

**PATRÍCIA CARLOS CALDEIRA**

**INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM GLÂNDULAS SALIVARES MENORES E AMOSTRAS  
HEPÁTICAS DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA: PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO  
E IMUNOFENÓTIPO.**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
2014**

**PATRÍCIA CARLOS CALDEIRA**

**INFILTRADO INFLAMATÓRIO EM GLÂNDULAS SALIVARES MENORES E AMOSTRAS  
HEPÁTICAS DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA: PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO  
E IMUNOFENÓTIPO.**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Patologia Bucal.

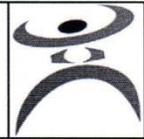
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Vieira do Carmo.

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE  
2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Infiltrado inflamatório em glândulas salivares menores e tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica: padrão de distribuição e imunofenótipo.**

**PATRICIA CARLOS CALDEIRA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2014, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Maria Auxiliadora Vieira do Carmo - Orientador  
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza  
Pontifícia Universidade Católica

Prof(a). Rosangela Teixeira  
Faculdade de Medicina da UFMG

Prof(a). Martinho Campolinha Rebello Horta  
Puc Minas

Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva  
UFMG

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA PATRICIA CARLOS CALDEIRA

Realizou-se, no dia 10 de fevereiro de 2014, às 09:00 horas, Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Infiltrado inflamatório em glândulas salivares menores e tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica: padrão de distribuição e imunofenótipo.*, apresentada por PATRICIA CARLOS CALDEIRA, número de registro 2010720037, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Maria Auxiliadora Vieira do Carmo - Orientador (Faculdade de Odontologia da UFMG), Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Pontifícia Universidade Católica), Prof(a). Rosângela Teixeira (Faculdade de Medicina da UFMG), Prof(a). Martinho Campolina Rebello Horta (Puc Minas), Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 10 de fevereiro de 2014.

Prof(a). Maria Auxiliadora Vieira do Carmo (Doutora)

Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Doutor)

Prof(a). Rosângela Teixeira (Doutora)

Prof(a). Martinho Campolina Rebello Horta (Doutor)

Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva (Doutora)

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Cida e Antônio,  
ao meu irmão, Antônio Jr.  
e ao meu marido, Lucas.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tantas bênçãos alcançadas.

Aos meus pais, por serem as fontes incessantes de amor e de exemplos a seguir.

Ao meu irmão, pelo carinho, cuidado e pelo exemplo de determinação e coragem.

Ao meu marido, por me ensinar amorosamente o dom da paciência e da bondade cotidianas.

À família e amigos, sempre presentes, companheiros indispensáveis.

À Professora Dorinha, pela amizade, por todos os momentos partilhados, pelos valiosos ensinamentos, pelo apoio, incentivo e compreensão.

À Professora Cássia, pelo exemplo de dedicação, pela amizade e apoio.

À Professora Tarcília pela parceria, convivência, ensinamentos e pela valiosa contribuição no exame de Qualificação.

Aos Professores Ricardo Mesquita, Ricardo Gomez e Vagner Santos, pelos ensinamentos.

Ao Professor Paulo Alencar, pelas considerações pertinentes e relevantes no exame de Qualificação.

Às Professoras Paula Vidigal (Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais) e Aline Batista (Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás), pela contribuição no trabalho.

À aluna Karla, pela participação na pesquisa e pelos bons momentos partilhados.

Às funcionárias do CPC, pelos anos de convivência agradável.

Aos alunos para os quais pude lecionar durante os dois anos como professora substituta, por me inspirarem e por me tornarem uma profissional mais madura e completa.

Aos pacientes, razão de nossa busca constante pelo conhecimento.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por proporcionar minha qualificação profissional.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

*“A verdadeira excitação do que você está fazendo é o ato de fazê-lo. Não é o que você vai conseguir fazer no final – não é a cortina final – é realmente o fazer e amar o que está fazendo”.*

*Ralph Lauren*

## RESUMO

A hepatite C crônica afeta aproximadamente 3% da população mundial e se tornou a maior responsável por cirrose e transplante hepático no mundo Ocidental. É causada pelo vírus da hepatite C, sendo a inflamação hepática uma das consequências da infecção. Dentre as alterações consideradas extra-hepáticas ligadas às glândulas salivares, a síndrome *sicca* afeta 4 a 57% dos pacientes. No entanto, poucos estudos buscaram esclarecer a composição do infiltrado inflamatório glandular e sua possível relação com outras características da doença. O presente estudo objetivou caracterizar a composição e a distribuição do infiltrado inflamatório presente em glândulas salivares menores de pacientes portadores de hepatite C crônica, comparando com o infiltrado presente em fígado e com dados laboratoriais dos pacientes. Foi realizada técnica de imunistoquímica para CD3 (linfócitos T), CD20 (linfócitos B), CD8 (linfócitos T citotóxicos), CD4 (linfócitos T *helper*), CD57 (células *natural killer*), CD68 (macrófagos) e S100 (células dendríticas) em 61 amostras de glândulas salivares e 59 de fígado. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas. Quanto ao padrão de distribuição, o infiltrado inflamatório foi classificado em focal ou difuso. Testes estatísticos Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, ANOVA e “t” de *Student* foram empregados e valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. O infiltrado inflamatório apresentou distribuição difusa em 57,4% das glândulas e 13,6% de fígado. Células CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> foram as mais frequentes em ambos os tecidos, com razão CD3/CD20 de 1,17 em glândula e 1,90 em fígado. A razão CD4/CD8 em glândula foi 0,30 e em fígado, 1,06. Células CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> e S100<sup>+</sup> representaram baixa porcentagem em ambos os tecidos. Índices maiores de CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ( $p < 0,05$ ) foram encontrados no infiltrado glandular focal, quando comparado com difuso. Comparações entre todos os índices em glândula salivar e grau METAVIR (A0, A1 ou A2), genótipo viral (1a, 1b ou 3a), carga viral (baixa ou alta) e presença de HCV RNA na glândula (presente ou ausente) não revelaram significância estatística ( $p > 0,05$ ). Todas as comparações entre os índices de glândula salivar e fígado mostraram significância estatística ( $p < 0,05$ ), com todos os marcadores, exceto S100<sup>+</sup>, apresentando índices maiores em fígado. Concluiu-se que o infiltrado inflamatório presente em glândulas salivares de pacientes com hepatite C crônica é composto principalmente por linfócitos T e B, destacando-se os linfócitos T citotóxicos. A porcentagem dos subtipos leucocitários presentes em glândula salivar está relacionada ao seu padrão de distribuição, mas não ao grau METAVIR, genótipo, carga viral e presença local do vírus. Os mesmos tipos celulares observados no infiltrado inflamatório do fígado podem ser visualizados nas glândulas, exceto os linfócitos T *helper*, que são escassos neste tecido, porém o fígado apresenta maior proporção de células.

**Palavras-chave:** hepatite C, glândula salivar, inflamação, fígado, imunistoquímica, HCV.

## ABSTRACT

### **Inflammatory infiltrate in salivary glands and liver of patients with chronic hepatitis C: pattern of distribution and immunophenotype.**

Chronic hepatitis C affects over 3% of global population and has become the major cause of cirrhosis and hepatic transplantation in Occidental world. It is caused by the hepatitis C virus and hepatic inflammation is one of the consequences of the infection. Among extra-hepatic alterations related to salivary glands, *sicca* syndrome affects between 4 and 57% of patients. Nevertheless, few studies intended to elucidate the composition of the inflammatory infiltrate and its possible relation to other features of the disease. The present study aimed to characterize the composition and distribution of the inflammatory infiltrate seen in minor salivary glands of patients with chronic hepatitis C, comparing with liver inflammation and laboratorial data of patients. Immunohistochemistry was performed to CD3 (T lymphocytes), CD20 (B lymphocytes), CD8 (cytotoxic T lymphocytes), CD4 (helper T lymphocytes), CD57 (natural killer cells), CD68 (macrophages), and S100 (dendritic cells) in 61 samples of salivary glands and 59 of liver. Results were expressed in percentage of positive cells. The pattern of distribution of the inflammatory infiltrate was classified as focal or diffuse. Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, ANOVA e "t" de Student statistical tests were used and p values lower than 0.05 were considered statistically significant. Diffuse inflammatory infiltrate was present in 57.4% of salivary glands and in 13.6% of liver biopsies. CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> were the most frequent cells in both tissues, with a CD3/CD20 ratio of 1.17 in salivary glands and 1.90 in liver. CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in salivary glands was 0.30 and 1.06 in liver. CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, and S100<sup>+</sup> were found in a low percentage in both tissues. Higher CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> indexes (p<0.05) were seen in SG with focal infiltrate than with diffuse infiltrate. Comparisons of all markers in salivary glands and METAVIR grade (A0, A1 or A2), viral genotype (1a, 1b or 3a), viral load (low or high), and presence of HCV RNA in salivary gland (present or absent) were not statistically significant (p>0.05). Comparison between all salivary glands and liver indexes revealed statistically significant differences (p<0.05), with higher indexes found in liver, except S100<sup>+</sup>. We concluded that T and B lymphocytes were the most common leucocytes found in salivary glands of patients with chronic hepatitis C, especially cytotoxic T cells. The percentage of leucocyte subtypes detected in salivary glands is related to the distribution pattern of inflammation, but not to METAVIR grade, viral genotype, viral load, and local presence of HCV RNA. The same inflammatory cells found in liver can be seen in salivary glands, except CD4<sup>+</sup>, which were scarce in this tissue, but liver reveals a higher proportion of cells.

**Key words:** hepatitis C, inflammation, salivary glands, liver, immunohistochemistry, HCV.

## LISTA DE ABREVIATURAS

HCV – vírus da hepatite C

HCV-RNA – ácido ribonucleico do vírus da hepatite C

IFN – interferon

IL – interleucina

LB – linfócito B

LT – linfócito T

MHC – complexo maior de histocompatibilidade

NK – *natural killer*

PCR – reação em cadeia da polimerase

TNF – fator de necrose tumoral

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1. Hepatite C crônica e vírus da hepatite C.....	15
2.2. Resposta imune-inflamatória à infecção pelo HCV.....	16
2.2.1. Resposta imune inata.....	16
2.2.2. Resposta imune adaptativa.....	19
2.3. Alterações hepáticas na infecção pelo HCV .....	22
2.4. Afecções das glândulas salivares na hepatite C crônica.....	24
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
3.1. Objetivo Geral .....	29
3.2. Objetivos Específicos.....	29
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>30</b>
4.1. Amostras .....	31
4.2. Análise do padrão de distribuição do infiltrado inflamatório.....	32
4.3. Reações imunoistoquímicas.....	32
4.4. Análise da imunomarcacão .....	33
4.5. Análise estatística .....	34
4.6. Aspectos éticos e legais .....	34
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>36</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
6.1. Parte I: Artigo científico .....	48
6.2. Parte II: Análise global do infiltrado inflamatório das glândulas salivares e fígado de pacientes com hepatite C crônica .....	55
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
8.1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	61



A hepatite C representa um grave problema de saúde pública no mundo e no Brasil, com altas taxas de mortalidade e morbidade. Estima-se que 2,5 a 10,0% da população brasileira seja portadora do vírus da hepatite C (HCV) (BRASIL, 2011). O fígado é o órgão-alvo do HCV e, dentre as alterações hepáticas por ele induzidas, está a presença de um infiltrado inflamatório em graus variados (LEFKOWITCH, 2007). Além das manifestações hepáticas, os pacientes infectados pelo HCV podem apresentar manifestações extra-hepáticas durante o curso da doença (CACOUB *et al.*, 1999; GALOSSI *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2012), dentre as quais, alterações de glândulas salivares, como as sialoadenites e síndrome Sjögren-*like* (HADDAD *et al.*, 1992; GROSSMANN *et al.*, 2009; VITALI, 2011; KO *et al.*, 2012.). O exame histológico de glândulas salivares de pacientes infectados por HCV comumente revela infiltrado linfocítico, podendo haver atrofia acinar e ductos glandulares preservados (HADDAD *et al.*, 1992; JACOBSON *et al.*, 2010; VITALI, 2011; KO *et al.*, 2012). Apesar do acometimento das glândulas salivares em pacientes HCV positivos ser muito relatado e discutido, a etiopatogênese dessas alterações ainda é pouco esclarecida. Não está claro se as alterações são causadas diretamente pelo HCV, através da destruição do tecido glandular pela replicação viral, ou, indiretamente, através de uma resposta imune induzida pelo vírus (ROY e BAGG, 1999; RAMOS-CASALS *et al.*, 2002; OHOKA *et al.*, 2003; CARROZZO, 2008a). Neste sentido, o estudo e o entendimento da resposta imune-inflamatória presente nas glândulas salivares necessita investigações, a fim de se compreender melhor os mecanismos associados a esta provável manifestação extra-hepática da hepatite C crônica e sua possível relação com a resposta imune-inflamatória presente no fígado infectado pelo HCV.



## 2.1 Hepatite C crônica e vírus da hepatite C

A hepatite C manifesta-se geralmente de maneira crônica, silenciosa e grave, com altas taxas de mortalidade e morbidade, representando um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo (BRASIL, 2008). Apesar de existir uma variação geográfica na prevalência de infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), estima-se que 3% da população mundial seja afetada, o que representa aproximadamente 180 milhões de pessoas infectadas (HOUGHTON, 2009; GHANY *et al.*, 2009). No Brasil, a prevalência estimada é de 2,5 a 10,0%, sendo que a infecção pelo HCV se tornou a maior responsável por cirrose e transplante hepático no mundo Ocidental (BRASIL, 2011).

