativamente menos freqüente em pacientes quando comparados aos controles (8% vs 22,3%, $p=0,003$, $OR=0,31$, $IC\ 95\%$ 0,12-0,70) ou aos portadores assintomáticos do HCV (8/99 (8%) vs 40/179 (26,8%), $p=0,003$, $OR=0,24$, $IC95\%$ 0,08-0,73). Por outro lado, os alelos HLA-DQA1*0201-DQB1*0201 trans e a combinação HLA-DQA1*0201-DQB1*0201 (homozigoto), assim como o HLA-DQA1*0201-DQB1*0201 cis foram mais freqüentes em pacientes do que no grupo controle (12/99 (12,1%) vs 2/179 (1,1%), $p=0,008$, $OR=12,2$, $IC95\%$ 2,6-113,7 e 12/99 (12,1%) x 1/179 (0,6%), $p=0,002$, $OR=24,5$, $IC95\%$ 3,5-1055 e 26/99 (26,3%) x 29/179 (16,2%), $p=0,04$, $p=N.S.$, $OR=1,8$, $IC95\%$ 0,96-3,5, respectivamente) sugerindo maior suscetibilidade à infecção pelo HCV atribuída a esses alelos.

Kuzushita *et al.* (1998) encontraram freqüência do haplótipo HLA-B54-DRB1*0405-HLA-DQB1*0401 (21/93 (23%) vs 0/32 (0%), $p=0,002$, $OR=13,2$, $IC95\%$ 1,7-103,8)

significativamente maior em pacientes portadores de hepatite C crônica quando comparada à dos portadores assintomáticos, sugerindo associação desse haplótipo com a progressão da fibrose hepática. Por outro lado, os alelos HLA-DRB1*1302, HLA-DRB1*1101 e HLA-DQB1*0604 foram mais freqüentes em pacientes com aminotransferases persistentemente normais e fibrose discreta quando comparados aos pacientes com fibrose moderada a acentuada, sugestivos, portanto, de proteção, conferida por esses alelos, contra a evolução da fibrose hepática. Em outra investigação, demonstrou-se que pacientes com fibrose hepática discreta apresentaram freqüências significativamente menores dos alelos HLA-DRB1*1104 e HLA-DRB3*03, por análise de regressão múltipla, quando comparados aos pacientes com fibrose avançada/cirrose, sugerindo o efeito protetor contra evolução para fibrose avançada ($p=0,058$ OR=4,8 IC95% 0,9-24,5 e $p=0,042$ OR=16,5 IC95% 1,1-244,7 respectivamente), enquanto associação oposta foi encontrada para o alelo HLA-DRB1*1001 ($p=0,02$ pc= N.S.) (Asti *et al.*, 1999). Yenigun e Durupinar (2002) verificaram menor freqüência do alelo HLA-DRB1*11 em portadores de hepatite C crônica ($n=49$) quando comparados com controles sadios ($n=43$) (22,4% vs 51%, $p=0,008$, OR=0,276 IC95% 0,11-0,679 pc=N.S.). Contudo, não se demonstrou associação entre estágio de fibrose e HLA.

Uma associação robusta (OR=11,23) entre os alelos HLA-DRB1*12 (1201 e 1202, 12/43 (28%) vs 2/60 (3%), $p=0,0003$), HLA-DQB1*0301 (17/43 (40%) vs 8/60 (14%), $p=0,002$, OR=4,25) e HLA-DRB3*03 (65% vs 37%, $p=0,004$, OR=3,22) e evolução histológica favorável em 20 anos de acompanhamento foi encontrada comparando-se pacientes com fibrose hepática discreta com cirróticos (Yoshizawa *et al.*, 2003). Em outro estudo, Azocar *et al.* (2003) compararam pacientes hispânicos, descendentes de Porto-Riquenhos residentes nos Estados Unidos, que clarearam o vírus HCV espontaneamente, com pacientes de mesma etnia com viremia persistente. Observou-se que o alelo HLA-DQB1*0501 foi significativamente mais freqüente em pacientes com viremia persistente ($p=0,006$, OR=5,39 pc=N.S.), quando comparado com pacientes com clareamento viral espontâneo, sugerindo que esse alelo pode estar relacionado à suscetibilidade à infecção crônica pelo HCV. Entretanto, nesse estudo a freqüência desse alelo não foi comparada entre pacientes com diferentes estágios de fibrose hepática.

Em sua dissertação de mestrado, Corghi (2005) observou que o alelo HLA-DRB1*07 teve frequência 2,7 vezes maior (OR=2,19, pc=0,004) nos pacientes infectados pelo HCV quando comparados com controles sadios. Essa autora observou maior frequência do alelo HLA-DRB1*04 em pacientes cirróticos comparada com não cirróticos (5/10 50% vs 15/73 20,5%), porém sem significado estatístico pela correção de Bonferroni (p=0,04, pc=0,534) (Svejgaard e Ryder, 1994).

Patel *et al.* (2006) investigaram a associação dos alelos HLA de classe I com o estágio de gravidade da fibrose e progressão da fibrose para estágios mais avançados em pacientes com hepatite crônica C. Observou-se que a taxa de progressão da fibrose (TPF) (estimada pela razão entre o valor do estágio METAVIR e a diferença entre a data da biópsia e o ano de aquisição do HCV, em unidades de fibrose/ano) foi superior nos pacientes heterozigotos no *locus* B (0,08uf/ano vs 0,06 uf/ano; p=0,04) e nos homozigotos no *locus* A (TPF 0,10 vs 0,08 uf/ano). Esses autores verificaram que os fatores independentes preditivos de aumento da TPF foram: idade à ocasião da infecção e duração da infecção. Uma maior proporção de pacientes com estágio METAVIR moderado a avançado (F2-F4) expressava o alelo HLA-B18 quando comparados com os controles (OR= 2,2 IC: 95% 1,17-4,23 p= 0,02). O estágio de fibrose não foi associado ao grau de atividade inflamatória hepática ou resposta ao tratamento. Não houve diferença significativa entre a frequência do HLA-A, B e C (classe I) entre o grupo com estágio de fibrose ausente a discreta (F0-1) e moderado a cirrose (F2-4).

Mais recentemente, Singh *et al.* (2007) relataram que os alelos DRB1*11 e DQB1*0301 estão consistentemente associados com menor gravidade da fibrose hepática na hepatite C. O clareamento viral foi associado aos alelos DQB1*0501 e DRB1*0101 em Americanos caucasianos. Em outro estudo recente, observou-se que os alelos classes I e II HLA-Bw35 e HLA-DRB1*08 foram associados ao clareamento viral espontâneo, enquanto que o alelo DRB1*15 parece predispor à progressão da fibrose hepática em pacientes da Tunísia, portadores de hepatite C crônica (Ksiaa *et al.*, 2007).

Em síntese, os resultados discutidos acima sugerem uma importante ação do perfil imunogenético de cada indivíduo, podendo haver uma imunorregulação que levaria ou não a uma progressão para hepatopatia crônica ou cirrose.

2.2.2.3 Associação entre o MHC, os genótipos e a hepatite C crônica

A influência dos genótipos do HCV na evolução dos pacientes infectados para hepatopatia crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular constitui, ainda, assunto controverso na literatura, com evidências sugerindo que a maior importância dos genótipos se concentra na resposta terapêutica e não na morbidade da hepatite C (Adinolfi *et al.*, 2000), a despeito de estudos prévios sugerirem que o genótipo 1b e a idade à ocasião da aquisição do vírus HCV têm associação com maior incidência de cirrose e de carcinoma hepatocelular (Mangia *et al.*, 1997). Recentemente, Patel *et al.* (2006) não encontraram associação entre HLA de classe I e genótipos.

Uma investigação trouxe grande contribuição para a maior compreensão dos fatores imunogenéticos na hepatite C, ao analisar um grupo de mulheres com as mesmas características clínicas que foram contaminadas ao receberem imunoglobulina anti-D contaminada com o genótipo 1 do vírus C (Fanning *et al.*, 2001). Fez-se um seguimento de 4,1 anos com uma média de 4 ± 1 dosagens da carga viral por paciente. Por análise de regressão linear, verificou-se que a inclinação da curva da carga viral dos pacientes que possuíam os alelos HLA-DRB1*0701 e/ou HLA-DQB1*0201 apresentou relativa estabilidade ao longo do tempo, estatisticamente diferente dos pacientes portadores dos alelos HLA-DRB1*15 e/ou HLA-DQB1*0602, que tiveram uma média de inclinação da curva da carga viral cinco vezes maior do que o grupo com alelos protetores. Entretanto, esse estudo não relatou nenhuma correlação entre alelos e genótipos do HCV.

2.2.2.4 Associação entre o MHC e a resposta terapêutica na hepatite C

Há evidências sugestivas de que alguns alelos possam estar associados à resposta terapêutica em pacientes tratados para a hepatite C. Assim, acredita-se que as concentrações séricas de antígenos solúveis HLA-DR (sDR) poderiam estar associados à resposta ao tratamento com interferon e poderiam, dessa forma, atuar

como marcadores preditivos de resposta terapêutica. Observou-se que os níveis de sDR em pacientes com hepatite C crônica foram significativamente maiores quando comparados com indivíduos controle sadios ($p < 0,05$). Apesar de não ter sido observada diferença nos níveis de sDR no pré tratamento com interferon entre pacientes com resposta virológica sustentada (RVS) e não respondedores (NR), os níveis de sDR reduziram significativamente em pacientes com RVS, o que não ocorreu em pacientes NR ($p < 0,05$). Não houve nenhuma correlação entre sDR com carga viral ou genótipo do HCV (Hosoi *et al.*, 2000). Em outro estudo foi observado que nenhum alelo se associou significativamente à RVS ao tratamento com interferon, entretanto os alelos representados pelo HLA-DR-5 quando analisados em conjunto mostrou associação com resposta ao tratamento ($p = 0,036$, $pc = N.S.$, $OR = 1,79$, $IC_{95\%}$, 1,00-3,19) (Thursz *et al.*, 1999).

A associação entre os alelos HLA classes I e II e a RVS ao tratamento com interferon foi investigada estudando-se o haplótipo HLA-A11-DRB1*15, onde foi verificada associação robusta com a RVS ($OR = 9,40$, $p = 0,004$, $pc = 0,04$, $IC_{95\%}$ 2,05-43,15), sugerindo uma participação importante da interação da imunogenética do hospedeiro na resposta ao tratamento de pacientes com hepatopatia crônica pelo HCV (Yu *et al.*, 2003).