O HCV é o agente etiológico da hepatite C e sua transmissão se dá pelo contato com sangue contaminado, como em transfusões sanguíneas, exposições percutâneas, uso de drogas injetáveis e/ou inaláveis e tratamento de hemodiálise (BRASIL, 2011). Existem também relatos de transmissão vertical e sexual, além de grande número de portadores (10 a 43%) cuja forma de contágio não é identificada (HERMIDA *et al.*, 2002; DE ARAÚJO *et al.*, 2007; BRASIL, 2011). Em 70 a 85% dos casos a doença se cronifica, geralmente de forma assintomática, sendo que um quarto a um terço evolui para formas histológicas graves ao longo de 20 anos (LAUER e WALKER, 2001; BRASIL, 2008).

O diagnóstico da hepatite C é feito pela identificação sorológica de anticorpos anti-HCV através do teste de ELISA, seguida por detecção do RNA viral no sangue (POYNARD *et al.*, 2003; BRASIL, 2011). Como não há vacina para a hepatite C, grande enfoque deve ser dado na prevenção da doença (DE ARAÚJO *et al.*, 2007; BRASIL, 2008).

O HCV foi identificado em 1989 por CHOO e colaboradores e trata-se de um vírus envelopado de RNA de fita única. Este material genético codifica uma poliproteína precursora, a qual é processada e origina proteínas estruturais (core, E1, E2) e não estruturais (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b) (MAJOR e FEINSTONE, 1997; LAUER e WALKER, 2001; DUBUISSON, 2007; HOUGHTON, 2009). Já foram identificados seis genótipos de HCV, com mais de cinquenta subtipos, e esta diversidade pode estar relacionada à variedade antigênica

e biológica observada nos pacientes, como a resposta ao tratamento (LAUER e WALKER, 2001; ALI e ZEIN, 2005; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; LE GUILLOU-GUILLEMETTE *et al.*, 2007; HOUGHTON, 2009).

Além da infecção principal nas células hepáticas, são relatados o sialotropismo e o linfotropismo do HCV (RAMOS-CASALS *et al.*, 2001; ALI e ZEIN, 2005; BLACKARD, *et al.*, 2006; GALOSSO *et al.*, 2007; GROSSMANN *et al.*, 2009). Estudos buscam identificar células não hepáticas nas quais a replicação viral poderia ocorrer, tais como células sanguíneas periféricas, pâncreas, tireoide, glândula adrenal, mucosa bucal e pele, entre outras (DE VITA *et al.*, 2000; LASKUS *et al.*, 2000; NAGAO *et al.*, 2000; BLACKARD, *et al.*, 2006).

## **2.2 Resposta imune-inflamatória à infecção pelo HCV**

### *2.2.1 Resposta imune inata*

A resposta imune inata é a mais precoce, constituindo a primeira linha de defesa do organismo. É composta por barreiras físicas, proteínas do sangue, citocinas e células como os neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células *natural killer* (NK) (ABBAS, *et al.*, 2011). Essas células têm funções de fagocitose de patógenos, lise de células infectadas, produção de citocinas e quimiocinas. Uma revisão recente aborda os aspectos moleculares relacionados à resposta imune inata e adaptativa frente à infecção pelo HCV (ROSEN, 2013). Um dos primeiros mecanismos desencadeados é a produção de interferon (IFN)  $\alpha$  e  $\beta$  pela célula infectada (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005). Estas citocinas podem atuar de maneira autócrina e parácrina, ativando mecanismos protetores da infecção de células adjacentes e induzindo genes efetores da resposta do hospedeiro à infecção. Além disso, os IFN estimulam a produção de substâncias de ação antiviral que inibem a síntese de proteínas ou que favorecem a degradação do genoma viral, por exemplo. Assim, é gerado um estado antiviral nas células infectadas e adjacentes, tornando-as resistentes à infecção e bloqueando a replicação viral (LLOYD *et al.*, 2007; IRSHAD *et al.*, 2008; SPENGLER *et al.*, 2013). No

entanto, o HCV parece ser resistente a estes efeitos, frequentemente progredindo para a infecção crônica (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005).

Os macrófagos estão envolvidos na defesa do hospedeiro, cicatrização de feridas e na regulação da resposta imune (MOSSER e EDWARDS, 2008). Os macrófagos encontrados no fígado podem ser residentes, também chamados de células de Kupffer, ou infiltrantes. Ambos são CD68<sup>+</sup>, porém os residentes tendem a apresentar formato estrelado ou alongado, enquanto os infiltrantes apresentam morfologia arredondada (McGUINNESS *et al.*, 2000). Foi demonstrado que a densidade de células CD68<sup>+</sup> é maior em fígados infectados cronicamente pelo HCV, quando comparado a fígados sem esta infecção (McGUINNESS *et al.*, 2000). Os macrófagos residentes do fígado infectado por HCV são capazes de endocitar antígenos virais, processá-los e apresentá-los a outras células imunes (SZABO e DOLGANIUC, 2006; PROTZER *et al.*, 2012). Além disso, os macrófagos ativados podem assumir um perfil citotóxico e destruir diretamente os hepatócitos infectados através da produção de ânions superóxido e radicais de oxigênio e nitrogênio, contribuindo para o dano tecidual (McGUINNESS *et al.*, 2000; SZABO e DOLGANIUC, 2006; MOSSER e EDWARDS, 2008). Outra função importante destas células na infecção pelo HCV é a produção de citocinas, destacando-se o fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e a interleucina (IL)-10, sendo esta última de função inibitória de LT e células NK (McGUINNESS *et al.*, 2000; HOSOMURA *et al.*, 2011; PROTZER *et al.*, 2012). Esta produção pode ser estimulada por proteínas virais ou por outras citocinas, como o IFN- $\gamma$  (McGUINNESS *et al.*, 2000; HOSOMURA *et al.*, 2011).

As células NK são as principais células efetoras da resposta imune inata, sendo capazes de reagir contra seus alvos sem necessidade de uma ligação prévia. As principais funções das células NK são a citotoxicidade direta e a produção de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (LUNEMANN *et al.*, 2012; SPENGLER *et al.*, 2013). O fígado sadio é particularmente rico em células NK, porém estas estão reduzidas em número na infecção pelo HCV (AHMAD e ALVAREZ, 2004; PROTZER *et al.*, 2012). Sabe-se que IFN- $\alpha$  endógeno é secretado pelos hepatócitos em fígados infectados por HCV, sendo este um potente ativador

de células NK (AHMAD e ALVAREZ, 2004; SPAAN *et al.*, 2012). No entanto, foi relatado que proteínas do HCV podem interferir na função destas células, as quais passam a apresentar menor ativação, menor produção de citocinas e menor capacidade de ativar células dendríticas (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; PROTZER *et al.*, 2012). A função efetora das células NK está relacionada à sua capacidade de eliminar hepatócitos infectados por HCV. Esta eliminação pode ocorrer diretamente, através de moléculas citotóxicas como granzima e perforina, e indiretamente, pela secreção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que levam à supressão da replicação viral, além da ativação de respostas imunes adaptativas subsequentes (AHMAD e ALVAREZ, 2004; IRSHAD *et al.*, 2008; BOZZANO *et al.*, 2012; MONDELLI *et al.*, 2012; SPAAN *et al.*, 2012). Assim, as células NK ativadas têm um papel importante na ativação de outras células NK, macrófagos e linfócitos B, além de participarem do recrutamento de linfócitos T vírus-específicos (TEIXEIRA, 2005; SZABO e DOLGANIUC, 2006; IRSHAD *et al.*, 2008). Além disso, estas citocinas participam na indução do estado antiviral nas células hepáticas adjacentes às infectadas, explicado anteriormente (IRSHAD *et al.*, 2008).

As células dendríticas representam importantes células apresentadoras de antígenos e tem papel importante na ligação entre as respostas inata e adaptativa, pois quando estimuladas por patógenos, são capazes de induzir a ativação de linfócitos T antígeno-específicos (RYAN e O'FARRELLY, 2011; LOSIKOFF *et al.*, 2012; SPAAN *et al.*, 2012). Após encontrar o patógeno, as células dendríticas são ativadas, ou seja, apresentam maior expressão do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e produção de quimiocinas e citocinas como o IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  e IL-12. Após a migração das células dendríticas ativadas para os linfonodos, ocorre uma interação com linfócitos T, levando à ativação dos mesmos (LOSIKOFF *et al.*, 2012; SPAAN *et al.*, 2012). As células dendríticas são numerosas em fígado de pacientes com hepatite C crônica. No entanto, há contradições se as funções das mesmas estariam intactas ou prejudicadas na infecção crônica pelo HCV (LOSIKOFF *et al.*, 2012; SPAAN *et al.*, 2012). Não obstante, sabe-se que, uma vez ligadas a proteínas do HCV, as células dendríticas são induzidas a maturar (IRSHAD *et al.*, 2008). Estas células, então,

passam a apresentar um aumento de expressão de moléculas de superfície, capacidade aumentada de estimular proliferação de linfócitos T e produção de IFN- $\gamma$  (IRSHAD *et al.*, 2008). Além disso, são capazes de influenciar a polarização da resposta dos linfócitos T auxiliares em Th1, pela secreção de IL-12, ou T regulatórias, pela secreção de IL-10 (SZABO e DOLGANIUC, 2006; RYAN e O'FARRELLY, 2011). Desta forma, a resposta precoce das células dendríticas à infecção pelo HCV é crítica na determinação do curso e desfecho - resolução ou cronificação - da doença (IRSHAD *et al.*, 2008). Como muitas proteínas HCV são capazes de inibir as funções de células dendríticas, as funções dos linfócitos T auxiliares e citotóxicos são conseqüentemente debilitadas em pacientes portadores crônicos do HCV, sendo este um dos mecanismos que o HCV usa para enfraquecer a resposta imune do hospedeiro contra o vírus (SZABO e DOLGANIUC, 2006; IRSHAD *et al.*, 2008).

### 2.2.2 Resposta imune adaptativa

A resposta imune adaptativa é mais tardia e especializada, sendo seus principais componentes efetores os linfócitos T (LT) e B (LB) (VOLTARELLI, 2009).

Os LT reconhecem antígenos apenas se estes forem previamente processados pelas células apresentadoras de antígenos e apresentados em associação às moléculas do MHC tipo I ou tipo II. Sinais positivos e negativos trocados entre as células apresentadoras de antígenos e LT são necessários para promover uma resposta eficiente contra antígenos exógenos, mas também para limitar esta ativação a fim de evitar um dano imune adicional ou autoimunidade (CIUFFREDA e KIM, 2011).

Os LT citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) reconhecem os fragmentos de antígenos associados ao MHC tipo I, que é expresso em todas as células nucleadas do organismo e plaquetas. Os LT CD8<sup>+</sup> são o principal grupo celular na vigilância contra infecções virais e participam na eliminação desses patógenos, uma vez que podem induzir a lise de células infectadas através de perforina, granzima e indução de apoptose via Fas-FasL (FOCACCIA, 2003; LLOYD *et al.*, 2007; SEMMO e KLENERMAN, 2007; IRSHAD *et al.*, 2008; PROTZER *et al.*, 2012; SPENGLER *et al.*, 2013). Os LT CD8<sup>+</sup> também apresentam atividade antiviral não citolítica,

através de secreção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha/\beta$  e TNF- $\alpha$ , tornando as células não infectadas resistentes à infecção e paralisando a replicação viral nas células infectadas (LLOYD *et al.*, 2007; IRSHAD *et al.*, 2008).

Na infecção aguda pelo HCV, a eliminação espontânea do vírus é associada a uma resposta de LT CD8<sup>+</sup> precoce, vigorosa e multiespecífica (LI e SCHWARZ, 2002; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; LLOYD *et al.*, 2007). No entanto, na maioria dos pacientes as respostas CD8<sup>+</sup> específicas são fracas, com poucas células reconhecendo poucos epítomos e, portanto, incapazes de eliminar o vírus completamente, resultando na infecção crônica pelo HCV (LI e SCHWARZ, 2002; SZABO e DOLGANIUC, 2006; REHERMANN, 2009).

Já os LT auxiliares (CD4<sup>+</sup>) são restritos ao reconhecimento via MHC tipo II, que é expresso por uma população restrita de células, como as células dendríticas, macrófagos ativadas e LB (LI e SCHWARZ, 2002; VOLTARELLI, 2009; CIUFFREDA e KIM, 2011). Uma vez estimulados, os LT CD4<sup>+</sup> podem apresentar padrões de resposta distintos, Th1 e Th2, entre outros, dependendo das citocinas que secretam (LI e SCHWARZ, 2002; VOLTARELLI, 2009; SWAIN *et al.*, 2012). No padrão de resposta Th1, as células secretam IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e em geral estimulam LT CD8<sup>+</sup>, macrófagos e células NK (LI e SCHWARZ, 2002; FOCACCIA, 2003; SZABO e DOLGANIUC, 2006; SWAIN *et al.*, 2012). Já na resposta Th2 são secretadas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, as quais estimulam os LB e, conseqüentemente, a produção de anticorpos (LI e SCHWARZ, 2002; FOCACCIA, 2003; SZABO e DOLGANIUC, 2006; SWAIN *et al.*, 2012). Vale ressaltar que as respostas Th1 e Th2 têm efeito inibitório entre si (LI e SCHWARZ, 2002).

Os LT CD4<sup>+</sup> são considerados críticos para as respostas celular e humoral contra o HCV (LLOYD *et al.*, 2007). Durante a infecção crônica pelo HCV, a resposta e proliferação de LT CD4<sup>+</sup> HCV-específicos são tipicamente descritas como fracas ou ausentes, com funções efetoras prejudicadas (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; SZABO e DOLGANIUC, 2006; SEMMO e KLENERMAN, 2007; REHERMANN, 2009). Além disso, o fígado de pacientes

HCV-positivos contém um alto índice de LT CD4<sup>+</sup> regulatórios, que são capazes de inibir a função de LT CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> e células NK (REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; PROTZER *et al.*, 2012). Também foi relatado que os LT CD4<sup>+</sup> estão em menor número que os LT CD8<sup>+</sup> no fígado infectado cronicamente (PROTZER *et al.*, 2012). Apesar dos LT CD4<sup>+</sup> não medirem diretamente a injúria aos hepatócitos na infecção pelo HCV, eles são cruciais na facilitação de outros mecanismos imunes antivirais, como o aumento nas funções efetoras de LT CD8<sup>+</sup> (SZABO e DOLGANIUC, 2006). Ainda não está claro como uma intensa resposta de LT CD4<sup>+</sup> leva ao *clearance* viral, porém é aceito que uma resposta precoce, intensa, multiespecífica e com perfil Th1 é associada a *clearance* viral e resolução da doença, ao passo que uma resposta estritamente focada, tardia e com perfil Th2 é associada à infecção crônica (LI e SCHWARZ, 2002; FOCACCIA, 2003; LLOYD *et al.*, 2007; SEMMO e KLENERMAN, 2007; IRSHAD *et al.*, 2008). Uma hipótese sobre a ocorrência da resposta Th2 na infecção crônica pelo HCV estaria na função deficitária das células dendríticas, possivelmente pela inibição da IL-12. Desta forma, haveria inibição da resposta Th1, favorecendo a resposta Th2 (SEMMO e KLENERMAN, 2007).

Existe evidência limitada para um papel significativo dos anticorpos anti-HCV no *clearance* viral e na proteção contra a reinfecção pelo HCV (LI e SCHWARZ, 2002; LLOYD *et al.*, 2007). Uma possível explicação é o fato de estes anticorpos parecerem ter como alvo a região hipervariável 1 da proteína E2 do HCV que, com mutações, leva ao surgimento de quasispecies que escapam da neutralização (LLOYD *et al.*, 2007; PROTZER *et al.*, 2012). Não obstante, os anticorpos anti-HCV podem estar envolvidos nos aspectos imunológicos das manifestações extra-hepáticas do HCV (LI e SCHWARZ, 2002).

A despeito da resposta imune inata e adaptativa desencadeada frente à infecção pelo HCV, a maioria dos pacientes contaminados evolui para cronificação da doença, sugerindo uma inabilidade da resposta antiviral em conter a infecção, seja por funções efetoras comprometidas, seja pela regulação da resposta, a fim de evitar dano tecidual exacerbado. Neste contexto, o próprio HCV também tem papel importante, pois apresenta mecanismos de evasão à resposta imunológica. Dentre as possíveis razões para esta falha, estão: o

surgimento de variantes virais de escape, como resultado da alta taxa de mutação do HCV; apresentação comprometida de antígeno pelas células dendríticas; capacidade do HCV de favorecer a resposta Th2 a despeito da Th1; diminuição da produção de citocinas antivirais; deleção, disfunção, inativação ou exaustão de células T; potencial citolítico comprometido dos LT CD8<sup>+</sup>; participação de células T regulatórias na supressão da resposta de LT CD8<sup>+</sup> e de células NK (LI e SCHWARZ, 2002; REHERMANN e NASCIMBENI, 2005; THIMME *et al.*, 2006; LLOYD *et al.*, 2007; IRSHAD *et al.*, 2008; REHERMANN, 2009; PROTZER *et al.*, 2012; SPENGLER *et al.*, 2013).

### **2.3 Alterações hepáticas na infecção pelo HCV**

A patogenicidade do HCV está relacionada ao dano ao hepatócito e à persistência viral. Frente à infecção persistente no fígado, é disparada continuamente uma resposta imune que induz a destruição do hepatócito. Assim, o sistema imune parece desempenhar um papel duplo: a limitação da replicação do HCV e estabelecimento da lesão tecidual, já que o HCV não é diretamente citopático (LI e SCHWARZ, 2002; FOCACCIA, 2003; BRASIL, 2011; ZAMPINO *et al.*, 2013).

As características histológicas desta infecção hepática crônica incluem a presença de inflamação, fibrose e alterações hepatocelulares (degeneração balonizante e apoptose). Uma característica típica da hepatite C é o infiltrado de uma coleção de linfócitos no tecido conjuntivo do espaço portal, onde folículos linfóides com centros germinativos também podem estar presentes, embora mais raramente (LEFKOWITCH, 2007).

Em um estudo imunoistoquímico realizado por FRENI e colaboradores (1995), foi demonstrado que o infiltrado hepático periportal de pacientes portadores de HCV era predominantemente de células T (78%), com razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de 0,3. As células CD20<sup>+</sup> representaram 18%, macrófagos 5%, células NK 3% e células dendríticas foliculares não foram encontradas. Uma composição semelhante foi observada no infiltrado intralobular. Já

nos folículos linfóides primários observados no fígado destes pacientes, as células T representavam 28 a 68% do infiltrado, sendo que as CD4<sup>+</sup> eram localizadas mais ao centro e CD8<sup>+</sup> na periferia do folículo. As células B representaram 36 a 73%; macrófagos e células NK eram escassos. Os autores destacam a alta prevalência dos folículos linfóides em fígado na hepatite C e que a composição celular dos mesmos é, de maneira geral, bem definida e constante, assemelhando-se aos folículos linfóides primários dos linfonodos. No entanto, a função destes folículos não é bem esclarecida.

FREEMAN e colaboradores (2001) também afirmam que existe uma predominância de LT CD8<sup>+</sup> sobre LT CD4<sup>+</sup> no infiltrado inflamatório hepático característico da hepatite C crônica. Estes autores relataram que os LT CD4<sup>+</sup> são confinados às áreas portais e periportais, enquanto os LT CD8<sup>+</sup> são vistos também no infiltrado lobular, sugerindo que estas células podem contribuir para o dano hepatocelular.

Entretanto, VISO e colaboradores (2007) demonstraram predomínio de células CD4<sup>+</sup> sobre CD8<sup>+</sup> em amostras hepáticas de pacientes portadores de HCV. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores (VISO *et al.*, 2010) comparou a imunopropriedade de CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, S100<sup>+</sup>, CD57<sup>+</sup> e CD45RO<sup>+</sup> em amostras de fígado HCV positivas e negativas. Nos casos HCV positivos, houve maior número de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e menor de S100<sup>+</sup>, além de predomínio de células CD4<sup>+</sup> sobre CD8<sup>+</sup>.

WALEWSKA-ZIELECKA e colaboradores (2008) caracterizaram o imunofenótipo das células inflamatórias presentes em fígado de pacientes com hepatite B e C, as quais apresentaram a mesma composição fenotípica. Entretanto, na hepatite C a formação de folículos linfóides com centros germinativos foi mais comum. Os autores relatam que linfócitos de fenótipo indutor de auxiliar (CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>) constituíram a maior porcentagem de células (50%-60%). Já os LT CD8<sup>+</sup> perfizeram 20-25% das células. Os LB CD20<sup>+</sup> representaram 5%-10% do infiltrado. Macrófagos CD68<sup>+</sup> foram encontrados em folículos linfóides e centros germinativos. Células NK CD56<sup>+</sup> perfizeram apenas 1%-2% do infiltrado. A razão CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi maior que 1,5. Os autores relatam ainda que não houve associação entre o grau de inflamação e a expressão de antígenos de HCV, detectados em material congelado por

imunofluorescência. Entretanto, a presença de antígenos HCV era frequentemente acompanhada por infiltrado inflamatório.

NGUYEN e colaboradores (2013) demonstraram que o número de leucócitos identificados foi menor nos lóbulos que nos espaços-porta. Em relação aos subtipos leucocitários identificados, no espaço porta houve predomínio de LT CD4<sup>+</sup>, com presença de CD8<sup>+</sup>. As células CD20<sup>+</sup> foram encontradas comumente em agregados linfoides e as CD68<sup>+</sup> estavam dispersas uniformemente. Já nos lóbulos, houve predomínio de CD8<sup>+</sup>, com poucas CD4<sup>+</sup>, ausência de CD20<sup>+</sup> e numerosas células CD68<sup>+</sup>.

## **2.4 Afecções das glândulas salivares na hepatite C crônica**

Aproximadamente 40-75% dos pacientes infectados pelo HCV apresentam uma manifestação extra-hepática durante o curso da doença (CACOUB *et al.*, 1999; PALEKAR e HARRISON, 2005; BLACKARD *et al.*, 2006; GALOSSO *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2012), sendo que a maioria delas parece ser mediada imunologicamente, representando efeito secundário da resposta imune do hospedeiro e não efeito citopático viral direto (ROY e BAGG, 1999; BONKOVSKY e MEHTA, 2001; LAUER e WALKER, 2001; RAMOS-CASALS *et al.*, 2002; OHOKA *et al.*, 2003; CARROZZO, 2008a; KO *et al.*, 2012; ZAMPINO *et al.*, 2013). Além disso, uma possível participação do linfotropismo atribuído ao HCV na patogênese das manifestações extra-hepáticas também é discutido (BLACKARD *et al.*, 2006).

Dentre as manifestações extra-hepáticas, encontram-se doenças hematológicas, linfoides, endócrinas, dermatológicas, renais, neuromusculares, articulares, autoimunes, além de alterações em glândulas salivares e lacrimais (CARROZZO e GANDOLFO, 2003; PALEKAR e HARRISON, 2005; GALOSSO *et al.*, 2007; KO *et al.*, 2012). Destacam-se a crioglobulinemia mista, vasculite crioglobulinêmica, porfiria cutânea tardia, líquen plano, glomerulonefrite membranoproliferativa, síndrome de Sjögren, sialoadenite, diabetes mellitus, linfomas, neuropatia periférica, entre outras (MAYO, 2003; MEDINA *et al.*, 2004; ALI e ZEIN,

2005; GROSSMANN *et al.*, 2007; GALOSSI *et al.*, 2007; CARROZZO, 2008b; JACOBSON *et al.*, 2010).

Dentre as alterações relacionadas às glândulas salivares, podem ser citadas a hipossalivação, xerostomia e sialoadenite (HADDAD *et al.*, 1992; GROSSMANN *et al.*, 2010 a; GROSSMANN *et al.*, 2010 b; VITALI, 2011).

GROSSMANN e colaboradores (2010) relataram uma incidência de hipossalivação de 19,1% e xerostomia de 35,3% em pacientes com hepatite C crônica. Estes autores também observaram que o HCV-RNA foi detectado mais frequentemente na saliva (39,0%) que em amostras de glândulas salivares (18,5%). No entanto, a detecção do HCV-RNA na saliva e em glândulas salivares não apresentou correlação com fluxo salivar e xerostomia. De forma similar, FERREIRO e colaboradores (2002) mostraram que o fluxo salivar total não está relacionado à presença do vírus na saliva.

As investigações sobre a presença do HCV-RNA em saliva de pacientes portadores de HCV apresentam resultados que variam de 0 à 100% (JORGENSEN *et al.*, 1996; TALIANI *et al.*, 1997; HERMIDA *et al.*, 2002; GONÇALVES *et al.*, 2005; SHAFIQUE *et al.*, 2009; GROSSMANN *et al.*, 2010). Esta grande variabilidade de resultados pode estar associada a diferenças metodológicas empregadas. Estudos da presença de HCV na glândula salivar também revelam resultados conflitantes. Utilizando imunistoquímica, DE VITA e colaboradores (1995) e ARRIETA e colaboradores (2001) identificaram o HCV neste tecido, enquanto VERBAAN e colaboradores (1999) obtiveram resultados negativos e OHOKA e colaboradores (2003) resultados falso positivos. Além disso, estudos acerca da identificação de HCV-RNA em glândulas salivares através de hibridização *in situ* e PCR também demonstram resultados controversos (TAKAMATSU *et al.*, 1992; BIASI *et al.*, 1995; TALIANI *et al.*, 1997; ARRIETA *et al.*, 2001; OHOKA *et al.*, 2003; GROSSMANN *et al.*, 2010).

Alguns estudos investigaram a presença de anticorpos anti-HCV em saliva e a maioria relata resultados de sensibilidade entre 71 e 100% e especificidade entre 86 a 100% (revisão em CALDEIRA *et al.*, 2013). No entanto, resultados inferiores de sensibilidade (12,8%-46,3%) também foram relatados (AÇIKGÖZ *et al.*, 2009; SHAFIQUE *et al.*, 2009; CALDEIRA *et al.*,

2013). Foi demonstrada ausência de correlação entre a detecção de anticorpos anti-HCV em saliva e a presença do HCV-RNA em saliva e em glândulas salivares de pacientes com hepatite C crônica (CALDEIRA *et al.*, 2013).

A sialoadenite encontrada em pacientes HCV-positivos comumente se apresenta histologicamente semelhante à síndrome de Sjögren. O exame histopatológico de glândulas salivares menores labiais de pacientes com síndrome de Sjögren caracteriza-se pela presença de sialoadenite linfocítica focal, com mais de um foco (50 ou mais células) por 4mm<sup>2</sup> de tecido glandular. Além deste achado, a identificação de outras características é necessária para o diagnóstico da síndrome de Sjögren e a infecção pelo HCV é considerada um critério de exclusão para este diagnóstico (VITALI *et al.*, 2002). Portanto, a sialoadenite presente em pacientes portadores do HCV é chamada de sialoadenite associada ao HCV ou síndrome Sjögren-*like* (SCOTT *et al.*, 1997; ROY e BAGG, 1999).

A ocorrência de síndrome de Sjögren-*like* nos pacientes portadores crônicos do HCV varia de 4 a 57% (KO *et al.*, 2012). KOIKE e colaboradores (1997) relatam que animais transgênicos que expressavam genes do envelope de HCV desenvolviam sialoadenite. O mecanismo pelo qual a infecção pelo HCV leva à síndrome Sjögren-*like* não é esclarecido, porém acredita-se ser um efeito da resposta imune do hospedeiro, mais que um efeito direto do vírus (KO *et al.*, 2012).