Pode-se afirmar, portanto, que as pesquisas em imunogenética são promissoras e poderão contribuir para o maior conhecimento a respeito dos fatores do hospedeiro que têm importância na história natural da hepatite C e, possivelmente, na resposta terapêutica. Com base nas informações disponíveis na atualidade, é bastante plausível afirmar que o envolvimento de diferentes genes de sub-regiões do MHC sugere que as respostas antivirais sejam moduladas, principalmente por uma interação gênica do que simplesmente por alelos isolados.

Os resultados desses estudos, apesar de demandarem maiores confirmações científicas, sustentam a importância da caracterização de moléculas HLA na hepatite C e suas possíveis implicações futuras, como o desenvolvimento de marcadores imunes preditivos de evolução e resposta terapêutica e, ainda, a sua aplicação no

desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esta pandemia silenciosa, mas de potencial gravidade evolutiva.

3. OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Investigar a associação dos alelos HLA de classe II e a hepatite C crônica.

3.2- Objetivos específicos

- a) Comparar a frequência dos alelos HLA de classe II DRB1* e DQB1* entre portadores de hepatite C crônica e uma população de indivíduos de cor branca, não infectados (controle histórico) da população sudeste do Brasil.
- b) Determinar a frequência dos alelos DQB1*1101 e DQB1*1104 e demais alelos HLA-DQB1*, entre pacientes portadores de hepatite C crônica e grupo controle.
- c) Determinar a frequência do alelo HLA-DQB1*0501 em portadores de hepatite C crônica em pacientes não cirróticos (F0-2) com aqueles com fibrose avançada/cirrose.
- d) Investigar as variáveis independentes do hospedeiro associadas com a probabilidade de o paciente ter fibrose acentuada/cirrose.

4. PACIENTES E MÉTODOS

4.1- Pacientes

Delineou-se um estudo caso-controle com avaliação de 296 pacientes portadores de hepatite C crônica, atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG (AHEV/IAG/HC/UFMG), Centro de Referência em Hepatites Virais, no período entre 2002 a 2005.

- **Critérios de Inclusão**

Ser portador de hepatite C crônica confirmada por exame sorológico (anti-HCV positivo, Elisa III geração) e virológico (HCV RNA qualitativo positivo pela técnica de PCR [Polimerase Chain Reaction]) com seguimento mínimo de seis meses. Ser de cor branca (critério IBGE), com idade entre 18 e 80 anos, à inclusão no estudo.

Aceitar participar da pesquisa, após informações e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

Ter biópsia hepática realizada durante a assistência médica disponível para revisão histopatológica e classificação do grau de inflamação e estágio de fibrose pelo escore METAVIR como previamente descrito (Bedossa e Poynard, 1996) (Tabelas 2 e 3).

Foram incluídos no estudo 99 pacientes que preencheram esses critérios.

TABELA 2 - Classificação METAVIR do grau de atividade necroinflamatória.

A0	sem atividade inflamatória
A1	atividade inflamatória discreta
A2	atividade inflamatória moderada
A3	atividade inflamatória acentuada

A representa o grau de atividade necroinflamatória.

Fonte: Bedossa e Poynard, 1996

TABELA 3 - Classificação METAVIR do estágio de fibrose hepática.

F0	sem fibrose
F1	fibrose portal sem septos
F2	fibrose portal com raros septos
F3	septos numerosos sem cirrose
F4	cirrose

F representa o estágio de fibrose hepática.

Fonte: Bedossa e Poynard, 1996.

Para a finalidade do estudo, os pacientes foram categorizados em não cirróticos (METAVIR F0-2) e com fibrose avançada/cirrose (METAVIR F3-4), com base no resultado da biópsia hepática realizada de acordo com a indicação médica e não para a finalidade desta pesquisa.

▪ Critérios de Exclusão

Ser portador de outras hepatopatias associadas (alcoólica, auto-imune, metabólica, tóxica), co-infectado com o vírus da hepatite B (HBV) ou o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Ser portador de insuficiência renal crônica ou neoplasias. Ser usuário de drogas imunossupressoras.

Ter relato de ingestão de bebida alcoólica atual ou pregressa em quantidade superior a 30 g de etanol/dia por mais de cinco anos, conforme critério previamente descrito (Poynard *et al.*, 1997; Bellentani *et al.*, 1999; Sherlock e Dooley, 2002; Peters e Terrault, 2002). Cento e noventa e sete pacientes foram excluídos do estudo (Tabela 4).

O grupo controle foi constituído por 103 pacientes brancos sadios da população geral e urbana de São Paulo, cujas informações foram fornecidas pelo Instituto de Imunogenética da Universidade Federal de São Paulo (Morgun *et al.*, 2004) em pesquisa de colaboração multiinstitucional.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa da UFMG (COEP UFMG) (Anexo 2).

TABELA 4 - Motivos de exclusão dos pacientes.

Etilismo	40
IRC	25
HBV-HCV	06
HIV-HCV	02
Hepatopatia tóxica	04
Teste de DNA inadequado	79
Não brancos	41
Total	197

À direita da tabela estão representados o número de pacientes excluídos para cada motivo de exclusão. IRC=Insuficiência renal crônica. HBV=vírus da hepatite B. HCV=vírus da hepatite C. HIV = vírus da imunodeficiência humana.

4.1.1- Características da população de estudo

Todos os pacientes incluídos tiveram o diagnóstico sorológico de hepatite C (anti-HCV, método imunoenzimático ELISA, terceira geração, Abbott, USA) confirmado pela pesquisa do RNA do vírus C pelo método da PCR (Polimerase Chain Reaction) (Amplicor Roche, USA), conforme o protocolo de assistência médica.

Para a finalidade da pesquisa, foi criado um banco de dados contendo as principais informações relativas à identificação (gênero, cor e data de nascimento), da história clínica e exame físico dos pacientes. Também foram investigadas as seguintes variáveis: modo provável de infecção pelo HCV, idade por ocasião da infecção, idade por ocasião da biópsia e data provável da infecção.

Considerou-se a data da infecção o primeiro ano da primeira hemotransusão, assim como para os demais modos de aquisição do HCV. O tempo de infecção foi definido como o tempo decorrido entre a data provável da infecção, informada pelo paciente, e a data da primeira biópsia hepática. Para comparação da idade entre pacientes não cirróticos (F0-2) e com fibrose avançada/cirrose (F3-4), assim como para análise multivariada, foi considerada a idade por ocasião da biópsia. Foram também investigadas co-morbidades como *diabetes mellitus* e obesidade (avaliada pelo índice de massa corpórea). Informações relativas ao vírus C foram a carga viral e o genótipo. Todas as informações colhidas precederam a instituição do tratamento da hepatite C.

As características demográficas, virológicas, histológicas e bioquímicas da população de estudo estão representadas nas Tabelas 5 e 6.

Quarenta e oito pacientes 48/99 (48,5%) eram do gênero masculino. A média de idade dos pacientes foi $51,1 \pm 12,0$ anos e mediana 53 anos (19-78 anos).

Foi possível estimar o tempo (duração) de infecção do vírus HCV em 75/99 (75,8%) pacientes. A média do tempo de infecção foi $22,2 \pm 9,3$ anos e mediana 22,0 anos (4-42 anos). A média da idade à ocasião da infecção foi $26,1 \pm 12,9$ anos e mediana de 25 anos (0-65 anos).

A média do índice de massa corpórea (IMC) obtido em 61/99 pacientes foi $26,04 \pm 4,48$ e mediana 25,43 (17,30 - 37,87). Em 72/99 (72,7%) pacientes, obteve-se o genótipo do HCV. Observou-se maior frequência do genótipo 1 a/b (54,5%). A carga viral do HCV expressa em logarítmo na base 10 e em ui/ml (unidades internacionais por mililitro) foi obtida em 70/99 (70,7%) e teve média e desvio padrão de $5,7 \pm 0,7$ ui/ml e mediana 5,7 (3,3-7,4). Estabeleceu-se o valor da enzima alanino aminotransferase (ALT) a partir da média aritmética de duas ou três amostras antes de instituído o tratamento da hepatite C, tendo-se categorizado em valor normal ou duas vezes acima do limite superior do normal (LSN).

O modo de transmissão predominante foi hemotransusão 50/85 (58,8%) seguido do uso de drogas injetáveis 7/85 (8,2%). Os exames complementares realizados (hematológicos, bioquímicos, sorológicos, de biologia molecular para caracterização do HCV, métodos de imagem e exames endoscópicos) seguiram o protocolo de assistência estabelecido no AHEV/IAG/HC/UFMG, em conformidade com as normas preconizadas para o atendimento desses pacientes (MS/BRASIL, Portaria 863, 2002; AASLD/Strader *et al.*, 2004).

As biópsias hepáticas foram revistas por duas patologistas do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG (LPF, VHRL) para a finalidade da pesquisa. A classificação histológica do grau de inflamação e do estágio de fibrose hepática foi feita utilizando-se o escore METAVIR (Bedossa e Poynard, 1996). A média de tratos portais foi 5,0.

Para a finalidade de análise estatística, os pacientes foram categorizados em grupos de acordo com o estágio de fibrose: 1) sem cirrose – METAVIR F0 a F2, 2) com fibrose avançada ou cirrose – METAVIR F3 e F4. Com esta categorização, 49/99 (49,5%) pacientes apresentavam fibrose avançada ou cirrose e 50/99 (50,5%) eram não cirróticos (F0-2). O tempo (duração) da infecção não foi diferente entre pacientes com ou sem cirrose (média de 23,8 e 20,5 anos, respectivamente, $p=0,13$).

TABELA 5 - Características demográficas, virológicas, histológicas e bioquímicas de 99 portadores de hepatite C crônica.