Poucas investigações buscaram elucidar os componentes inflamatórios encontrados em glândulas salivares de pacientes HCV positivos (VITALI, 2011). SCOTT e colaboradores (1997) demonstraram que este infiltrado inflamatório é predominantemente de LT, com poucos LB. COLL e colaboradores (1997) estudaram três amostras de glândulas salivares menores e relataram que, no infiltrado difuso, encontrou-se predominância de linfócitos CD3<sup>+</sup> e uma proporção de 2:1 entre linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Já no infiltrado focal houve predominância de linfócitos CD20<sup>+</sup>.

Apesar do acometimento das glândulas salivares em pacientes HCV positivos ser muito relatado e discutido, a etiopatogênese dessas alterações ainda é pouco conhecida. Neste sentido, o estudo e o entendimento da resposta imune-inflamatória presente nas

glândulas salivares necessita de mais investigações, a fim de se compreender melhor os mecanismos associados a esta possível manifestação extra-hepática da hepatite C crônica, assim como uma possível associação com a resposta inflamatória hepática observada nestes pacientes.



### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar comparativamente o infiltrado inflamatório presente em glândulas salivares menores e fígado de pacientes com hepatite C crônica.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Caracterizar o padrão de distribuição e o imunofenótipo do infiltrado inflamatório presente nas glândulas salivares menores de pacientes com hepatite C crônica, comparando com amostras de fígado.
2. Avaliar a possível associação entre o imunofenótipo do infiltrado inflamatório glandular e a carga viral, grau de inflamação hepática, genótipo e presença de HCV-RNA em glândula salivar.



#### 4.1 Amostras

As amostras de glândulas salivares foram resgatadas de material previamente coletado e arquivado (GROSSMANN *et al.*, 2010). À época da coleta, glândulas salivares menores foram obtidas através de biópsia em lábio inferior clinicamente sem alterações, fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina. Os pacientes foram voluntários do ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos apresentavam diagnóstico comprovado de hepatite C crônica (anti-HCV sorológico positivo, Elisa III, teste qualitativo para HCV-RNA positivo, Amplicor Roche®), além de não terem recebido nenhum tratamento prévio para a doença. Os pacientes não apresentavam nenhuma outra doença hepática nem coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana. Também não apresentavam sintomas sugestivos de Síndrome de Sjögren. Para o presente estudo, foram utilizados 61 casos que apresentavam material suficiente para as análises propostas. Os dados clínicos coletados também foram arquivados em banco de dados (GROSSMANN *et al.*, 2010b).

Os arquivos do Laboratório de Patologia Hepática do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG foram revisados para amostras de fígado de pacientes com hepatite C crônica. Estas amostras foram obtidas por biópsia por agulha, fixadas em formol e incluídas em bloco de parafina. Cinquenta e nove casos foram incluídos no estudo e apresentavam grau A2 segundo o sistema METAVIR de graduação. De acordo com este sistema, a atividade necroinflamatória é graduada em quatro parâmetros: A0 = nenhuma; A1 = leve; A2 = moderada; A3 = severa (BEDOSSA e POYNARD, 1996). As amostras de fígado não pertenciam aos mesmos pacientes dos quais foram obtidas glândulas salivares.

A partir dos blocos de parafina de glândula salivar e de fígado, foi confeccionado um corte histológico de cada caso com 4 µm de espessura, corado com hematoxilina e eosina. Neste material foi realizada a análise do padrão de distribuição do infiltrado inflamatório (item 4.2). Além disso, foram feitos 7 cortes com espessura de 3 µm, acomodados em lâminas com

carga, utilizados para as reações imunoistoquímicas descritas no item 4.3.

#### **4.2 Análise do padrão de distribuição do infiltrado inflamatório**

Esta análise foi feita nas amostras teciduais de glândula salivar e fígado. Todos os campos da lâmina corada em hematoxilina e eosina foram avaliados em um microscópio ótico (Carl Zeiss – Axiostar 1122-100). O infiltrado inflamatório foi classificado de acordo com seu padrão de distribuição no tecido em focal, quando as células inflamatórias formaram agregados de 50 ou mais células inflamatórias, ou difuso, quando um padrão focal de distribuição não pôde ser observado (VITALI, 2011).

#### **4.3 Reações imunoistoquímicas**

Foram realizadas reações imunoistoquímicas para os marcadores CD3 (linfócitos T); CD20 (linfócitos B); CD4 (linfócito T *helper*); CD8 (linfócito T citotóxico); S-100 (células dendríticas); CD68 (macrófagos) e CD57 (células *natural killer*), seguindo o protocolo a seguir.

1. Desparafinização dos cortes histológicos em xilol seguidos por hidratação em banhos decrescentes de etanol (exceto para CD4, ver quadro 1).
2. Recuperação antigênica, conforme descrito no quadro 1.
3. Bloqueio da atividade de ligação à biotina endógena, segundo o protocolo e MILLER e colaboradores (1999).
4. Bloqueio da peroxidase endógena, solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes.
5. Incubação com anticorpo primário, conforme especificações descritas no quadro 1, por 60 minutos, à temperatura ambiente.
6. Incubação com sistema de detecção, conforme descrito no quadro 1. Para os casos de fígado, para todos os anticorpos foi utilizado o sistema Advance (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K4068).
7. Revelação da reação utilizando-se solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina - DAB (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K3468).
8. Contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

9. Desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes; diafanização em xilol e montagem com lâminulas de vidro e Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA, código SP15-500).

**Quadro 1 – Especificações das reações imunoistoquímicas.**

<i>Anticorpo primário</i>	<i>Clone / fabricante</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Diluição</i>	<i>Sistema de detecção</i>
Anti-CD3	F7.2.38, Dako Cytomation, Dinamarca, código M7254	TRIS-EDTA, pH 9.0, <i>steamer</i> 96°C, 30 minutos	1:200	Advance
Anti-CD20cy	L26, Dako Cytomation, Dinamarca, código M0755	Ácido cítrico, pH 6.0, banho maria 96°C, 30 minutos	1:200	LSAB <sup>1</sup>
Anti-CD4	4B12, Dako Cytomation, Dinamarca, código M7310	Trilogy <sup>2</sup> , panela de pressão	1:100	Advance
Anti-CD8	C8/144B, Dako Cytomation, Dinamarca, código M7103	TRIS-EDTA, pH 9.0, banho maria 96°C, 30 minutos	1:500	LSAB
Anti-S100	Policlonal, Dako Cytomation, Dinamarca, código Z0311	Sem tratamento	1:500	LSAB
Anti-CD68	KP1, Diagnostic BioSystems, EUA, código Mob167	Ácido cítrico, pH 6.0, banho maria 96°C, 30 minutos	1:1500	Advance
Anti-CD57	TB01, Dako Cytomation, Dinamarca, código M7271	TRIS-EDTA, pH 9.0, banho maria 96°C, 30 minutos	1:100	LSAB

<sup>1</sup> Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, código K0690

<sup>2</sup> Cell Marque, Rocklin, CA, EUA, código 920P-07

#### 4.4 Análise da imunomarcção

A análise da imunomarcção foi realizada por dois observadores calibrados (coeficiente de correlação intraclassa = 0,862), utilizando-se microscópio óptico, em aumento de 400 vezes, com retículo de contagem acoplado (Carl Zeiss – Axiostar 1122-100). Foram consideradas imunopositivas as células que apresentaram coloração marrom, independente da intensidade da marcação. Para a avaliação de S100, apenas células com morfologia dendrítica foram consideradas.

Nos casos onde o infiltrado organizava-se em focos, em cada foco eram contadas 50 células, entre positivas e negativas. Foram avaliados seis focos, totalizando 300 células. Para

os casos com infiltrado inflamatório difuso, foram contadas 50 células em cada campo de maior aumento (400x), entre positivas e negativas. Seis campos foram avaliados, totalizando 300 células. Naqueles casos onde toda a extensão do tecido não permitia totalizar a contagem de seis focos / campos, todos os focos / campos presentes foram avaliados. Os resultados foram expressos em porcentagem de células positivas.

Posteriormente, foram obtidas as médias de marcação de cada proteína (CD3, CD20, CD4, CD8, CD57, CD68, S100) em cada grupo estudado (glândula total, fígado total, glândula foco, glândula difuso, fígado foco, fígado difuso). O valor da média foi então convertido, de acordo com um sistema de gradação semi-quantitativa (adaptado de COLL *et al.*, 1997) (quadro 2).

**Quadro 2: Gradação semi-quantitativa para conversão das médias de marcação.**

<i>Média de marcação (%)</i>	<i>Gradação</i>
0 a 10,0	+
10,1 a 25,0	++
25,1 a 50,0	+++
50,1 a 75,0	++++
75,1 a 100,0	+++++

#### **4.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas Minitab® (Minitab Inc., State College, PA, EUA) e SPSS® para Windows, versão 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Foram realizados testes de normalidade e, posteriormente, foram empregados testes não-paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) e paramétricos (ANOVA e “t” de Student). Valores de p abaixo de 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

#### **4.6 Aspectos éticos e legais**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ETIC 192/06), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas

Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (vide anexos).

**5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

1. Abbas, Abul K; Lichtman, Andrew H; Pillai, Shiv. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Tradução da 7ª edição.
2. Açıkğöz G, Cengiz MI, Keskiner I, Açıkğöz S, Can M, Açıkğöz A. Correlation of hepatitis C antibody levels in gingival crevicular fluid and saliva of hepatitis C seropositive hemodialysis patients. *Int J Dent*. 2009;2009:247121.
3. Ahmad A, Alvarez F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J Leukoc Biol*. 2004 Oct;76(4):743-59.
4. Ali A, Zein NN. Hepatitis C infection: a systemic disease with extrahepatic manifestations. *Cleve Clin J Med*. 2005 Nov;72(11):1005-8, 1010-4, 1016 passim.
5. Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, Oliva H, Macías DM, Carreño V. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol*. 2001 Jan;158(1):259-64.
6. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*. 1996 Aug;24(2):289-93.
7. Biasi D, Colombari R, Achille A, Carletto A, Caramashi P, Corrocher R, Bambara LM. HCV RNA detection in parotid gland biopsy in a patient with chronic hepatitis C virus liver disease. *Acta Gastroenterol Belg*. 1995 Sep-Dec;58(5-6):465-9.
8. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology*. 2006 Jul;44(1):15-22.
9. Bonkovsky HL, Mehta S. Hepatitis C: a review and update. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Feb;44(2):159-82.
10. Bozzano F, Marras F, Biassoni R, De Maria A. Natural killer cells in hepatitis C virus infection. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012 Nov;8(8):775-88.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Hepatites virais: o Brasil está atento* / Ministério da Saúde,

- Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 3. ed. - Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite viral C e coinfeções. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
  13. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlotte F, Olivi M, Piette JC, Opolon P. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group. Multidepartment Virus C. *Arthritis Rheum.* 1999 Oct;42(10):2204-12.
  14. Caldeira PC, Oliveira E Silva KR, Silva TA, de Mattos Camargo Grossmann S, Teixeira R, Carmo MA. Correlation between salivary anti-HCV antibodies and HCV RNA in saliva and salivary glands of patients with chronic hepatitis C. *J Oral Pathol Med.* 2013 Mar;42(3):222-8.
  15. Carrozzo M, Gandolfo S. Oral diseases possibly associated with hepatitis C virus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(2):115-27.
  16. Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Dis.* 2008a Mar;14(2):123-30.
  17. Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis.* 2008b Apr;14(3):217-28.
  18. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
  19. Ciuffreda D, Kim AY. Update on hepatitis C virus-specific immunity. *Curr Opin HIV AIDS.* 2011 Nov;6(6):559-65.
  20. Coll J, Gambús G, Corominas J, Tomás S, Esteban JI, Guardia J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis.* 1997 Jun;56(6):390-2.
  21. de Araújo ES, Mendonça JS, Barone AA, Gonçalves FL Jr, Ferreira MS, Focaccia R,

- Pawlotsky JM. Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the management and treatment of hepatitis C. *Braz J Infect Dis.* 2007 Oct;11(5):446-50.
22. De Vita S, De Re V, Sansonno D, Sorrentino D, Corte RL, Pivetta B, Gasparotto D, Racanelli V, Marzotto A, Labombarda A, Gloghini A, Ferraccioli G, Monteverde A, Carbone A, Dammacco F, Boiocchi M. Gastric mucosa as an additional extrahepatic localization of hepatitis C virus: viral detection in gastric low-grade lymphoma associated with autoimmune disease and in chronic gastritis. *Hepatology.* 2000 Jan;31(1):182-9.
23. De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R, Ferraccioli G, Carbone A, Cornacchiulo V, Santini G, Crovatto M, Gloghini A, Dammacco F, Boiocchi M. Hepatitis C virus within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood.* 1995 Sep 1;86(5):1887-92.
24. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 2007 May 7;13(17):2406-15.
25. Ferreiro MC, Prieto MH, Rodríguez SB, Vázquez RL, Iglesias AC, Dios PD. Whole stimulated salivary flow in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Oral Pathol Med.* 2002 Feb;31(2):117-20.
26. Focaccia, Roberto. *Tratado de hepatites virais.* São Paulo: Atheneu, 2003.
27. Freeman AJ, Marinos G, French RA, Lloyd AR. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2001 Dec;79(6):515-36.
28. Freni MA, Artuso D, Gerken G, Spanti C, Marafioti T, Alessi N, Spadaro A, Ajello A, Ferrà O. Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C: occurrence, immunohistochemical characterization, and relation to markers of autoimmunity. *Hepatology.* 1995 Aug;22(2):389-94.
29. Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C. Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointest Liver Dis.* 2007 Mar;16(1):65-73.
30. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an

- update. *Hepatology* 2009; 49:1335-74.
31. Gonçalves PL, Cunha CB, Busek SC, Oliveira GC, Ribeiro-Rodrigues R, Pereira FE. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. *Braz J Infect Dis.* 2005 Feb;9(1):28-34.
  32. Grossmann S de M, Teixeira R, de Aguiar MC, de Moura MD, do Carmo MA. Oral mucosal conditions in chronic hepatitis C Brazilian patients: a cross-sectional study. *J Public Health Dent.* 2009 Summer;69(3):168-75.
  33. Grossmann Sde M, Teixeira R, Oliveira GC, Gleber-Netto FO, Araújo FM, Araújo FM, Carmo MA. Xerostomia, hyposalivation and sialadenitis in patients with chronic hepatitis C are not associated with the detection of HCV RNA in saliva or salivary glands. *J Clin Pathol.* 2010 (a) Nov;63(11):1002-7.
  34. Grossmann SMC, de Aguiar MC, Teixeira R, do Carmo MA. Oral lichen planus and chronic hepatitis C: a controversial association. *Am J Clin Pathol.* 2007 May;127(5):800-4.
  35. Grossmann SMC, Teixeira R, de Oliveira GC, do Carmo MA. Detection of HCV RNA in saliva does not correlate with salivary flow or xerostomia in patients with chronic hepatitis C. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 (b) Jun;109(6):851-6.
  36. Grossmann, SM. Universidade Federal de Minas Gerais. Alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica. 2010. Tese (Doutorado em Odontologia).
  37. Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, Mal F, Callard P, Beaugrand M. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet.* 1992 Feb 8;339(8789):321-3.
  38. Hermida M, Ferreira MC, Barral S, Laredo R, Castro A, Diz Dios P. Detection of HCV RNA in saliva of patients with hepatitis C virus infection by using a highly sensitive test. *J Virol Methods.* 2002 Mar;101(1-2):29-35.
  39. Hosomura N, Kono H, Tsuchiya M, Ishii K, Ogiku M, Matsuda M, Fujii H. HCV-related

- proteins activate Kupffer cells isolated from human liver tissues. *Dig Dis Sci.* 2011 Apr;56(4):1057-64.
40. Houghton M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *J Hepatol.* 2009 Nov;51(5):939-48.
41. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol.* 2008;27(6):497-517.
42. Jacobson IM, Cacoub P, Dal Maso L, Harrison SA, Younossi ZM. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010 Dec;8(12):1017-29.
43. Jorgensen C, Legouffe MC, Perney P, Coste J, Tissot B, Segarra C, Bologna C, Bourrat L, Combe B, Blanc F, Sany J. Sicca syndrome associated with hepatitis C virus infection. *Arthritis Rheum.* 1996 Jul;39(7):1166-71.
44. Ko HM, Hernandez-Prera JC, Zhu H, Dikman SH, Sidhu HK, Ward SC, Thung SN. Morphologic features of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:740138.
45. Koike K, Moriya K, Ishibashi K, Yotsuyanagi H, Shintani Y, Fujie H, Kurokawa K, Matsuura Y, Miyamura T. Sialadenitis histologically resembling Sjogren syndrome in mice transgenic for hepatitis C virus envelope genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jan 7;94(1):233-6.
46. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Nowicki M, Rakela J. Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J Virol.* 2000 Jan;74(2):1014-7.
47. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001 Jul 5;345(1):41-52
48. Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F. Genetic diversity of the hepatitis C virus: impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol.* 2007 May 7;13(17):2416-26.

49. Lefkowitch JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res.* 2007 Aug;38(6):634-43.
50. Li DY, Schwarz KB. Immunopathogenesis of chronic hepatitis C virus infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002 Sep;35(3):260-7.
51. Lloyd AR, Jagger E, Post JJ, Crooks LA, Rawlinson WD, Hahn YS, French RA. Host and viral factors in the immunopathogenesis of primary hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol.* 2007 Jan;85(1):24-32.
52. Losikoff PT, Self AA, Gregory SH. Dendritic cells, regulatory T cells and the pathogenesis of chronic hepatitis C. *Virulence.* 2012 Oct 17;3(7). [Epub ahead of print]
53. Lunemann S, Schlaphoff V, Cornberg M, Wedemeyer H. NK cells in hepatitis C: role in disease susceptibility and therapy. *Dig Dis.* 2012;30 Suppl 1:48-54.
54. Major ME, Feinstone SM. The molecular virology of hepatitis C. *Hepatology.* 1997 Jun;25(6):1527-38.
55. Mayo MJ. Extrahepatic manifestations of hepatitis C infection. *Am J Med Sci.* 2003 Mar;325(3):135-48.
56. McGuinness PH, Painter D, Davies S, McCaughan GW. Increases in intrahepatic CD68 positive cells, MAC387 positive cells, and proinflammatory cytokines (particularly interleukin 18) in chronic hepatitis C infection. *Gut.* 2000 Feb;46(2):260-9.
57. Medina J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Hepatitis C virus-related extra-hepatic disease--aetiopathogenesis and management. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004 Jul 15;20(2):129-41.
58. Miller RT, Kubier PH, Reynolds, BH, Henry, TB, Turnbow HB. Blocking of Endogenous Avidin-Binding Activity in Immunohistochemistry: The Use of Skim Milk as an Economical and Effective Substitute for Commercial Biotin Solutions. *Appl Imm Mol Morphol.* 1999; 7(1):63-65.
59. Mondelli MU, Oliviero B, Mele D, Mantovani S, Gazzabin C, Varchetta S. Natural killer cell functional dichotomy: a feature of chronic viral hepatitis? *Front Immunol.* 2012;3:351.

60. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69.
61. Nagao Y, Sata M, Noguchi S, Seno'o T, Kinoshita M, Kameyama T, Ueno T. Detection of hepatitis C virus RNA in oral lichen planus and oral cancer tissues. *J Oral Pathol Med.* 2000 Jul;29(6):259-66.
62. Nguyen N, de Esch C, Cameron B, Kumar RK, Zekry A, Lloyd AR. Positioning of leukocyte subsets in the portal and lobular compartments of HCV-infected liver correlates with local chemokine expression. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Nov 15. doi: 10.1111/jgh.12462. [Epub ahead of print]
63. Ohoka S, Tanaka Y, Amako Y, Kohara M, Ishidate K, Watanabe M, Takahashi Y, Sato C. Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. *Hepatol Res.* 2003 Sep;27(1):23-29.
64. Palekar NA, Harrison SA. Extrahepatic manifestations of hepatitis C. *South Med J.* 2005 Oct;98(10):1019-23.
65. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. *Lancet.* 2003 Dec 20;362(9401):2095-100.
66. Protzer U, Maini MK, Knolle PA. Living in the liver: hepatic infections. *Nat Rev Immunol.* 2012 Feb 24;12(3):201-13.
67. Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Brito Zerón MP, Cervera R, Font J. Viral etiopathogenesis of Sjögren's syndrome: role of the hepatitis C virus. *Autoimmun Rev.* 2002 Aug;1(4):238-43.
68. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Cervera R, Font J. Is hepatitis C virus a sialotropic virus? *Am J Pathol.* 2001 Oct;159(4):1593-4.
69. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar;5(3):215-29.
70. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest.* 2009 Jul;119(7):1745-54.
71. Rosen HR. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *J Clin Invest.*

- 2013 Oct 1;123(10):4121-30.
72. Roy K, Bagg J. Hepatitis C virus and oral disease: a critical review. *Oral Dis.* 1999 Oct;5(4):270-7.
73. Ryan EJ, O'Farrelly C. The affect of chronic hepatitis C infection on dendritic cell function: a summary of the experimental evidence. *J Viral Hepat.* 2011 Sep;18(9):601-7.
74. Scott CA, Avellini C, Desinan L, Pirisi M, Ferraccioli GF, Bardus P, Fabris C, Casatta L, Bartoli E, Beltrami CA. Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjögren's syndrome. *Histopathology.* 1997 Jan;30(1):41-8.
75. Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007 Sep 28;13(36):4831-8.
76. Shafique M, Ahmad N, Awan FR, Mustafa T, Ullah M, Qureshi JA. Investigating the concurrent presence of HCV in serum, oral fluid and urine samples from chronic HCV patients in Faisalabad, Pakistan. *Arch Virol.* 2009;154(9):1523-7.
77. Spaan M, Janssen HL, Boonstra A. Immunology of hepatitis C virus infections. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2012 Aug;26(4):391-400.
78. Spengler U, Nischalke HD, Nattermann J, Strassburg CP. Between Scylla and Charybdis: the role of the human immune system in the pathogenesis of hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2013 Nov 28;19(44):7852-66.
79. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4<sup>+</sup> T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2012 Jan 20;12(2):136-48.
80. Szabo G, Dolganiuc A. HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. *Clin Liver Dis.* 2006 Nov;10(4):753-71.
81. Takamatsu K, Okayasu I, Koyanagi Y, Yamamoto N. Hepatitis C virus propagates in salivary glands. *J Infect Dis.* 1992, 165: 973–974.
82. Taliani G, Celestino D, Badolato MC, Pennica A, Bozza A, Poliandri G, Riccieri V, Benfari G, Sebastiani A, De Bac C, Quaranta G, Aceti A. Hepatitis C virus infection of salivary gland epithelial cells. Lack of evidence. *J Hepatol.* 1997 Jun;26(6):1200-6.

83. Teixeira, Rosângela. Hepatite C: aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Belo Horizonte: Coopmed, 2005.
84. Thimme R, Lohmann V, Weber F. A target on the move: innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2006 Mar;69(3):129-41.
85. Verbaan H, Carlson J, Eriksson S, Larsson A, Liedholm R, Manthorpe R, Tabery H, Widell A, Lindgren S. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C infection and the interrelationship between primary Sjögren's syndrome and hepatitis C in Swedish patients. *J Intern Med.* 1999 Feb;245(2):127-32.
86. Viso AT, de Castro Barbosa T, Yamamoto L, Pagliari C, Fernandes ER, Brasil RA, Andrade Jr HF Jr, Duarte MI, Barone AA. Portal CD4+ and CD8+ T lymphocyte correlate to intensity of interface hepatitis in chronic hepatitis C. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007 Nov-Dec;49(6):371-8.
87. Viso AT, Duarte MI, Pagliari C, Fernandes ER, Brasil RA, Benard G, Romano CC, Ogusuku S, Cavaleiro NP, Melo CE, Barone AA. Tissue and serum immune response in chronic hepatitis C with mild histological lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Feb;105(1):25-32.
88. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH; European Study Group on Classification Criteria for Sjögren's Syndrome. Classification criteria for Sjögren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis.* 2002 Jun;61(6):554-8.
89. Vitali C. Immunopathologic differences of Sjögren's syndrome versus sicca syndrome in HCV and HIV infection. *Arthritis Res Ther.* 2011 Aug 19;13(4):233.
90. Voltarelli, Júlio C. *Imunologia clínica na prática médica.* São Paulo: Atheneu, 2009.
91. Walewska-Zielecka B, Madalinski K, Jablonska J, Godzik P, Cielecka-Kuszyk J, Litwinska B. Composition of inflammatory infiltrate and its correlation with HBV/HCV antigen expression. *World J Gastroenterol.* 2008 Jul 7;14(25):4040-6.
92. Zampino R, Marrone A, Restivo L, Guerrera B, Sellitto A, Rinaldi L, Romano C, Adinolfi

LE. Chronic HCV infection and inflammation: Clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J Hepatol.* 2013 Oct 27;5(10):528-540.

**6 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---

## 6.1 Parte I: Artigo científico



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/humimm](http://www.elsevier.com/locate/humimm)

## Inflammatory cells in minor salivary glands of patients with chronic hepatitis C: Immunophenotype, pattern of distribution, and comparison with liver samples

Patrícia Carlos Caldeira<sup>a,\*</sup>, Karla Rachel Oliveira e Silva<sup>a</sup>, Paula Vieira Teixeira Vidigal<sup>b</sup>, Soraya de Mattos Camargo Grossmann<sup>a</sup>, Maria Auxiliadora Vieira do Carmo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, CEP 30.130-100 Belo Horizonte, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 29 October 2013

Accepted 4 February 2014

Available online xxx

### ABSTRACT

**Objectives:** To characterize the immunophenotype and the distribution of the inflammatory infiltrate (INF) in salivary glands (SG) of patients with chronic hepatitis C, comparing with laboratorial data (genotype, viral load, METAVIR, and HCV RNA in SG), and liver.

**Methods:** INF was classified as diffuse or focal. Immunohistochemistry for CD3, CD20, CD8, CD4, CD57, CD68, and S100 was performed in 61 SG and 59 livers.

**Results:** Diffuse INF was more common in SG than in liver. CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> were the most frequent cells in both tissues, with few CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, and S100<sup>+</sup> cells. CD4<sup>+</sup> cells were common in liver, but rare in SG. Liver presented higher indexes for all markers, except S100<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ). Higher CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ) were observed in SG with focal infiltrate than with diffuse infiltrate. In liver, CD20<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> were higher in focal infiltrate, and CD68<sup>+</sup> in diffuse infiltrate ( $p < 0.05$ ). Comparisons with laboratorial data did not show statistical significance.

**Conclusions:** The INF in SG was mainly composed by T and B lymphocytes, mostly cytotoxic T cells. The glandular INF can present differences in composition according to its distribution. A more intense inflammation was observed in liver, but similar cell types were identified in SG, except for CD4<sup>+</sup>.