Parâmetros	HCV n=99	p
Maculino/feminino (%)	48,5/ 51,5	
Idade à biópsia hepática (anos ± DP)	48,7 ± 11,7	
(F0-2)	45,6 ± 12,9	0,02
(F3-4)	51,7 ± 9,7	
Idade à infecção (anos ± DP)	26,1 ± 12,9	
(F0-2)	23,4 ± 14,1	0,09
(F3-4)	28,5 ± 11,3	
Duração (tempo) da infecção (anos±DP)	22,2 ± 9,3	
(F0-2)	20,5 ± 10,0	0,13
(F3-4)	23,8 ± 8,5	
Modo de infecção (% , n)		
Hemotransfusão	58,8 (50)	0,27
Drogas endovenosas/inaladas	8,2 (7)	
Outros	33,0	
Genótipo HCV (% , n)		
1 (a/b)	54,5 (54)	
3	11,1 (11)	
Outros	7,0 (7)	
Não realizados	27,4 (27)	
Carga Viral ($\log_{10} \pm DP$, n)	5,7 ± 0,7 (70)	0,10
ALT (% , n)		
Normal	45,5 (45)	
Maior ou igual 2 x LSN	30,3 (30)	0,003
Não obtidos	24,2 (24)	
Escore de fibrose METAVIR (%)		
(F0-2)	51,5	
(F3-4)	49,5	

HCV= vírus da hepatite C. DP=desvio padrão. F0-2, F3-4=escore METAVIR de fibrose hepática: F0, F1, F2, F3 e F4. \log_{10} = logaritmo na base 10. ALT= alanino aminotransferase. Métodos estatísticos utilizados: teste exato de Fisher para variáveis categóricas e teste de Wald para variáveis quantitativas na análise univariada, para os grupos F0-2 e F3-4.

TABELA 6 - Características de 99 portadores de hepatite C crônica categorizados pelo estágio de fibrose.

Grupos	n	Gênero		Idade	Tempo
		M	F	Mediana (Amplitude)	Infecção (anos)
Pacientes	99	48	51	48,7 (11-72)	22,2 (4-42)
Estágio de fibrose					
F0	11	5	6	47,0 (23-54)	23,0 (8-33)
F1	14	2	12	43,0 (11-66)	14,0 (5-20)
F2	24	16	08	52,0 (20-66)	25,0 (6-42)
F3	10	5	5	48,0 (20-66)	27,0 (11-37)
F4	40	20	20	53,0 (25-72)	23,0 (7-40)

Idade à ocasião da biópsia e tempo de infecção foram expressos em anos com mediana e amplitude. n = número de indivíduos em cada grupo. Gênero: M=masculino, F= feminino. HCV = vírus da hepatite C. F= estágio METAVIR de fibrose hepática de F0 a F4.

4.2- Procedimentos laboratoriais

Para a finalidade do estudo, coletaram-se 5 ml de sangue periférico em tubo de ensaio contendo EDTA. O sangue foi centrifugado à temperatura de 25° C e 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante, constituído por leucócitos, era coletado dos tubos de ensaio com pipeta Pasteur e colocados em tubos criogênicos (500 microlitros) com duas alíquotas de cada amostra. As alíquotas eram imediatamente armazenadas em freezer a – 70° C até a realização dos procedimentos seguintes de extração de DNA e genotipagem HLA.

4.2.1 Genotipagem dos alelos HLA

Extração de DNA e PCR-SSP

Procedeu-se à extração de DNA utilizando o DNA – QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) conforme as instruções do fabricante. Estes procedimentos foram realizados no laboratório da Fundação Oswaldo Cruz em Belo Horizonte.

Procedimentos de genotipagem de HLA-DRB1* e DRB1*11 e DQB1* foram realizados através do método de PCR-SSP (SEQUENCE SPECIFIC PRIMER) no

Instituto de Imunogenética da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina.

As amplificações das amostras de DNA foram feitas através de "kit" para genotipagem HLA (One Lambda, Canoga Park, CA, USA), constituídos por tubos de solução D-mix e placas para PCR contendo primers (seqüências de oligonucleotídeos) específicos liofilizados.

Um μl de água bi-destilada foi utilizado para substituir o DNA nos tubos correspondentes aos controles negativos. Ao tubo D-mix adicionou-se 1,5 ou 2,0 μl de Taq DNA Polymerase 5U/ μl (Fermentas Life Science, Espanha) de DNA para genotipagem HLA-DRB1 ou HLA-DRB1*11/DQB1, respectivamente. Após homogeneização, foram distribuídos 10 μl em cada tubo de reação.

As amplificações foram realizadas utilizando-se o termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, USA). Ao final destes procedimentos, as amostras foram conservadas a 4°C até o momento da realização da eletroforese.

Eletroforese e visualização do gel

Para realizar a eletroforese dos produtos amplificados, foi utilizado gel de agarose a 2% (Invitrogen) preparado em 0,5 x tampão TBE (5,4 g Tris-base; 2,75 g ácido bórico; 2 ml de solução de EDTA 0,5 M; água destilada até completar 1 litro) com 0,75 $\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio (Invitrogen, Espanha). Utilizou-se a cuba Micro SSP Gel System (One Lambda, Canoga Park, CA, USA) para submeter o gel à eletroforese durante 6 minutos, a aproximadamente 150 V.

As bandas do material amplificado foram visualizadas sob luz ultravioleta e fotografadas por meio do sistema de documentação de imagem de gel de eletroforese (Kodak Digital Science - Electrophoresis Documentation and Analysis System 120; Eastman Kodak Company, NY, USA).

Interpretação dos resultados

Uma banda de controle interno bem visível em todos os poços (exceto no controle negativo) serviu de controle de amplificação bem sucedida. O *primer* do controle interno amplifica uma região do gene de β -globina e apresenta massa molecular de 750 pares de bases (pb). As bandas de amplificação específicas para alelos DRB1*11/DQB1 ou grupo de alelos DRB1* são identificadas como bandas de massa molecular menor se comparadas com as bandas do controle interno, que variam de 75 a 325 pb. A presença destas bandas indicou resultado positivo do teste.

Comparando-se os poços com resultado positivo com a planilha de padrões de tipificação fornecida pelo fabricante (One Lambda INC, USA), obtiveram-se os resultados da genotipagem HLA esperadas (Figuras 6 e 7).

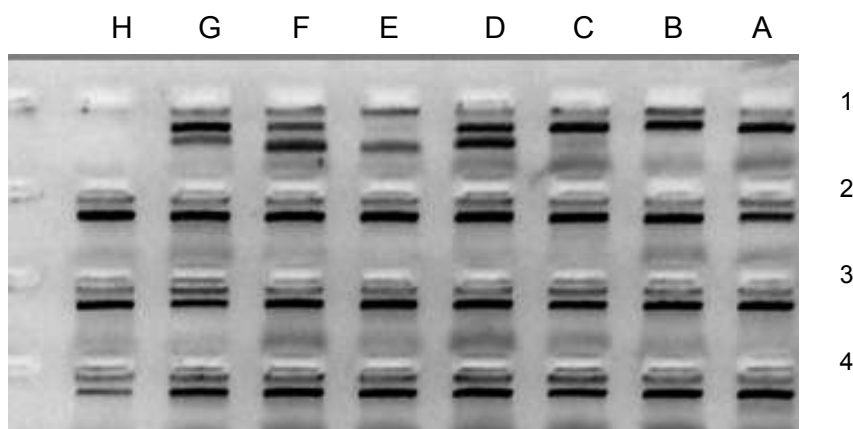


FIGURA 5 - Exemplo de tipagem HLA-DRB1*11 alta resolução por PCR-SSP, kit One lambda utilizado no presente estudo.

Legenda da Figura: Controle negativo: 1H; Controle interno: presente em todas as reações exceto em 1H. Reações positivas: 1D, 1E, 1F, 1G. Resultado: DRB1*1101.

Fonte: Tipagem realizada no IGEN- Instituto de Imunogenética da Escola Paulista de Medicina

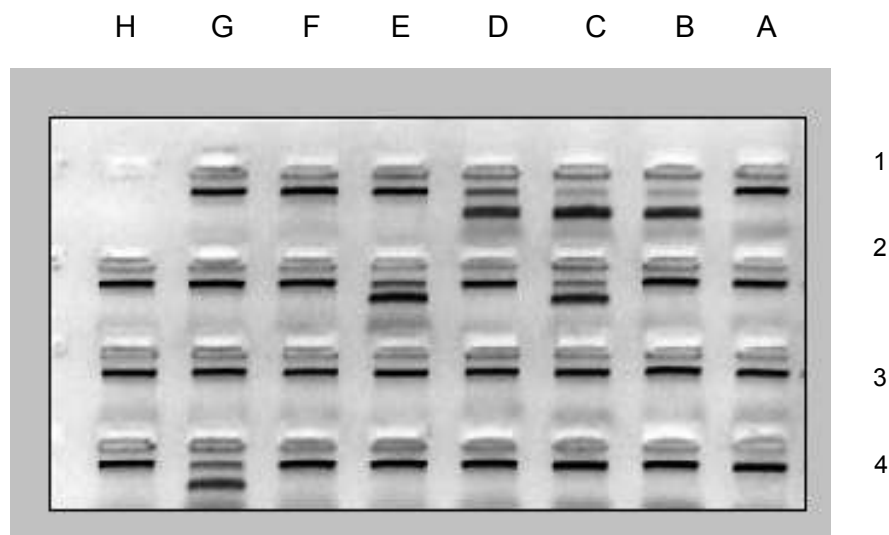


FIGURA 6 - Exemplo de tipagem HLA-DQB1*0301 alta resolução por PCR-SSP, kit One lambda utilizado no presente estudo.

Legenda da Figura: Controle negativo: 1H; Controle interno: banda presente em todas as reações, exceto em 1H. Reações positivas: 1B, 1C e 1D; 2C, 2E; 4G. Resultado: DQB1*0301, 0402.

Fonte: Tipagem realizada no IGEN - Instituto de Imunogenética da Escola Paulista de Medicina.

BANDAS ESPECÍFICAS: os *primers* amplificam produtos (bandas) cujos pesos variam de 75-250pb (pares de bases)
A banda do controle positivo tem 750 pb.

4.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se o teste exato de Fisher bicaudal para todas as comparações entre as especificidades HLA e alelos, exceto para as seguintes especificidades e alelos: HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1104, HLA-DQB1*0301, HLA-DRB1*0501, para os quais o teste de Fisher unicaudal foi realizado.

A análise multivariada foi realizada para identificar as variáveis independentes associadas com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose (F3-4). As variáveis selecionadas para compor a análise multivariada foram aquelas que apresentaram na análise univariada valor $p < 0,25$ (Hosmer e Lomeshow, 1989).

Considerou-se o intervalo de confiança de 95% e o valor de probabilidade de significância (p) menor ou igual a 0,05.

Para realização das análises utilizou-se o software R (2006, Viena, Áustria).

5. RESULTADOS

5.1- Menor frequência fenotípica da especificidade HLA-DRB1*11 foi observada em portadores de hepatite C quando comparada com o grupo controle.

Dados relacionados às frequências fenotípicas das especificidades HLA-DRB1* entre pacientes HCV e controles são mostrados na Tabela 7 e Figura 7. A análise dos dados mostrou significativa menor frequência do HLA-DRB1*11 em pacientes com hepatite C crônica quando comparada com controles (11,1% e 21,4%, respectivamente, $p=0,04$, $OR=0,46$, $IC95\%=0,00-0,95$). Em análise estendida, não se observou diferença das frequências fenotípicas do HLA-DRB1* entre não cirróticos (F0-2) e com fibrose avançada/cirrose (F3-4) (dados não mostrados).

TABELA 7 - Comparação entre as frequências fenotípicas dos alelos HLA-DRB1* entre pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) e o grupo controle não infectado.

Especificidades HLA-DRB1*	Pacientes HCV positivos (%) n=99	Controles (%) n=103	p	OR
DRB1*01	29,3	27,1		
DRB1*03	20,2	21,3		
DRB1*04	17,2	19,3		
DRB1*07	27,3	26,2		
DRB1*08	13,1	9,7		
DRB1*09	4,0	1,9		
DRB1*10	4,0	0		
DRB1*11	11,1#	21,4	0,04	0,46
DRB1*12	3,0	1,9		
DRB1*13	30,3	23,3		
DRB1*14	5,0	9,7		
DRB1*15	20,2	22,3		
DRB1*16	4,0	6,8		

Observou-se frequência significativamente menor do alelo HLA-DRB1* 11 em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C quando comparado com o grupo controle (11,1% vs 21,4%, # $p=0,04$ $OR=0,46$ $IC95\% 0,00-0,95$). OR =razão de chances.

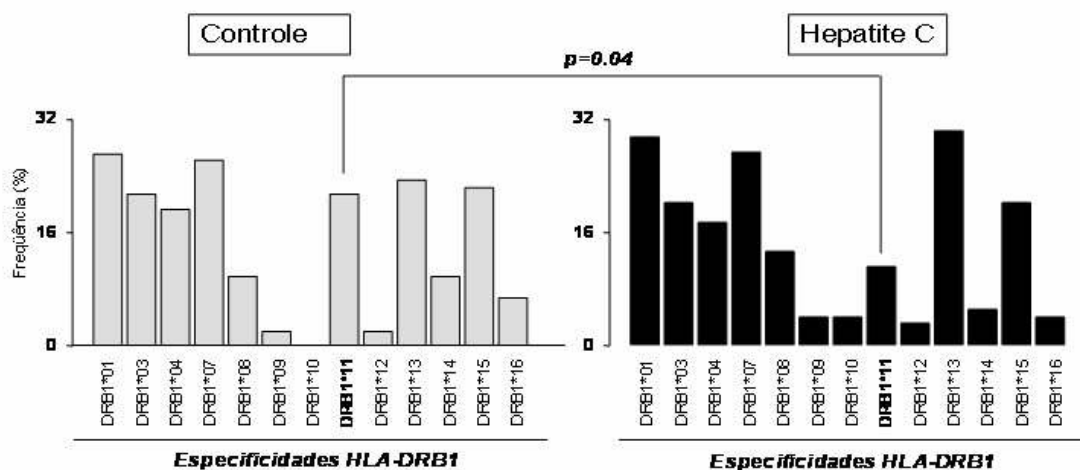


FIGURA 7 - Frequência fenotípica das especificidades do HLA-DRB1* (DRB1*01-16) em pacientes com hepatite C crônica (n=99) e em controles (n=103). Os dados são expressos em percentual de especificidades HLA-DRB1 em cada grupo. A significância estatística ($p < 0,05$) está demonstrada na linha conectora.

5.2- A frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1*11 não diferiu entre pacientes com hepatite C crônica quando comparados com controles.

Análise detalhada dos alelos HLA-DRB1*11 em pacientes e controles são mostrados na (Tabela 8). A análise dos dados não demonstrou nenhuma diferença significativa entre os grupos estudados.

TABELA 8 - Comparação entre as frequências fenotípicas do alelo HLA-DRB1*11 em pacientes infectados pelo HCV e o grupo controle não infectado.

Alelos HLA-DRB1*11	Pacientes HCV positivos (n, %) n=99	Controles (n, %) n=103	p	OR
DRB1*1101	7(7,1)	13(12,6)	0,24	1,89
DRB1*1102	0	0		
DRB1*1103	0	0	0,37	1,99
DRB1*1104	4(4,0)	8(7,8)		

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências fenotípicas dos alelos HLA-DRB1*1101 e HLA-DRB1*1104 entre casos e controles. HCV= vírus da hepatite C. OR=razão de chances.

5.3- Maior frequência fenotípica do alelo HLA-DQB1*0501 foi observada em pacientes com hepatite C crônica quando comparados com controles.

Dados relacionados à frequência fenotípica dos alelos DQB1* em pacientes com hepatite C crônica e controles são mostrados na Tabela 9 e Figura 8. Os dados analisados demonstraram maior frequência significativa do HLA-DQB1*0501 em pacientes com hepatite C crônica quando comparados com controles (34,4% e 20,4%, respectivamente, $p=0,04$, $OR=2,03$, $IC95\% 1,03-4,09$).

TABELA 9 - Comparação entre as frequências fenotípicas dos alelos HLA-DQB1* em indivíduos infectados pelo HCV e o grupo controle não infectado.

Alelos HLA- DQB1*	Pacientes HCV		p	OR
	positivos (n=96) (%)	Controle (n=103) (%)		
DQB1*0201	18,8	11,6		
DQB1*0202	26,0	25,2		
DQB1*0203	0	0		
DQB1*0301	17,7	23,3	0,16	0,59
DQB1*0302	12,5	17,5		
DQB1*0303	5,2	9,7		
DQB1*0304	1,0	0		
DQB1*0305 a 0312	0	0		
DQB1*0401	0	1,0		
DQB1*0402	15,6			
DQB1*0501	34,4#	20,4	0,04	2,04
DQB1*0502	3,1	9,7		
DQB1*0503	5,2	9,7		
DQB1*0504	0	1,9		
DQB1*0601	1,0	2,9		
DQB1*0602	19,8	13,6		
DQB1*0603	21,9	14,6		
DQB1*0604	7,3	13,6		
DQB1*0605	0	1,9		
DQB1*0606	0	0		
DQB1*0607	0	0		
DQB1*0608	0	0		
DQB1*0609	3,1	3,9		
DQB1*0610 a 0620	0	0		

A frequência do alelo HLA-DQB1*0501 foi significativamente maior em pacientes infectados pelo HCV quando comparado com o grupo controle ($p= 0,04$ OR=2,04 IC95% 1,03-4,09). Observou-se que não houve diferença significativa para o alelo HLA-DQB1*0301 em indivíduos infectados pelo HCV quando comparado com o grupo controle ($p=0,16$). HCV= vírus da hepatite C. OR=razão de chances.

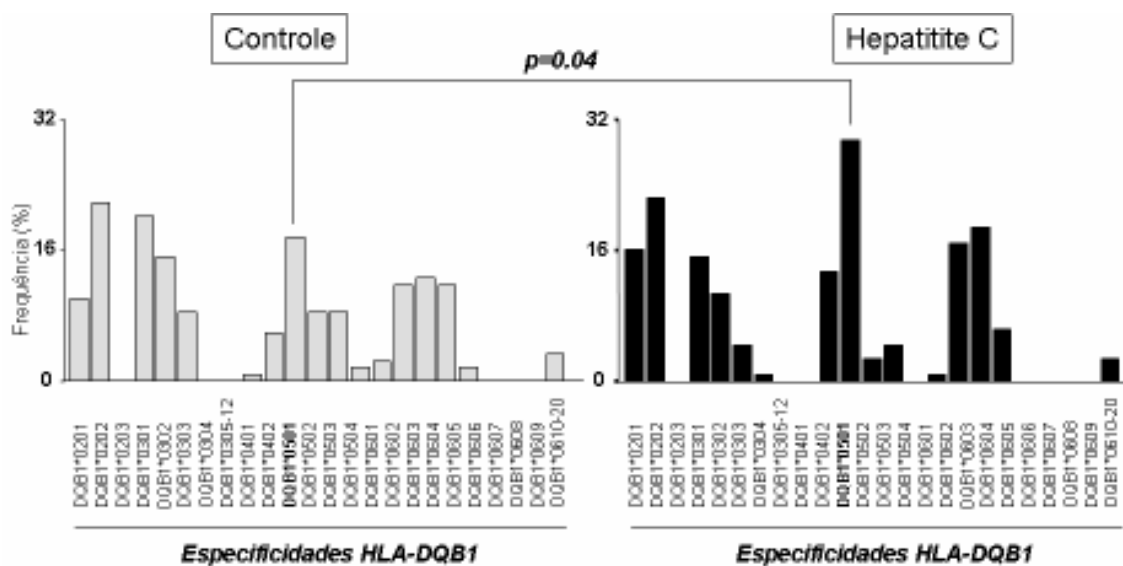


FIGURA 8 - Frequência fenotípica dos alelos HLA-DQB1* (DQB1*02-06) em pacientes com hepatite C crônica (n=99) e em controles (n=103). Os resultados são expressos em percentual de alelos HLA-DQB1* em cada grupo. A significância estatística ($p < 0,05$) está demonstrada na linha conectora.

5.4- O alelo HLA-DQB1*0501 é mais freqüente em pacientes não cirróticos

Uma maior frequência fenotípica do HLA-DQB1*0501 foi observada em pacientes não cirróticos quando comparada com o grupo com fibrose avançada/cirrose (43,8% e 25,0%, $p=0,04$ OR=0,43 IC95% 0,00-0,97) (Tabela 10).

TABELA 10 - Distribuição da frequência fenotípica do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes infectados pelo HCV entre os estádios categorizados em F0-2 e F3-4, independente do tempo de infecção.

Alelo	F0-2 (n= 48)	F3-4 (n= 48)	p	OR
HLA-DQB1*0501	21 (43,8%)	12 (25,0%)	0,04	0,43

Houve maior frequência significativa do alelo HLA-DQB1*0501 entre pacientes categorizados em estádios de fibrose F0-2 quando comparada com F3-4 ($p=0,04$ OR=0,43 IC 95% 0,00-0,97). F0-2 representa estádios de fibrose de F0 a F2. F3-4 representa estádios de fibrose F3 e F4. n = número de pacientes. p representa a probabilidade de significância. OR=razão de chances.