© 2014 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Chronic hepatitis C (CHC) is a severe disease that affects over 3% of global population. It is caused by the hepatitis C virus (HCV), which infects and replicates in liver, its target organ. Following infection, in most cases the host immune system fails to eradicate the virus and a sustained immune-inflammatory response takes place. Besides its ineffectiveness to eliminate HCV, the immune response also damages the liver tissue, leading to inflammation, fibrosis, and hepatocellular alterations [1].

Hyposalivation, xerostomia, and sialoadenitis are some conditions related to salivary glands (SG) which have been reported in CHC patients as extra-hepatic manifestations of the HCV infection [2,3]. Despite the HCV sialotropism reported in the current litera-

ture, the investigation of the presence of HCV in the SG has shown conflicting results [3–7]. Accordingly, these alterations may represent secondary effects caused by the persistent systemic immunological response against HCV infection rather than a local response to the HCV [7–10].

Previous studies identified a predominance of T lymphocytes over B lymphocytes in the inflammatory infiltrate (INF) present in liver of CHC patients [11,12]. Macrophages and natural killer cells were observed in a small proportion [11,12]. However, concerning SG, few studies aimed to elucidate the composition and the role of such INF in this group of patients. SCOTT et al. [13], showed a predominance of T lymphocytes, with few B lymphocytes. COLL et al. [14], studied three samples, in which they found a predominance of T lymphocytes in the diffuse infiltrate, whereas B lymphocytes were more numerous in focal inflammation.

Therefore, despite many studies and reports on SG involvement in CHC patients, the etiopathogenesis of these alterations is still poorly clarified, including the understanding of the INF composition, distribution, and function. Therefore, this study aimed to

\* Corresponding author. Address: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, sala 3201, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, CEP 31.270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil. Fax: +55 31 34092472.

E-mail address: [pat\\_caldeira@yahoo.com.br](mailto:pat_caldeira@yahoo.com.br) (P.C. Caldeira).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2014.02.019>

0198-8859/© 2014 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

characterize the composition and the pattern of distribution of the inflammatory cells in minor SG of patients with CHC, comparing with laboratorial data of patients, and with liver samples.

## 2. Material and methods

The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki. The Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (196/06) has approved the study protocol.

### 2.1. Samples

#### 2.1.1. Salivary glands

Samples were retrieved from archived material collected in a previous study [3], for which SG were obtained through biopsy in the clinically healthy lower lip mucosa of volunteers from Viral Hepatitis Reference Center of the Alfa Institute of Gastroenterology at the Clinics Hospital of Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. Inclusion criteria involved patients with a confirmed diagnosis of CHC (anti-HCV positive, Elisa III, HCV RNA qualitative test positive, Amplicor Roche®), without any previous treatment or other concomitant liver disease [3]. Patients with human immunodeficiency virus infection were excluded, as well as patients with symptoms of Sjögren syndrome [3].

Sixty-one cases with formalin-fixed, paraffin-embedded SG tissue were used, and the laboratorial data, i.e. HCV RNA presence in the SG, METAVIR grade in liver, virus genotype, and viral load were assessed for comparisons [3].

#### 2.1.2. Liver

Fifty-nine cases of paraffin-embedded tissue obtained through needle biopsy of liver from patients with CHC presenting grade A2 in METAVIR were retrieved from the files of Hepatic Pathology Laboratory of the Pathological Anatomy Department of the School of Medicine of Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil, and were included in the study. It was not possible to obtain liver samples from the same patients who provided SG.

### 2.2. Pattern of distribution of the inflammatory infiltrate

For this analysis, hematoxylin and eosin-stained slides of both, SG and liver samples, were evaluated. In each case, the whole tissue was observed under a light microscope (Carl Zeiss – AxioStar 1122-100). The INF was classified as “focal” if inflammatory cells were arranged in aggregates of 50 or more cells. The infiltrate was set as “diffuse” if a distinct pattern of distribution could not be observed [15].

### 2.3. Immunohistochemical staining

Immunohistochemistry was performed for the following markers: CD3 (T lymphocytes); CD20 (B lymphocytes); CD8 (cytotoxic T lymphocytes); CD4 (helper T lymphocytes); S100 (dendritic cells); CD68 (macrophages) and CD57 (natural killer cells). Specifications are provided in Table 1. Briefly, 3 µm sections were dewaxed in xylene and hydrated with graded ethanol. After antigen retrieval, endogenous peroxidase was blocked with a 10 v solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Slides were incubated with the primary antibody for 1 h at room temperature. Detection was undertaken with ready-to-use reagents. Reactions were revealed with DAB chromogenic solution (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, code K3468). Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. Negative controls were obtained by omission of primary antibody and samples of mucocoele with known positive reactivity were included as positive controls.

### 2.4. Cell counting and statistical analysis

Cells were considered positive if they presented brown staining, regardless of the intensity. For S100 staining, positive cells were considered only if presenting dendritic morphology. Counting was performed by one investigator using an eyepiece grid in light microscope (Carl Zeiss – AxioStar 1122-100) under 400× magnification. Positive and negative cells were counted and results were expressed as percentage of positive cells. For cases with focal infiltrate, 50 inflammatory cells (positive and negative) were counted in each focus. Six foci were evaluated in each slide, encompassing 300 cells. For cases with diffuse infiltrate, 50 cells per high-power field (400×) were counted. Six fields were considered, comprising 300 cells. For those cases in which the whole tissue was smaller than six fields or foci, all inflammatory cells were considered.

For statistical analyses, Minitab® (Minitab Inc., State College, PA, USA) and SPSS® for Windows, version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) were used. Normality tests were done. Non-parametric (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney) and parametric tests (ANOVA and “Student's-t”) were used properly. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

Table 2 summarizes the clinical and laboratorial information about patients who provided SG. Most patients were men (35/61; 57.4%), in their 5th decade of life (18/61; 29.5%), and had blood transfusion as the risk factor for acquiring HCV (26/61; 42.6%). Of note, no risk factor could be identified in 9 (14.8%) patients. Most samples of SG were negative for HCV RNA detection (51/61; 83.6%). The mean time of CHC diagnosis was 36.8 months, but a wide range (1–180) was noticed (data not shown).

**Table 1**  
Specifications of the immunohistochemistry.

Primary antibody	Clone/manufacturer	Antigen retrieval	Dilution	Detection system <sup>a</sup>
Anti-CD3	F7.2.38, Dako Cytomation, Denmark, code M7254	TRIS-EDTA, pH 9.0, steamer 96 °C, 30 min	1:200	Advance <sup>b</sup>
Anti-CD20cy	L26, Dako Cytomation, Denmark, code M0755	Citric acid, pH 6.0, water bath 96 °C, 30 min	1:200	LSAB <sup>c</sup>
Anti-CD8	C8/144B, Dako Cytomation, Denmark, code M7103	TRIS-EDTA, pH 9.0, water bath 96 °C, 30 min	1:500	LSAB
Anti-CD4	4B12, Dako Cytomation, Denmark, code M7310	Trilogy <sup>d</sup> , pressure cook, 26 min	1:100	Advance
Anti-S100	Polyclonal, Dako Cytomation, Denmark, code Z0311	No treatment	1:500	LSAB
Anti-CD68	KP1, Diagnostic BioSystems, EUA, code Mob167	Citric acid, pH 6.0, water bath 96 °C, 30 min	1:1500	Advance
Anti-CD57	TB01, Dako Cytomation, Denmark, code M7271	TRIS-EDTA, pH 9.0, water bath 96 °C, 30 min	1:100	LSAB

<sup>a</sup> For salivary glands. For liver samples, Advance system was used for all antibodies.

<sup>b</sup> Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, code K4068.

<sup>c</sup> Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA, code K0690.

<sup>d</sup> Cell Marque, Rocklin, CA, EUA, code 920P-07.

**Table 2**

Clinical and laboratorial data about the 61 patients who provided salivary glands samples (Data from Grossmann et al., 2010 [3]).

Clinical data	N (%)
Gender	
Male	35 (57.4)
Female	26 (42.6)
Age (decades)	
2	1 (1.6)
3	2 (3.3)
4	9 (14.8)
5	18 (29.5)
6	11 (18.0)
7	15 (24.6)
8	5 (8.2)
Risk factor	
Blood transfusion	26 (42.6)
Unknown	9 (14.8)
Percutaneous	8 (13.1)
Previous surgery	6 (9.8)
Illicit drug use	6 (9.8)
Other	5 (8.2)
Hemodialysis	1 (1.6)
Laboratorial data	
HCV RNA in salivary gland	
Negative	51 (83.6)
Positive	10 (16.4)
Metavir in liver	
A0	6 (9.8)
A1	19 (31.1)
A2	16 (26.2)
Not investigated	20 (32.8)
Genotype	
1a	7 (11.5)
1b	12 (19.7)
3a	4 (6.6)
Not investigated	38 (62.3)
Viral load	
<400,000 IU/mL	7 (11.5)
>400,000 IU/mL	15 (24.6)
Not investigated	39 (63.9)

A focal pattern of distribution of inflammatory cells was noticed in 26/61 (42.6%) SG and in 51/59 (86.4%) liver samples. A diffuse pattern of distribution was observed in 35/61 (57.4%) samples of SG and

in 8/59 (13.6%) samples of liver (Fig. 1). Overall, neutrophils were not observed and the INF was mainly composed by lymphocytes. Few plasma cells were observed and were negative for CD20 marker.

In general, CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> cells accounted for the majority of inflammatory cells in both, SG and liver samples. A predominance of CD3<sup>+</sup> over CD20<sup>+</sup> could be observed in SG (ratio: 1.17) and liver (ratio: 1.90). CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, and S100<sup>+</sup> were also found in both tissues, though in a lower index. CD4<sup>+</sup> cells were scarce in SG (mean 3.9%), but not in liver (mean 24.4%). CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in SG was 0.30 and 1.06 in liver. Fig. 2 shows the immunostaining for each marker in SG and liver with focal and diffuse infiltrate.

Indexes of immunostaining are summarized in Tables 3 and 4 shows statistical comparisons. The main results are highlighted below.

Comparing SG with liver samples, irrespective of the pattern of distribution of the INF, all markers except for S100<sup>+</sup> showed higher indexes in liver than in SG ( $p < 0.05$ ).

Regarding focal and diffuse infiltrate in SG, higher indexes of CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> were found in focal inflammation ( $p < 0.05$ ). Comparing focal and diffuse infiltrate in liver, CD20<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> indexes were higher in focal infiltrate, and CD68<sup>+</sup> in the diffuse one ( $p < 0.05$ ).

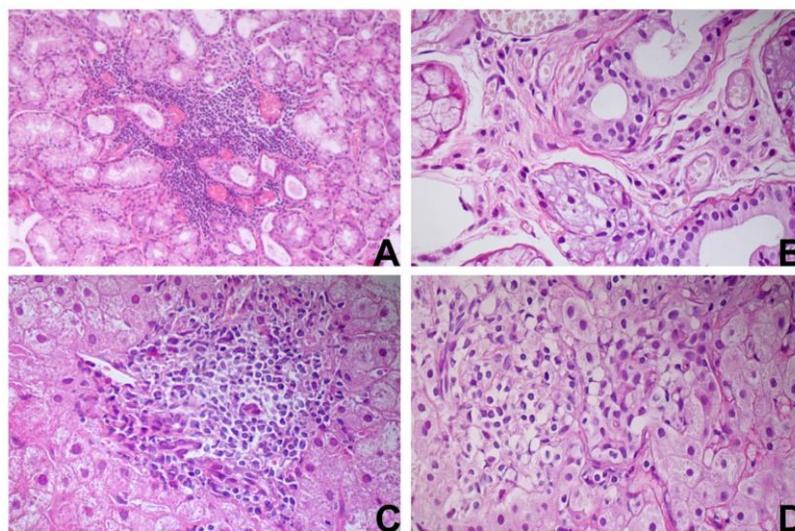
Concerning SG and liver with focal infiltrate, CD20<sup>+</sup> and S100<sup>+</sup> indexes were higher in SG ( $p < 0.05$ ), while CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD68<sup>+</sup> were higher in liver ( $p < 0.05$ ). Analyzing SG and liver, both with diffuse infiltrate, higher indexes of CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD68<sup>+</sup> were observed in liver samples ( $p < 0.05$ ).

No statistically significant difference was observed between the SG samples' indexes and clinical data of patients, i.e. METAVIR grade in liver, genotype, viral load, and HCV RNA detection in SG.

Finally, Table 5 shows detailed information about those ten patients with positive HCV RNA in SG. Most (7/10) presented focal infiltrate in SG and some of them showed immunostaining indexes above the means of the respective group, regardless of statistical significance.