5.5- Associação das variáveis demográficas e genéticas (alelo) com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose, através do modelo de regressão logística múltipla

As variáveis significativas, por análise univariada, utilizadas para compor a análise multivariada foram: o valor de ALT igual ou superior a duas vezes o limite superior do normal ($p=0,003$), a idade por ocasião da biópsia ($p=0,02$), o grau de atividade inflamatória METAVIR ($p=0,18$), a idade por ocasião da infecção ($p=0,09$), logaritmo da carga viral ($p=0,10$), *diabetes mellitus* ($p=0,14$) e a presença do alelo HLA-DQB1*0501 ($p=0,04$).

Na análise multivariada, as variáveis independentes que se associaram com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose (F3-4) foram a idade por ocasião da biópsia ($p=0,002$ OR=1,06 IC 95% 1,02-1,11) e a presença do alelo HLA-DQB1*0501 ($p=0,03$ OR=0,34 IC95% 0,13-0,88). O modelo obtido foi significativo ($p=0,001$). A idade mostrou associação positiva com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose. O alelo HLA-DQB1*0501 mostrou associação negativa com a probabilidade de o paciente ter fibrose avançada/cirrose. Entre os portadores do alelo HLA-DQB1*0501, a chance de serem portadores de fibrose avançada/cirrose foi 0,34 vezes menor em relação aos não portadores desse alelo com a mesma idade.

Na Tabela 11 estão estimadas as probabilidades de o paciente ter fibrose acentuada/cirrose de acordo com a idade e de possuir ou não o alelo HLA-DQB1*0501 obtidas pela seguinte equação de regressão múltipla:

$$P(\text{indivíduo ser F3-4}) = [1 + \text{EXP}\{-(-2,948 + 0,06268 \text{ Idade} - 1,0692 \text{ DQB1*0501})\}]^{-1}$$

TABELA 11 - Probabilidades estimadas de o paciente ter F3-4 de acordo com a idade e de possuir ou não o alelo HLA-DQB1*0501.

Idade (anos)	DQB1*0501	
	NÃO	SIM
25	0,201	0,079
26	0,211	0,084
27	0,222	0,089
28	0,233	0,094
29	0,244	0,100
30	0,256	0,106
31	0,268	0,112
32	0,280	0,118
33	0,293	0,125
34	0,306	0,132
35	0,320	0,139
36	0,334	0,147
37	0,348	0,155
38	0,362	0,163
39	0,377	0,172
40	0,392	0,181
41	0,407	0,190
42	0,422	0,200
43	0,437	0,210
44	0,453	0,221
45	0,468	0,232
46	0,484	0,243
47	0,499	0,255
48	0,515	0,267
49	0,531	0,280
50	0,546	0,293

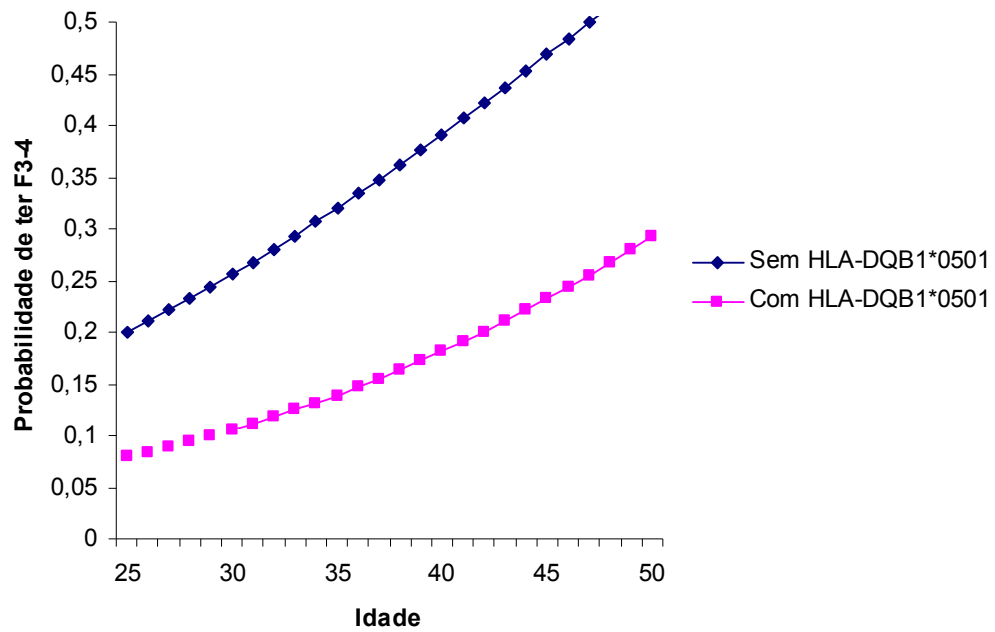


FIGURA 9 - Estimativas para as probabilidades dos pacientes apresentarem fibrose hepática avançada ou cirrose, conforme a idade e a presença ou não do alelo HLA-DQB1*0501.

6. DISCUSSÃO

A hepatite C crônica constitui uma das principais pandemias da atualidade. Sabe-se que a infecção aguda pode cronicar em 55 a 85% dos pacientes e que somente 15% a 45% dos pacientes com infecção aguda podem eliminar o vírus espontaneamente. Além disso, cerca de 30% dos indivíduos portadores de hepatite C crônica evoluem para fibrose hepática avançada, culminando em cirrose hepática 20 a 30 anos após a aquisição do vírus C (Pearlman, 2004; Alberti *et al.*, 2005).

O potencial desta infecção de evoluir para a cirrose e suas complicações tem motivado o investimento em pesquisas que visam a melhor compreensão dos fatores que contribuem para esse desfecho. Tem-se enfatizado amplamente na literatura que são os fatores do hospedeiro, mais do que os virais, os principais responsáveis pela evolução da infecção crônica (Pearlman, 2004; Alberti *et al.*, 2005; Chen e Morgan, 2006; Lloyd *et al.*, 2007).

Entre os fatores do hospedeiro, a maior compreensão da influência dos fatores imunogenéticos para iniciar ou regular a resposta imune na hepatite C constitui um dos principais desafios. Assim, as associações entre antígenos leucocitários humanos (HLA) e a hepatite C crônica têm sido extensivamente investigadas na atualidade em função da influência desses antígenos na história natural desta infecção.

No presente trabalho, estudou-se a associação entre a especificidade e os alelos HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*1101, HLA-DRB1*1104 e HLA-DQB1* e a fibrose hepática em 99 portadores de hepatite C crônica. A frequência fenotípica desses alelos, observada em pacientes, foi comparada à de 103 indivíduos com características étnicas semelhantes, não infectados pelo vírus C, que constituíram o grupo controle histórico. Os resultados demonstraram a maior frequência significativa da especificidade HLA-DRB1*11 nos indivíduos não infectados quando comparados aos portadores de hepatite C crônica ($p=0,037$ OR=0,46 IC95% 0,00–0,95), a despeito de não terem sido observadas diferenças significativas na frequência fenotípica desses alelos entre pacientes com diferentes estádios de fibrose hepática. Na análise estendida, os resultados evidenciaram aumento da Ff

do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes quando comparados aos indivíduos não infectados ($p=0,04$). Contudo, entre os pacientes, notou-se maior frequência desse alelo nos não cirróticos ($p=0,04$ OR=0,43 IC 95% 0,00-0,97), sugerindo seu possível papel protetor contra a evolução da fibrose hepática.

A grande importância dos alelos HLA é que o seu polimorfismo peculiar os torna notáveis na ativação da resposta imune através da sua capacidade de ligar peptídeos virais em sua fenda molecular. A ligação de determinados peptídeos são fenômenos cruciais na eliminação ou não do agente agressor (Klein e Sato, 2000; Ward *et al.*, 2002; Abbas e Lichtman, 2005a). Assim, tem-se intensificado, nos últimos anos, as pesquisas a respeito de sua importância e função na apresentação de antígenos virais aos linfócitos T CD4+ e T CD8+ visando eliminar a infecção viral do hospedeiro (Klein e Sato, 2000; Harcourt, *et al.*, 2001; Hong, *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2007). Há evidências crescentes, por exemplo, de que o clareamento viral espontâneo (Alric *et al.*, 1997; Cramp *et al.*, 1998; Minton *et al.*, 1998; Mangia *et al.*, 1999; Thursz *et al.*, 1999; Vejbaesya *et al.*, 2000; Alric *et al.*, 2000; Fanning *et al.*, 2000; Thio *et al.*, 2001; Azocar *et al.*, 2003; Mckiernan *et al.*, 2000; Yee, 2004, Hong, *et al.*, 2005; Lloyd *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2008) ou a evolução para a cronicidade (Peano *et al.*, 1994; Zavaglia *et al.*, 1998; Kuzushita *et al.*, 1998; Corghi, 2005) na infecção pelo HCV dependem, entre outros fatores, da herança de determinados alelos MHC .

Outros estudos também têm demonstrado que alelos HLA específicos possuem relação com a evolução da hepatite C crônica para os diversos estádios de fibrose, que varia de discreta a acentuada, ou cirrose, em diferentes indivíduos (Peano *et al.*, 1994; Kuzushita *et al.*, 1998; Asti *et al.*, 1999; Mangia *et al.*, 1999). Tem-se relatado maior frequência do alelo DQB1*0501 em pacientes com fibrose discreta quando comparados com portadores de fibrose moderada ou cirrose sugerindo, portanto, que esse alelo atuaria como fator protetor contra a evolução da fibrose hepática (Thursz *et al.*, 1999). Além disso, segundo alguns autores, este alelo pode, também, estar associado à cura espontânea da infecção (McKierman *et al.*, 2000; Thio *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2007) sugerindo a sua importância na história natural da hepatite C crônica.

Em síntese, a herança de determinados alelos HLA parece ter influência no desfecho da infecção pelo HCV no clareamento viral, na persistência do HCV e na evolução da fibrose hepática para os diversos estádios. Contudo, a despeito da recente ampliação de relatos da associação entre os alelos HLA, especialmente os de classe II e a hepatite C em populações européias, americanas e japonesas, são, ainda, escassas, as investigações dessas associações no nosso meio.