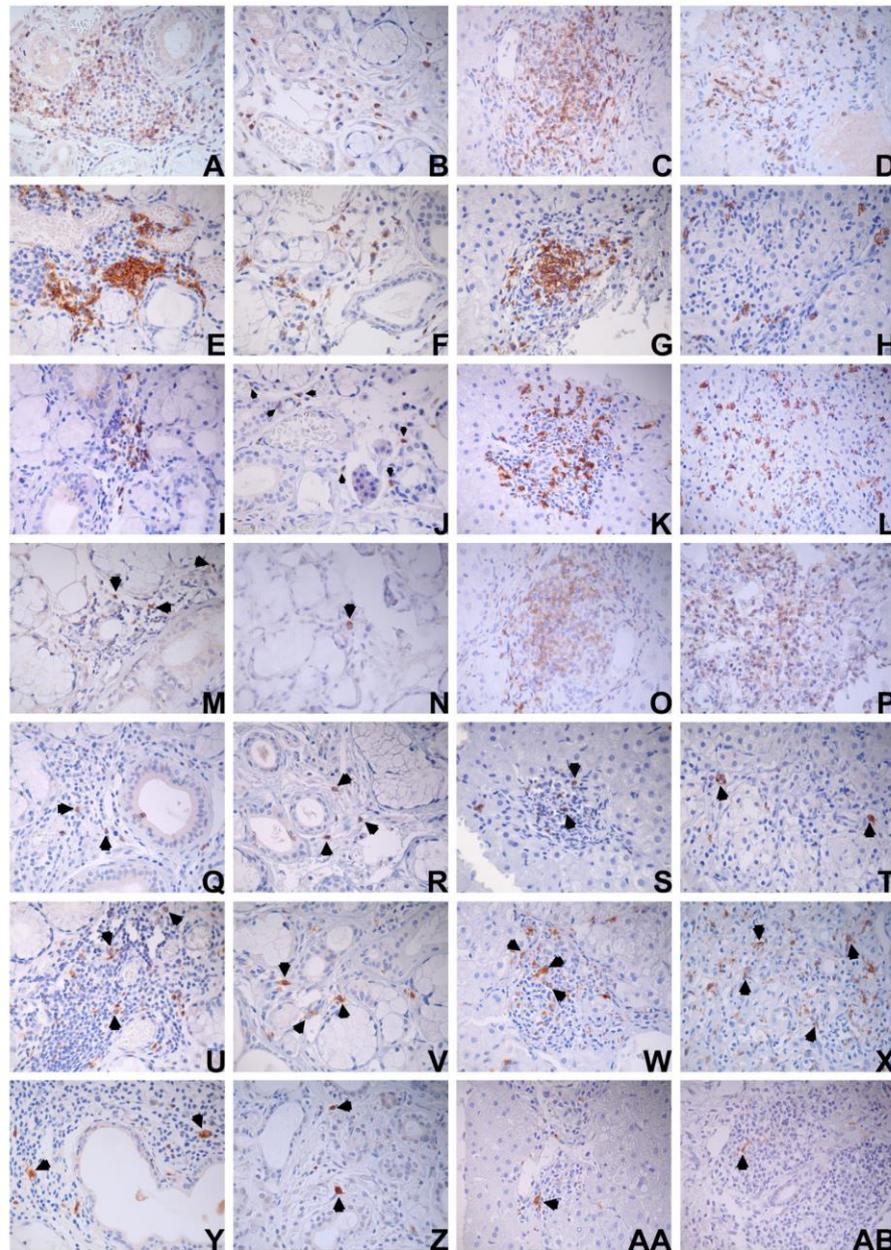
#### 4. Discussion

The involvement of SG in CHC patients is widely reported but it still deserves investigations, mainly focused on the understanding



**Fig. 1.** Pattern of distribution of inflammatory cells (hematoxylin-eosin staining). (A) Salivary gland with focal infiltrate, 200 $\times$ . (B) Salivary gland with diffuse infiltrate, 400 $\times$ . (C) Liver with focal infiltrate, 400 $\times$ . (D) Liver with diffuse infiltrate, 400 $\times$ .

Please cite this article in press as: Caldeira PC et al. Inflammatory cells in minor salivary glands of patients with chronic hepatitis C: Immunophenotype, pattern of distribution, and comparison with liver samples. Hum Immunol (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2014.02.019>



**Fig. 2.** Immunohistochemical findings (streptavidin-biotin, 400 $\times$ ). Detection of CD3<sup>+</sup> (A–D), CD20<sup>+</sup> (E–H), CD8<sup>+</sup> (I–L), CD4<sup>+</sup> (M–P), CD57<sup>+</sup> (Q–T), CD68<sup>+</sup> (U–X), and S100<sup>+</sup> (Y–AB) in salivary glands with focal infiltrate (first column), salivary glands with diffuse infiltrate (second column), liver with focal infiltrate (third column), and liver with diffuse infiltrate (fourth column) of patients with chronic hepatitis C.

of the etiopathogenesis of such alterations, as well as their clinical significance [3,9]. Like in other extra-hepatic manifestations of CHC, the host immunological response against HCV seems to be an important event [9]. Thus, the present study aimed to compare the composition and the arrangement of the INF in SG of patients with CHC with laboratorial data and hepatic inflammation.

The INF in SG showed a diffuse pattern of distribution in most cases (57.4%), nevertheless a focal infiltrate was seen in 42.6% of

liver samples. Besides, a focal arrangement was found in most (86.5%) liver samples. Local and systemic features could explain this difference between both tissues. For example, the presence of HCV in the tissue, considering that the liver is the target organ for HCV and SG are affected probably secondarily. Of note, it was not possible to assess liver samples from the same patients of SG. Indeed, the comparison with those liver samples aimed to explore whether the inflammatory infiltrate present in different organs showed any

**Table 3**  
Percentage of inflammatory cells in salivary glands and liver of patients with chronic hepatitis C.

Marker	SG, total (n = 61)	Liver, total (n = 59)	SG, focal (n = 26)	SG, diffuse (n = 35)	Liver, focal (n = 51)	Liver, diffuse (n = 8)
CD20 <sup>+</sup>	21.0 ± 19.7	25.2 ± 13.0	35.4 ± 18.8	10.4 ± 12.3	26.7 ± 13.3	15.4 ± 3.8
CD3 <sup>+</sup>	24.6 ± 12.1	47.8 ± 7.0	33.2 ± 11.0	18.3 ± 8.7	48.5 ± 7.1	43.2 ± 4.1
CD8 <sup>+</sup>	13.2 ± 6.8	23.0 ± 4.7	17.1 ± 8.5	10.3 ± 3.1	23.0 ± 4.2	23.6 ± 7.8
CD4 <sup>+</sup>	3.9 ± 6.9	24.4 ± 8.0	5.7 ± 8.6	2.6 ± 4.9	25.0 ± 7.8	21.0 ± 8.9
CD57 <sup>+</sup>	5.6 ± 2.3	6.6 ± 2.0	5.9 ± 1.7	5.4 ± 2.6	6.7 ± 1.9	6.0 ± 2.6
CD68 <sup>+</sup>	4.9 ± 2.8	6.2 ± 2.8	4.9 ± 2.8	4.9 ± 2.8	5.9 ± 2.8	7.8 ± 2.5
S100 <sup>+</sup>	2.3 ± 1.7	1.4 ± 0.8	2.4 ± 1.8	2.2 ± 1.6	1.4 ± 0.8	1.4 ± 0.7

SG = salivary glands. Results are shown as mean values ± standard deviation

**Table 4**  
Comparison of percentage of inflammatory cells between groups.

Comparison	CD20	CD3	CD8	CD4	CD57	CD68	S100
SG, total X Liver, total	0.014 <sup>a,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.007 <sup>a,*</sup>	0.005 <sup>a,*</sup>	0.001 <sup>a,*</sup>
SG, FI X SG, DI	0.000 <sup>a,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.000 <sup>a,*</sup>	0.073 <sup>a</sup>	0.426 <sup>b</sup>	0.948 <sup>a</sup>	0.344 <sup>a</sup>
Liver, FI X Liver, DI	0.004 <sup>a,*</sup>	0.043 <sup>b,*</sup>	0.827 <sup>b</sup>	0.194 <sup>b</sup>	0.172 <sup>a</sup>	0.037 <sup>a,*</sup>	0.907 <sup>b</sup>
SG, FI X Liver, FI	0.036 <sup>a,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.000 <sup>a,*</sup>	0.000 <sup>a,*</sup>	0.060 <sup>b</sup>	0.039 <sup>a,*</sup>	0.001 <sup>a,*</sup>
SG, DI X Liver, DI	0.009 <sup>a,*</sup>	0.000 <sup>b,*</sup>	0.002 <sup>b,*</sup>	0.000 <sup>a,*</sup>	0.553 <sup>a</sup>	0.012 <sup>a,*</sup>	0.207 <sup>b</sup>

SG, salivary glands; FI, focal infiltrate; DI, diffuse infiltrate.

<sup>a</sup> Mann–Whitney test.

<sup>b</sup> T-test.

\* Statistically significant,  $p < 0.05$ .

**Table 5**  
Information about the 10 patients with positive HCV RNA in salivary glands.

Case number	Inflammatory infiltrate	METAVIR in liver	CD20 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD57 <sup>+</sup>	CD68 <sup>+</sup>	S100 <sup>+</sup>
1	Diffuse	A2	54.0 <sup>*</sup>	14.5	8.6	0.0	5.5 <sup>*</sup>	2.7	3.0 <sup>*</sup>
2	Diffuse	A1	2.0	16.0	6.0	0.0	9.3 <sup>*</sup>	7.3 <sup>*</sup>	1.3
3	Diffuse	NA	0.0	10.0	7.0	2.0	2.7	2.8	0.4
4	Focal	A0	50.0 <sup>*</sup>	34.0 <sup>*</sup>	7.3	6.0 <sup>*</sup>	5.6	5.2 <sup>*</sup>	1.3
5	Focal	NA	42.0 <sup>*</sup>	56.0 <sup>*</sup>	31.0 <sup>*</sup>	28.0 <sup>*</sup>	5.0	6.0 <sup>*</sup>	10.0 <sup>*</sup>
6	Focal	A1	19.5	43.7 <sup>*</sup>	37.0 <sup>*</sup>	0.0	7.0 <sup>*</sup>	11.6 <sup>*</sup>	3.0 <sup>*</sup>
7	Focal	A2	10.8	35.0 <sup>*</sup>	20.6 <sup>*</sup>	0.0	6.0 <sup>*</sup>	8.0 <sup>*</sup>	0.0
8	Focal	A1	54.7 <sup>*</sup>	28.0	19.0 <sup>*</sup>	5.0	5.3	6.8 <sup>*</sup>	2.7 <sup>*</sup>
9	Focal	NA	88.8 <sup>*</sup>	26.0	11.5	13.6 <sup>*</sup>	4.0	6.0 <sup>*</sup>	1.5
10	Focal	NA	22.0	42.7 <sup>*</sup>	18.4 <sup>*</sup>	0.0	6.7 <sup>*</sup>	2.4	2.0 <sup>*</sup>

\* Values above the mean of the group (see Table 2). NA = not available.

similarity, considering that patients had the same chronic infection, and that SG affection is considered an extra-hepatic manifestation of the disease.

We could observe that CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> lymphocytes were the most important components of INF in SG, as well as in liver of CHC patients. We also demonstrated that CD3<sup>+</sup> cells outnumbered CD20<sup>+</sup>, and this was less evident in SG (ratio: 1.17) than in liver (ratio: 1.90). Accordingly, a predominance of CD3<sup>+</sup> lymphocytes in SG of CHC patients was reported [13]. These findings indicate towards a major role of the cellular response in the etiopathogenesis of SG inflammation related to CHC. Of significance, although CD20<sup>+</sup> cells comprised one of the most prominent cellular type in SG, no relation could be observed between this marker and the detection of salivary anti-HCV antibodies (data not shown) [16]. Moreover, plasma cells were seldom observed.

Concerning the identification of the two main types of T lymphocytes, we found a CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of 0.30 for SG and 1.06 for liver, indicating that CD8<sup>+</sup> cells were predominant in SG, but not in liver. Indeed, CD4<sup>+</sup> cells were quite scarce in SG. CD8<sup>+</sup> lymphocytes are mainly T cytotoxic cells, with few CD8<sup>+</sup> cells being natural killer cells. Therefore, the results of the present study suggest that, in SG, direct cytotoxicity mediated by T lymphocytes may be enhanced if compared with liver, where an imbalance between

cytotoxic (CD8<sup>+</sup>) and helper (CD4<sup>+</sup>) T cells was found. Only one study analyzed three SG samples, reporting a CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio of 2.0 [14]. Previous studies reported ratios of 0.30 and higher than 1.5 for liver samples [11,12]. Other authors [17] reported the predominance of CD4<sup>+</sup> over CD8<sup>+</sup> in liver as well. Therefore, these differences are still to be clarified, as well as the expected CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio.

Irrespective of the pattern of distribution of inflammatory cells, the comparison between SG and liver indexes revealed statistically significant differences for all markers, being more prominent in liver. S100<sup>+</sup> was the only one to show higher indexes in SG. The more intense inflammation present in liver may be understood, as this is the target organ for HCV. Considering that SG and liver present different physiopathology, the higher percentage of S100<sup>+</sup> cells in SG may be related to the organ-specific composition and immunological response. Of relevance, Freni et al. [11] reported that follicular dendritic cells were absent in liver of CHC patients. R-Viso et al. [18] demonstrated that HCV-infected liver presented lower amount of S100<sup>+</sup> cells than HCV-negative samples. Furthermore, it is known that the early response of dendritic cells is important for the determination of the disease course and outcome – resolution or chronification – of HCV infection [19]. Moreover, HCV proteins are able to inhibit dendritic cells' functions, and

this is one of the HCV mechanisms to weaken or to escape from the host immune response [19,20]. These findings may also explain the lower amount of S100<sup>+</sup> cells in liver than in SG found in the present study.

Comparing focal and diffuse infiltrate in SG, statistically significant differences were found for CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> indexes, with focal infiltrate showing higher values of these markers. Considering that these cells comprised the major components of the SG INF, this result suggests that the INF can present differences according to its pattern of distribution. This may represent a different intensity and organization of the inflammatory response. Interestingly, in liver, the focal infiltrate also showed higher indexes of CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> than diffuse infiltrate ( $p < 0.05$ ).

Comparing SG with liver, both with focal infiltrate, we found that differences of all markers were statistically significant, except for CD57<sup>+</sup>. Higher CD20<sup>+</sup> and S100<sup>+</sup> indexes were found in SG, while CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD68<sup>+</sup> indexes were higher in liver. When diffuse infiltrate were compared between SG and liver, differences in CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, and CD68<sup>+</sup> indexes were statistically significant, and all of them were higher in liver. These results seem to reinforce that the composition of the INF, and probably its functional effects, has some relation to its pattern of distribution.