Nesta investigação, observou-se significativa menor frequência do HLA-DRB1*11 em pacientes com hepatite C crônica quando comparada com controles (11,1% e 21,4%, respectivamente, $p=0,04$, $OR=0,46$, $IC95\% 0,00-0,95$). Em análise estendida, não se observou diferença das frequências fenotípicas do HLA-DRB1* entre não cirróticos (F0-2) e com fibrose avançada/cirrose (F3-4). Desta forma, a menor frequência do HLA-DRB1*11 observada nesta investigação corrobora relatos prévios, podendo sugerir que os indivíduos sem este alelo seriam mais predispostos à infecção crônica pelo HCV na vigência de uma infecção aguda. A chance de os portadores desse alelo ter fibrose avançada/cirrose nesse estudo foi 0,46 vezes menor do que os indivíduos sem esse alelo ($OR=0,46$).

Uma limitação do presente estudo é o fato de que o grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis, da população geral, sem relato de infecção prévia pelo vírus C. Assim, a frequência fenotípica dos portadores de hepatite C crônica não foi comparada à de indivíduos que curaram a infecção aguda, conforme relatado por diversos autores (Alric *et al.*, 1997; Cramp *et al.*, 1998; Minton *et al.*, 1998; Mangia *et al.*, 1999; Thursz *et al.*, 1999; Vejbaesya *et al.*, 2000; Alric *et al.*, 2000; Fanning *et al.*, 2000; Thio *et al.*, 2001; Azocar *et al.*, 2003) e recentemente confirmada em duas metanálises (Yee, 2004; Hong *et al.*, 2005). Não obstante, o fato de ter sido observada menor frequência do HLA-DRB1*11 em portadores crônicos do HCV do que em indivíduos saudáveis corrobora relato prévio de menor frequência fenotípica desse alelo em portadores do HCV comparados com controles sadios (Yenigun e Durupinar, 2002). Assim, é possível que os portadores desse alelo estivessem menos suscetíveis à infecção crônica.

A relação entre o clareamento viral espontâneo e alguns alelos é atraente, pois pode ser explicada pela maior eficácia de moléculas HLA codificada por esses alelos em

apresentar epítomos virais aos LTCD4+ culminando com uma resposta imune mais vigorosa contra o vírus (Rehermann *et al.*, 1996; Ward *et al.*, 2002). Seguindo essa linha de interpretação, resultados de pesquisa *in vitro* demonstraram maior resposta proliferativa dos LTCD4+ a uma variedade de antígenos derivados do HCV quando as células eram de indivíduos DQB1*0301 positivos comparados aos DQB1* negativos (Harcourt *et al.*, 2001).

No presente trabalho, pôde-se constatar uma freqüência significativamente maior do alelo HLA-DQB1*0501 entre os portadores de hepatite C crônica quando comparada com a do grupo controle. Este fato pode sugerir, por inferência, que indivíduos portadores desse alelo teriam maior suscetibilidade à infecção pelo HCV. Por outro lado, houve maior freqüência significativa do alelo DQB1*0501 em pacientes não cirróticos quando comparada com aqueles com fibrose avançada/cirrose em análise univariada (21/48 43,8% x 12/48 25,0%, $p=0,04$ OR=0,43 IC95% 0,00-0,97) e multivariada ($p=0,03$ OR=0,34 IC95% 0,13-0,88). Em outras palavras, notou-se uma associação negativa entre esse alelo e a probabilidade de o paciente ser portador de fibrose avançada/cirrose. Assim, a chance dos portadores do HLA-DQB1*0501 terem fibrose avançada/cirrose foi 0,34 vezes menor do que os não portadores desse alelo.

Estes intrigantes resultados sugerem que, a despeito da maior freqüência do alelo DQB1*0501 em portadores de hepatite C crônica, pode-se conjecturar um possível papel protetor contra a evolução para a cirrose hepática conferida por esse alelo.

Assim, a despeito de evidências científicas prévias a este respeito (Thursz *et al.*, 1999) e corroboradas nesta investigação, a observação da maior freqüência do HLA-DQB1*0501 entre pacientes portadores de hepatite C crônica nesse estudo, este resultado deverá ser confirmado em estudos posteriores, pois está sujeito a uma associação espúria devida a comparações múltiplas de alelos.

Quanto à associação de idade maior e fibrose mais avançada, observada nesta investigação, isto está de acordo com diversos autores que têm demonstrado que o envelhecimento está associado à maior progressão da fibrose hepática. Explicações para o papel do envelhecimento na progressão da fibrose hepática têm sido, entre

outras, o maior estresse oxidativo e a menor capacidade mitocondrial ou imunológica causadas pela idade (Poynard *et al.*, 1997, Seef, 2002; Poynard *et al.*, 2003a; Poynard *et al.*, 2003b; Boccatto *et al.*, 2006; Massard *et al.*, 2006).

Em síntese, as associações entre alelos HLA classe II e a hepatite C crônica demonstradas neste estudo são evidências complementares de que os fatores do hospedeiro, sobretudo certos alelos HLA, possuem um papel importante na resposta imune na infecção pelo HCV. É importante ressaltar que a resposta a agentes infecciosos é complexa e é modulada pelo polimorfismo de diversos outros genes, como por exemplo, do TGF- β e da angiotensina II. Assim, as pesquisas que visam o maior conhecimento dos fatores genéticos, assim como outros fatores do hospedeiro, preditivos de evolução da fibrose hepática na história natural da hepatite C crônica devem ser incentivadas. O conhecimento ampliado a este respeito deverá contribuir para a maior compreensão da evolução da hepatite C crônica de modo a favorecer o desenvolvimento de tratamentos mais individualizados e eficazes, e até mesmo auxiliar na criação de uma vacina contra o vírus C.

Não obstante as suas limitações, como o pequeno tamanho da amostra examinada e o fato de o grupo controle ser constituído de indivíduos sadios e não indivíduos que curaram a infecção aguda pelo vírus C, esta investigação contribuiu com intrigantes resultados que reforçam possibilidades já descritas e sugerem outras interpretações a respeito da influência de alelos HLA de classe II na história natural da hepatite C crônica.

7. CONCLUSÕES

A menor frequência fenotípica do alelo DRB1*11 em portadores de hepatite C crônica quando comparada à de indivíduos não infectados pode sugerir possível influência desse alelo como um fator imune de proteção contra a infecção pelo HCV.

A maior frequência fenotípica do alelo HLA-DQB1*0501 em pacientes infectados pelo vírus C da hepatite comparada à de indivíduos não infectados pode sugerir maior suscetibilidade à persistência do HCV nos portadores desse alelo.

O alelo DQB1*0501 teve associação negativa com a probabilidade de o paciente ser portador de fibrose avançada ou cirrose. Estes resultados sugerem que a presença desse alelo quando comparada à de indivíduos não infectados, confirma estudos prévios e reitera que há associação desse alelo contra a evolução da fibrose hepática para cirrose em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C.

O aumento da idade pode ser fator associado à evolução da hepatite C crônica para formas mais avançadas de fibrose hepática.

As intrigantes possibilidades de associações entre os antígenos de histocompatibilidade classe II e a hepatite C, sugeridas neste estudo, confirmam relatos prévios e contribuíram para ampliar o maior conhecimento da influência dos fatores do hospedeiro, incluindo os alelos HLA, na história natural da hepatite C. Contudo, estes resultados necessitam ser confirmados em investigações posteriores

8. PROPOSIÇÕES PARA INVESTIGAÇÕES SUBSEQÜENTES

Verificar a freqüência e a influência dos alelos HLA-DRB1* e HLA-DQB1* na evolução da fibrose hepática e na resposta ao tratamento da hepatite C crônica em estudos prospectivos com maior número de pacientes.

O estudo do perfil de citocinas e de células TCD4+ e TCD8* em portadores de hepatite C crônica poderá contribuir com valiosas informações sobre a influência desses fatores na evolução da fibrose hepática.

Investigar as freqüências dos alelos HLA-DRB1* e HLA-DQB1* em pacientes submetidos à transplante hepático e estabelecer associações com rejeição aguda, recidiva da hepatite C e evolução para cirrose em indivíduos sob imunossupressão.

Estudar o polimorfismo dos alelos HLA-DRB1* e DQB1*, da angiotensina II e do TGF- β na doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), uma vez que estes polimorfismos têm sido descritos como preditivos de fibrose hepática em pacientes portadores da DHGNA.

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. Propriedades gerais das respostas imunológicas. In: *Imunologia celular e molecular*, 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005a. cap. 1, p. 3-15.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. O complexo principal de histocompatibilidade. In: *Imunologia celular e molecular*, 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005b. cap. 4, p. 65-81.

ADINOLFI, L.E.; *et al.* Relationship between genotypes of hepatitis C virus and histopathological manifestations in chronic hepatitis C patients. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v.12, n.3, p. 299-304, 2000.

AFDHAL, N. The natural history of hepatitis C. *Seminars in Liver Disease*, v.24, suppl.2, p. 3-8, 2004.

ALBERTI, A.; *et al.* Chronic hepatitis C: Natural history and cofactors. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, v.22, suppl.2, p.74-78, 2005.

ALRIC L.; *et al.* Genes of the major Histocompatibility complex class II influence the outcome of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*, v.113, n.5, p.1675-1681, 1997.

ALRIC L.; *et al.* Study of host and viral-related factors associated with spontaneous hepatitis C virus clearance. *Tissue Antigens*, v.56, p.154-158, 2000.

ASTI, M.; *et al.* Human leukocyte antigen class II and III alleles and severity of hepatitis C virus-related chronic liver disease. *Hepatology*, v.29, n.4, p.1272-1279, 1999.

AZOCAR, J.; CLAVIJO, O. P.; YUNIS, E. J. MHC class II genes in HCV viral clearance of hepatitis C Infected patients. *Human Immunology*, v.64, n.1, p. 99-102, 2003.

BEDOSSA, P., POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, v.24, n.2, p.289-293, 1996.

BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Transforming Growth factor-beta (TGF- β): a key-role in liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*, v.22, suppl. 2, p.37-42, 1995.

BELLENTANI, S., *et al.* Clinical course and risk factors of hepatitis C virus related liver disease in the general population: report from the Dionysos study. *Gut*, v.44,n.6, p.874-880, 1999.

BOCCATO, S.; *et al.* Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, v.13, n.5, p.297-302, 2006.

BODMER, W. F. What's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens*, v.49, n. 3, p.293-296, 1997.

BOWEN, D.G.; WALKER, C. M. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature*, v.436, p.946-952, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria*, nº 863, de 4 de novembro de 2002. Dispõe sobre o Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas -hepatite viral crônica C. Disponível em <http://www.servicos.ms.gov.br/saude>, acesso em 15 nov. 2007.

BREWERTON, D.A.; *et al.* Ankylosing spondylitis and HLA-A 27. *The Lancet*, v.1, n.7809, p.904-907, 1973.

BRUIJNE, J.; *et al.* Treatment of chronic hepatitis C virus infection: Dutch national guidelines. *The Netherlands Journal of Medicine*, v.66, n.7, p.311-322, 2008.

CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. A map of the human histocompatibility complex. *Immunology Today*, v.18, p. 43, 1997.

CHANG, K.M.; *et al.* Differential CD4+ and CD8+ T-cell responsiveness in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, v.33, n.1, p.267-276, 2001.

CHEN, S. L.; MORGAN, T.R. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *International Journal of Medical Sciences*, v.3, n.2, p.47-52, 2006.

CHOO, Q. L.; *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, v.244, n.4902, p.359-362, 1989.

CORGHI, D. B. *Estudo dos alelos HLA classe II (Loci DRB1 e DQB1) em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C.* 2005. 77f. Dissertação (Mestrado) - UNICAMP, Campinas. 2005.

CRAMP, M. E.; *et al.* Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *Journal of Hepatology*, v.29, p.207-213, 1998.

CRISTINA, J. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus in the Latin American region. *Journal of Clinical Virology*, v.34, suppl. 2, p. 1-7, 2005.

FANNING, L.J.; *et al.* Viral clearance in hepatitis C (1b) infection: relationship with human leukocyte antigen class II in a homogeneous population. *Hepatology*, v.31, n.6, p.1334-1337, 2000.

FANNING, L. J.; *et al.* HLA class II genes determine the natural variance of hepatitis C viral load. *Hepatology*, v.33, n.1, p.224-230, 2001.

FOCCACIA, R.; *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serological survey of a stratified randomized and residence-based population. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.2, n.6, p.269-284, 1998.

FRIED, M. W.; *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, v.347, n.13, p.975-982, 2002.

FRIEDMAN, S.L. Liver fibrosis: from bench to bedside. *Journal of Hepatology*, v.38, p.38-53, 2003.

FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology and Hepatology*, v.1, n.2, p.98-105, 2004.

FRIEDMAN, S.L. Mac the knife? Macrophages the double-edged sword of hepatic fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, v.115, n.1, p.29-32, 2005.

FRIEDMAN, S.L.; BANSAL, M.B. Reversal of hepatic fibrosis: fact or fantasy? *Hepatology*, v.43, suppl. 2, p.82-88, 2006.

HADZIYANNIS, S.J. *et al.* Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Annals of Internal Medicine*, v.140, n. 5, p. 346-355, 2004.

HAN, Y.N.; *et al.* Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World Journal of Gastroenterology*, v.11, n.36, p.5721-5724, 2005.

HARCOURT, G.; *et al.* Effect of HLA class II genotype on T helper lymphocyte responses and viral control in hepatitis C virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*, v.8, n.3, p.174-179, 2001.

HARRIS, R.A.; *et al.* Human leukocyte antigen class II associations with hepatitis C virus clearance and virus-specific CD4 T cell response among Caucasians and African Americans. *Hepatology*, v.48, n1, p.70-79, 2008.

HONG, X.; *et al.* Human leukocyte antigen class II DQB1*0301, drb1*1101 alleles and spontaneous clearance of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *World Journal of Gastroenterology*, v.11, n.46, p.7302-7307, 2005.

HOSOI, K.; *et al.* The serum soluble HLA-DR antigens as a predictor marker of response to interferon alfa treatment in patients with chronic hepatitis C. *Tokai Journal of Experimental Medicine*, v.25, n.3, p.117-124, 2000 .

HOUGHTON, M.; ABRIGNANI, S. Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, v.436, p.961-966, 2005.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. *Applied logistic regression*. New York: J. Wiley, 1989. 307p.

JEWELL, D.P. Ulcerative colitis. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B. F.; SLEISENGER, M. *Gastrointestinal and liver disease*. 6th. ed. Philadelphia: Saunders Company, 1998. cap. 102, p.1735-1761.

JIANG, Y. G.; *et al.* Association between HLA clas II gene and susceptibility or resistance to chronic hepatitis B. *World Journal of Gastroenterology*, v.9, n.10, p.2221-2225, 2003.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system: first of two parts. *The New England Journal of Medicine*, v.343, n.10, p.702-709, 2000.

KORNBLUTH, A.; SACHER, D. B.; SALOMON, P. Crohn`s disease. In: FELDMAN, M.; SCHARSCHMIDT, B. F.; SLEISENGER, M. *Gastrointestinal and liver diseases*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Company, 1998. cap. 101, p.1708-1734.

KSIAA, L.; *et al.* Clearance and persistence of hepatitis C virus in a Tunisian population: association with HLA class I and class II. *Viral Immunology*, v.20, n. 2, p.312-319.2007.

KUZUSHITA, N.; *et al.* Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individual infected with hepatitis C virus. *Hepatology*, v.27, n.1, p.240-244, 1998.

LAUER G.M.; WALKER, B.D. Hepatitis C virus infection. *The New England Journal of Medicine*, v.345, n.1, p.41-52, 2001.

LI, D.; FRIEDMAN, SL. Liver fibrogenesis and the role of hepatic stellate cells: New insights and prospects for therapy. *Journal of Gastroenterology*, v.14,n.7, p.618-633, 1999.

LLOYD, A.R.; *et al.* Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunology and Cell Biology*, v.85, n.1, p.24-32, 2007.

MANGIA, A.; *et al.* HCV genotypes in patients with liver disease of different stages and severity. *Journal of Hepatology*, v.26, n.6, p.1173-1178, 1997.

MANGIA, A.; *et al.* HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *Journal. of Hepatology*, v.30, n.6, p.984-989, 1999.

MANNS, M.P.; *et al.* Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared to interferon alfa-2b plus ribavirin for the treatment of chronic hepatitis C: a randomized trial. *The Lancet*, v.358, n. 9286, p.958-965, 2001.

MASSARD, J.; *et al.* Natural history and predictors of disease severity in chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, v.44, suppl.1, p.19-24, 2006.

McHUTCHINSON, J. G. Understanding hepatitis C. *The American Journal of Managed Care*, v.10, n.2, p. 21-29, 2004.

McHUTCHINSON, J.G.; BACON, B.R. Chronic hepatitis C: an age wave of disease burden. *The American Journal of Managed Care*, v.11, Supl.10, p.286-295, 2005.

McKIERNAN, S. M.; *et al.* The MHC is a major determinant of viral status, but not fibrotic stage, in individuals infected with hepatitis C. *Gastroenterology*, v.118, n.6, p. 1124-1130, 2000.

MINTON, E. J.; *et al.* Association between MHC class II alleles and clearance of circulating hepatitis C virus. Members of the Trent Hepatitis C Virus Study Group. *Journal of Infectious Disease*, v.178, n.1, p.39-44, 1998.

MORGUN, A.; *et al.* HLA-DQB1 and -DRB1 alleles, cytokine polymorphisms and KIR gene frequencies in a population (caucasian) from South East Brazil. *Human immunology*, v.65, p.879-882.2004.

NELSON, D. R.; *et al.* Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon non-responders. *Gastroenterology*, v.118, n.4, p.655-660, 2000.

PARHAM, P. Elementos do sistema Imune e seu papel na Defesa. In: *O Sistema Imune*. Porto Alegre: Artmed, 2001. cap. 1, p. 2-30.

PATEL, K. ; *et al.* HLA class I allelic diversity and progression of fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, v.43, n.2, p.241-249, 2006.

PEANO, G.; *et al.* HLA DR5 antigen: a genetic factor influencing the outcome of hepatitis C virus infection. *Archives of Internal Medicine*, v.154, n.23, p.2733-2736, 1994.

PEARLMAN, B.L. Hepatitis C infection: A clinical review. *Southern Medical Journal*, v.97, n.4, p.365-373, 2004.

PETERS M.G.; TERAULT, N.A. Alcohol use and hepatitis C. *Hepatology*, v.36, n.5, p.220-225, 2002.

POWELL, E.E.; *et al.* Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology*, v.31, n.4, p.828-833, 2000.

POYNARD, T.; *et al.* A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *Journal of Hepatology*, v.38, n.3, p.257-265, 2003a.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *The Lancet*, v. 349, n. 9055, p.825-832, 1997.

POYNARD, T.; *et al.* Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, v.34, p.730-739, 2001.

POYNARD, T.; *et al.* Viral hepatitis C. *The Lancet*, v.362, p.2095-2100, 2003b.

RATZIU, V.; *et al.* An expected virus-host interaction- the hepatitis C virus-diabetes link. *Alimentary Pharmacology Therapeutics*, v.22, suppl. 2, p.56-60, 2005.

REHERMANN, B.; *et al.* Differential Cytotoxic T Lymphocyte Responsiveness to the Hepatitis B and C Viruses in Chronically Infected Patients. *Journal of Virology*, v.70, n.10, p.7092-7102, 1996.

ROBERTS, E.A.; YEUNG L. Maternal-infant transmission of hepatitis C virus infection. *Hepatology*, v.36, n.5, suppl.1, p.106-113, 2002.

ROOD, J.J.V. Women, pregnancy and serendipity: A personal story about the discovery of HLA. *Journal of Nefrology*, v.17, n.3, p.467-474, 2004.

SEEF, L. B. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*, v.36, n.5, suppl.1, p. S35-S46, 2002.

SPADA, E.; *et al.* Multispecific T cell response and negative HCV RNA tests during acute HCV infection are early prognostic factors of spontaneous clearance. *Gut*. v.53, n.11, p. 1673-81, 2004.

SHEPARD, C.W.; FINELLI, L.; ALTER., M.J. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *The Lancet Infectious Diseases*, v.5, n.9, p. 558-567, 2005.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. *Diseases of the liver and biliary system*. 11th. ed. Oxford: Blackwell, 2002. cap. 15, p.255-265.

SCHREUDER, G. M. ; *et al.* The HLA dictionary 1999: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, -DQB1 alleles and their association with serologically defined HL-A, -B, -C -DR and -DQ antigens. *Tissue Antigens*, v.54, n.4, p.409-437, 1999.

SINGH, R.; *et al.* A comparative review of HLA association with hepatitis B and C viral infections across global populations. *World Journal of Gastroenterology*, v.13, n.12, p.1770-1787, 2007.