Comparisons between all indexes in SG and the laboratorial data of patients did not reach statistical significance. Therefore, it seems that the composition of the SG INF is not related to the inflammation in liver (assessed by METAVIR grade), viral genotype, viral load, or presence of HCV RNA in SG. Thus, it can be understood that even patients with no or discrete liver inflammation (METAVIR grade A0 or A1) can present glandular inflammation. Given that those HCV RNA-negative SG showed similar INF composition to positive ones ( $p > 0.05$  for all markers), it can be also speculated that the proportion of cells present in CHC sialoadenitis is not related to the local presence of the virus. However, most (7/10) HCV RNA-positive samples presented focal infiltrate in SG and some of them showed immunostaining indexes above the means of the respective group. Moreover, as percentage were evaluated herein, it should be further clarified whether the local presence of HCV in SG can influence the absolute number of inflammatory cells. In spite of this, the present results corroborate with the current literature reporting that the persistent systemic immunological response against HCV would participate in the pathogenesis of HCV-related sialoadenitis [7–10].

In conclusion, the present study showed that most SG had a diffuse pattern of distribution, though focal infiltrate could be found in many cases as well. The inflammation present in SG of CHC patients is mainly composed of CD3<sup>+</sup> and CD20<sup>+</sup> cells (ratio: 1.17). CD8<sup>+</sup> lymphocytes outnumbered CD4<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, and S100<sup>+</sup> cells were detected in a lower amount. A more intense inflammation was observed in liver, but similar cell types were identified in SG, except for CD4<sup>+</sup>, which are scarce in SG but numerous in liver. The results also suggest that the INF may present different composition according to its pattern of distribution. The focal infiltrate showed higher indexes of the main cells in SG and in liver. Finally, SG infiltrate did not relate to METAVIR, viral genotype, viral load, and presence of HCV RNA in SG. Further studies are clearly warranted to clarify whether the inflammatory cells present in SG are HCV-specific and functionally active, and their cytokine secretion profile. Comparison of findings in HCV-related focal infiltrate with the one found in Sjögren syndrome would also be contributory.

## Competing interests

None declared.

## Acknowledgments

This study was supported in part by grants from FAPEMIG, CNPq, and CAPES, Brazil. The authors thank Dr. Rosângela Teixeira, coordinator of the Ambulatório de Hepatites Virais of the Instituto Alfa de Gastroenterologia of the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Minas Gerais.

## References

- [1] Lefkowitz JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res* 2007;38:634.
- [2] Haddad J, Deny P, Munz-Gotheil C, Ambrosini JC, Trinchet JC, Pateron D, et al. Lymphocytic sialadenitis of Sjögren's syndrome associated with chronic hepatitis C virus liver disease. *Lancet* 1992;339:321.
- [3] Grossmann Sde M, Teixeira R, Oliveira GC, Gleber-Netto FO, Araújo FM, Carmo MA. Xerostomia, hyposalivation and sialadenitis in patients with chronic hepatitis C are not associated with the detection of HCV RNA in saliva or salivary glands. *J Clin Pathol* 2010;63:1002.
- [4] De Vita S, Sansonno D, Dolcetti R, Ferraccioli G, Carbone A, Cornacchiolo V, et al. Hepatitis C virus within a malignant lymphoma lesion in the course of type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 1995;86:1887.
- [5] Verbaan H, Carlson J, Eriksson S, Larsson A, Liedholm R, Manthorpe R, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C infection and the interrelationship between primary Sjögren's syndrome and hepatitis C in Swedish patients. *J Intern Med* 1999;245:127.
- [6] Arrieta JJ, Rodríguez-Iñigo E, Ortiz-Movilla N, Bartolomé J, Pardo M, Manzarbeitia F, et al. In situ detection of hepatitis C virus RNA in salivary glands. *Am J Pathol* 2001;158:259.
- [7] Ohoka S, Tanaka Y, Amako Y, Kohara M, Ishidate K, Watanabe M, et al. Sialadenitis in patients with chronic hepatitis C is not directly related to hepatitis C virus. *Hepato Res* 2003;27:23.
- [8] Ramos-Casals M, García-Carrasco M, Brito Zerón MP, Cervera R, Font J. Viral etiopathogenesis of Sjögren's syndrome: role of the hepatitis C virus. *Autoimmun Rev* 2002;1:238.
- [9] Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 1. sialadenitis and salivary glands lymphoma. *Oral Dis* 2008;14:123.
- [10] Ko HM, Hernandez-Prera JC, Zhu H, Dikman SH, Sidhu HK, Ward SC, et al. Morphologic features of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:740138.
- [11] Freni MA, Artuso D, Gerken G, Spanti C, Marafioti T, Alessi N, et al. Focal lymphocytic aggregates in chronic hepatitis C: occurrence, immunohistochemical characterization, and relation to markers of autoimmunity. *Hepatology* 1995;22:389.
- [12] Walewska-Zielecka B, Madalinski K, Jablonska J, Godzik P, Cielecka-Kuszyk J, Litwinska B. Composition of inflammatory infiltrate and its correlation with HBV/HCV antigen expression. *World J Gastroenterol* 2008;14:4040.
- [13] Scott CA, Avellini C, Desinan L, Pirisi M, Ferraccioli GF, Bardus P, et al. Chronic lymphocytic sialoadenitis in HCV-related chronic liver disease: comparison of Sjögren's syndrome. *Histopathology* 1997;30:41.
- [14] Coll J, Gambús G, Corominas J, Tomás S, Esteban JI, Guardia J. Immunohistochemistry of minor salivary gland biopsy specimens from patients with Sjögren's syndrome with and without hepatitis C virus infection. *Ann Rheum Dis* 1997;56:390.
- [15] Vitali C. Immunopathologic differences of Sjögren's syndrome versus sicca syndrome in HCV and HIV infection. *Arthritis Res Ther* 2011;13:233.
- [16] Caldeira PC, Oliveira e Silva KR, Silva TA, de Mattos Camargo Grossmann S, Teixeira R, Carmo MA. Correlation between salivary anti-HCV antibodies and HCV RNA in saliva and salivary glands of patients with chronic hepatitis C. *J Oral Pathol Med* 2013;42:222.
- [17] Viso AT, de Castro Barbosa T, Yamamoto L, Pagliari C, Fernandes ER, Brasil RA, et al. Portal CD4+ and CD8+ T lymphocyte correlate to intensity of interface hepatitis in chronic hepatitis C. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2007;49:371.
- [18] R-Viso AT, Duarte MI, Pagliari C, Fernandes ER, Brasil RA, Benard G, et al. Tissue and serum immune response in chronic hepatitis C with mild histological lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;105:25.
- [19] Irshad M, Khushboo I, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol* 2008;27:497.
- [20] Szabo G, Dolganiuc A. HCV immunopathogenesis: virus-induced strategies against host immunity. *Clin Liver Dis* 2006;10:753.

## 6.2 Parte II: Análise global do infiltrado inflamatório das glândulas salivares e fígado de pacientes com hepatite C crônica.

**Quadro 3: Perfil imunoistoquímico do infiltrado inflamatório de glândulas salivares e fígado de pacientes com hepatite C crônica.**

Marcador	Grupo					
	Glândula salivar, total (n=61)	Fígado, total (n=59)	Glândula salivar, focal (n=26)	Glândula salivar, difuso (n=35)	Fígado, focal (n=51)	Fígado, difuso (n=8)
CD20	++	+++	+++	++	+++	++
CD3	++	+++	+++	++	+++	+++
CD8	++	++	++	++	++	++
CD4	+	++	+	+	++	++
CD57	+	+	+	+	+	+
CD68	+	+	+	+	+	+
S100	+	+	+	+	+	+

O quadro acima demonstra os resultados globais encontrados no estudo. Podemos observar que, comparando os grupos glândula salivar total e fígado total, o infiltrado de células CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> foi mais intenso no fígado que na glândula salivar. Estes marcadores foram utilizados para identificação dos dois tipos principais de linfócitos, T e B respectivamente, que representariam uma proporção relevante das células inflamatórias encontradas nos tecidos. Além disto, sendo o fígado o órgão-alvo e primário do HCV, é esperado que neste órgão o infiltrado inflamatório seja mais intenso, como encontrado no estudo (LI e SCHWARZ, 2002; FOCACCIA, 2003). Podemos perceber, ainda, que a quantidade de CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> em cada um dos dois grupos apresentou a mesma graduação, ou seja, “++” para glândula e “+++” para fígado. Este resultado parece indicar que na fase crônica da hepatite C, tanto a resposta humoral (mediada por células B), quanto a celular (mediada por células T) estão presentes, tanto na glândula salivar quanto no fígado.

Ainda comparando glândula salivar total e fígado total, percebe-se que a detecção das células CD4<sup>+</sup> foi muito baixa em glândula salivar, mas não no fígado. Por outro lado, as células

CD8<sup>+</sup> foram encontradas na mesma proporção em ambos os tecidos. Vale lembrar que células CD4<sup>+</sup> apenas reconhecem antígenos apresentados via MHC II, o qual é expresso por um número restrito de células, com as células dendríticas e macrófagos. Já as células CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos via MHC I, expresso por uma gama maior de células no organismo. Foi previamente relatado que a resposta de LT CD4<sup>+</sup> HCV-específicos é fraca ou ausente na hepatite C crônica (SZABO e DOLGANUIC, 2006; SEMMO e KLENERMAN, 2007; REHERMANN, 2009). No presente estudo, a razão CD4/CD8 foi de 1,06 no fígado e 0,30 na glândula. Os estudos que avaliaram esta razão em fígado trazem resultados conflitantes, de 0,3 (FRENI *et al.*, 1995) e >1,5 (WALEWSKA-ZIELECKA *et al.*, 2008). Já em glândula salivar, um único estudo avaliou três amostras relatou uma razão entre CD4<sup>+</sup>: CD8<sup>+</sup> de 2:1 (COLL *et al.*, 1997).

As células CD57<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> e S100<sup>+</sup> puderam ser detectadas na maioria dos casos, porém em quantidades muito pequenas. Estes três tipos celulares, células NK, macrófagos e células dendríticas, estão relacionados à imunidade inata do hospedeiro, a qual é a primeira a ser ativada frente a uma infecção. Portanto, podemos supor que estas células, embora importantes na fase aguda da infecção pelo HCV, possam ter função prejudicada, ou não estejam em concentração suficiente, levando à cronificação da doença. Por outro lado, apesar de poucas, estas células ainda são encontradas tanto no fígado quanto na glândula, indicando que possivelmente continuam a processar e apresentar antígenos, o que pode contribuir para a manutenção do infiltrado inflamatório crônico nos tecidos.

Ao comparar os grupos de glândula salivar apresentando infiltrado em foco com difuso, observa-se que há uma presença maior de células CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup> no infiltrado organizado em focos, sendo os resultados para glândula com infiltrado em foco similar ao encontrado para fígado com infiltrado em foco.

Observando as amostras de fígado e de glândula, nota-se que as células CD20<sup>+</sup> foram mais frequentemente encontradas nos casos com infiltrado focal que difuso. Este achado foi relatado previamente em fígado e pode estar relacionado à formação de folículos linfoides neste tecido (FRENI *et al.*, 1995). A presença de linfócitos B em glândulas salivares parece

corroborar com a literatura, que relata que os anticorpos seriam importantes no desenvolvimento das manifestações extra-hepáticas da hepatite C crônica (LI e SCHWARZ, 2002).

Os resultados do presente estudo mostram que o infiltrado inflamatório presente nas glândulas salivares de pacientes com hepatite C crônica apresenta uma composição celular diversificada, com a presença substancial de LB e LT, especialmente os citotóxicos. As células inflamatórias encontradas nas glândulas salivares foram essencialmente as mesmas vistas no fígado, exceto CD4<sup>+</sup>. Além disso, a composição fenotípica do infiltrado inflamatório focal presente nas glândulas salivares parece se assemelhar ainda mais ao infiltrado hepático.



1. Assim como nas amostras hepáticas, o padrão de distribuição focal visto em glândulas salivares apresentou maior proporção de células inflamatórias. Desta forma, este padrão de distribuição parece ser o mais representativo da infecção pelo HCV.
2. O infiltrado inflamatório presente em glândulas salivares de pacientes com hepatite C crônica é composto principalmente por células CD3<sup>+</sup> e CD20<sup>+</sup>. Células CD8<sup>+</sup> são mais numerosas que as CD4<sup>+</sup>, sugerindo uma resposta mediada tanto por linfócitos T quanto linfócitos B, com atividade citotóxica mais proeminente.
3. Apesar do fígado apresentar maior proporção de células inflamatórias, os subtipos leucocitários são essencialmente os mesmos vistos em glândulas salivares, exceto as células CD4<sup>+</sup>.
4. Não há variação da composição do infiltrado inflamatório glandular em relação à carga viral, ao grau de inflamação hepática, ao genótipo ou à presença de HCV-RNA no tecido, sugerindo respostas diferentes inerentes ao hospedeiro, em relação à infecção pelo HCV.



## 8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.

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

Parecer nº. ETIC 192/06

**Interesse: Profa. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo**  
**Depto de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica**  
**Faculdade de Odontologia -UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou *ad referendum*, no dia 24 de agosto de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “Alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia  
Presidente do COEP/UFMG

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

**Parecer nº. ETIC 192/06**

**Interessada: Profa. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo  
Depto de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica  
Faculdade de Odontologia -UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP apreciou e aprovou, no dia 26 de setembro de 2006, o adendo ao projeto de pesquisa intitulado **“Alterações de glândulas salivares em pacientes com hepatite C crônica”** no que se refere a:

- Introdução da técnica de imunistoquímica.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
Coordenadora do COEP/UFMG