SILVA, L.; *et al.* Prevalência do vírus da hepatite C em populações urbana e rural no nordeste do Brasil: estudo piloto. *Arquivos of Gastroentology*, v.32, n.4, p.168-171, 1995.

SIMMONDS, P.; *et al.* Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*, v.42, n.4, p.962-973, 2005.

SO, A. Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region Genes. In: LECHLER, R. *HLA and diseases*. San Diego: Academic Press Inc, 1994. cap. 1, p.1-34.

STRADER, D. B. ; *et al.* AASLD PRACTICE GUIDELINE: Diagnosis, Management, and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology*; v.39, n.4, p. 1147-1171, 2004.

SULLIVAN, K. A.; AMOS, B. HLA System and its detection. In: ROSE, N. R.; HAMILTON, R. G.; DETRICK, B. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3rd. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1986. cap. 130, p. 835-846.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease associations: Detecting the strongest association. *Tissue Antigens*, v. 43, n.1, p.18-27, 1994.

TEIXEIRA, R. ; VELASCO, H.M.A. Epidemiologia e Impacto da Infecção pelo Vírus C na Saúde Pública. In: TEIXEIRA, R; MARTINS FILHO, O. A; OLIVEIRA, G. C. *Hepatite C: aspectos críticos de uma epidemia silenciosa*. Belo Horizonte: COOPMED, 2005, cap. 1, p.1-12.

TERRAULT, N. A.; WRIGHT, T. L. Viral Hepatitis A through G. In: *Gastrointestinal and Liver Disease*. 5th. ed. Philadelphia: Sunders, 1998. cap.68, p.1123-1170.

THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBER, F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C vírus. *Antiviral Research*, v.69, n.3, p.129-141, 2006.

THIO, C.L.; *et al.* Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *Journal of Infectious Disease.*, v.184,n.1, p.16-21, 2001.

THORSBY, E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Human Immunology*, v.53, n.1, p.1-11, 1997.

THURSZ, M.; *et al.* Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *The Lancet*, v.354, n.9196, p.2119-2124, 1999.

TIBBS, C.; *et al.* Evidence that the HLA DQA1*03 allele confers protection from chronic HCV-infection in Northern European Caucasoids. *Hepatology*, v.24, n.6, p.1342-1345, 1996.

VEJBAESYA, S.; *et al.* HLA Association with virus infection. *Human Immunology*, v.61,p.348-353, 2000.

WANG, L. Y.; *et al.* Human leukocyte antigen phenotypes and hepatitis C viral load. *Journal of Clinical Virology*, v.32, n.2, p.144-150, 2005.

WARD, S.; *et al.* Cellular immune responses against hepatitis C virus: the evidence base 2002. *Clinical and Experimental Immunology*, v.128, n.2, p.195-203, 2002.

WATSON, J. Moléculas do reconhecimento imunológico. In: *O DNA recombinante*, 2 ed. Ouro Preto: UFOP, 1997. cap.16, p.289-308.

WAWRZYNOWICZ-SYCZEWSKA, M.; *et al.* Natural history of acute symptomatic hepatitis type C. *Infection*, v.32, n.3 ,p.138-143, 2004.

WHO. Global database on blood safety: summary report 1998 - 1999. Disponível em <http://www.who.int/bloodsafety/global-database/en/SumRep-English.pdf> . Acesso em 3 Agosto, 2005.

YEE, L.J. Host genetic determinants in hepatitis C virus infection. *Genes Immunology*, v.5, n.4, p.237-245, 2004.

YENIGÜN, A.; DURUPINAR, B. Decreased frequency of HLA-DRB1*11 Allele in patients with chronic Hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, v.76, n.4,p.1787-1789, 2002.

YOSHIZAWA, K.; *et al.* Long-term follow-up of hepatitis C virus infection: HLA class II loci influences natural history of disease. *Tissue Antigens*, v.61, n.2, p.159-165, 2003.

YU, M. L.; *et al.* Human leukocyte antigen class I and II alleles and response to interferon-alpha treatment, in Taiwanese patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Disease*, v.188,p.62-65, 2003.

ZARIFE, M. A.; *et al.* Prevalence of hepatitis C virus infection in north-eastern Brazil: a population-based study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.100, n.7, p.663-668, 2006.

ZAVAGLIA, C.; *et al.* Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, v.28, n.1, p.1-7, 1998.

10. ANEXOS

Anexo 1- Termo de consentimento livre e esclarecido

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA impacto dos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA) na história natural da Hepatite C crônica

Prezado(a) paciente,

Você foi selecionado(a) para participar de uma pesquisa por ser portador crônico do vírus da hepatite C.

O objetivo desse estudo é analisar o perfil genético e a resposta do seu organismo a esta infecção pelo vírus da hepatite C e as diferentes formas de apresentação desta doença. O conhecimento desses dados nos permitirá conhecer melhor a evolução da doença e orientar aos portadores desse vírus.

Sua participação neste estudo é completamente voluntária. Caso concorde em participar da pesquisa, precisaremos usar uma única amostra de sangue (15 ml) colhida em uma veia do seu braço por um profissional treinado, além de consultar os dados de seu prontuário e você responderá a um questionário. O sangue colhido será usado exclusivamente para os exames propostos nesta pesquisa.

Faremos o máximo para minimizar os riscos e desconfortos. Todos os dados coletados serão sigilosos. Você poderá perguntar as dúvidas a respeito desse estudo que surgirem no decorrer da pesquisa, além de que será informado de todos os achados pertinentes durante o estudo. **Caso você não queira participar do estudo, sinta-se livre para fazê-lo, sem nenhum prejuízo para você.**

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Dna. Rosângela Teixeira ou Dr. Luiz Otávio Freire Cangussu pelo telefone (031) 3348-9933. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, que a aprovou.

Eu _____, concordo em participar do estudo

Paciente

Pesquisador responsável

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP)

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº : ETIC 062/98
Interessada : Profa. Rosângela Teixeira

VOTO:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP aprova definitivamente no dia 30.09.98 o projeto de pesquisa intitulado: *«Associação entre os antígenos de histocompatibilidade, os genótipos do vírus C, o acometimento hepático e a resposta terapêutica na hepatite crônica C»* e o Termo de Consentimento do referido projeto, de interesse da Profa. Rosângela Teixeira. O COEP sugere acrescentar no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido o endereço e o telefone do pesquisador e do COEP/UFMG. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Lineu Freire Maia
Presidente em exercício do COEP

Av. Alfredo Balena, 110-1º andar
Bairro Santa Efigênia - Cep: 30.310-100 - Belo Horizonte-MG
Telefone: (031) 226-2846 - 222-2445 - 229-7130
FAX: (031) 226-8277 - Telex: (031) 2544

PUBLICAÇÃO RELATIVA AO TEMA DESTA TESE:

CANGUSSU, L. O. F.; BRANDÃO, R.A.C.S; SIMÕES, C. S.; TEIXEIRA, R. O Complexo Principal de Histocompatibilidade. In: TEIXEIRA, R; MARTINS FILHO, O. A; OLIVEIRA, G. C. *Hepatite C: Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa*. Belo Horizonte: COOPMED, 2005, cap. 6, p.57-63.

TEMAS LIVRES APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS

CANGUSSU L. O. F.; SILVA, L.H.; CABRAL, R.; SOUZA, F.C.; RAMPIM, G.F.; CAMPOS, E.F.; GERBASE DE LIMA, M.; CAMBRAIA, R.D.; MEDEIROS JÚNIOR, W.J.; TEIXEIRA, R. Associação entre hepatite C crônica e HLA-DRB1*11. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO EM HLA E DOENÇAS, 1, 2006, Rio de Janeiro. *Anais..Rio de Janeiro: CPUERJ, 2006, p. 19.* (Agraciado como o melhor tema livre apresentado no evento)

CANGUSSU, L O. F.; GERBASE, M.; CAMPOS, E. F. RAMPIM, G. F.; CABRAL, R.; SILVA, L. H.; BRANDÃO, A.C.S.; SIMÕES, C.S; TEIXEIRA, R. Associação entre os polimorfismos dos Antígenos Leucocitários humanos HLA-DRB1* e DQB1* e a Hepatite C Crônica. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*, v.36, n.S3, p. S70, 2006.

CANGUSSU, L. O. F.; TEIXEIRA, R.; CAMPOS, E.F.; RAMPIM, G.F.; MINGOTI, S.A.; SOUZA, F.C.; CABRAL, R.; SILVA, L. H.; MEDEIROS JÚNIOR, W.J.; GERBASE DE LIMA, M.; MARTINS FILHO, O.A. Impacto dos Antígenos Leucocitários humanos (HLA) na história natural da hepatite C crônica. In: II SIMPÓSIO BRASILEIRO EM HLA E DOENÇAS, 2, 2007, Rio de Janeiro, *Anais...Rio e Janeiro: CPUERJ, 2007, p.19.*

CANGUSSU, L. O. F.; TEIXEIRA, R.; GERBASE DE LIMA; M.; CAMPOS, E.F.; RAMPIM, G.F.; FABIANO, R. C.; SILVA, L. E.; MINGOTI, S.A.; SOUZA, F.C.; MARTINS FILHO, O.A. Influência dos fatores virais e do hospedeiro, com ênfase nos antígenos leucocitários humanos (HLA), na história natural da hepatite C crônica. *Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva*, v. 26, p.S56, 2007.

TEMA LIVRE SUBMETIDO À COMISSÃO CIENTÍFICA DO CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO AMERICANA PARA O ESTUDO DO FÍGADO (AASLD) A SER REALIZADO EM 2008:

Luiz Otávio Freire Cangussu¹, Maria Gerbase-DeLima² Sueli Aparecida Mingoti³, Erika Fernandes Campos², Gisele Fabianne Rampim², Olindo Assis Martins-Filho⁴, Rosângela Teixeira¹. The influence of HLA in HCV infection and in the clinical outcome in patients with chronic hepatitis C.

ARTIGO ORIGINAL SUBMETIDO AO PERIÓDICO LIVER INTERNATIONAL:

Luiz Otávio Freire Cangussu, Maria Gerbase-DeLima , Sueli Aparecida Mingoti, Erika Fernandes Campos, Gisele Fabianne Rampim, Olindo Assis Martins-Filho, Rosângela Teixeira. The influence of HLA in the clinical outcome of patients with chronic hepatitis C.