

**Aspectos fenotípicos celulares da
imunidade inata e adaptativa em
portadores de hepatite C crônica
com e sem insuficiência renal crônica**

Eric Bassetti-Soares

ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DA
IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM
PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM E SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Medicina

Área de concentração: Gastroenterologia

Orientadora: Dra. Rosângela Teixeira
Co-orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2006

Eric Bassetti-Soares

**ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DA
IMUNIDADE INATA E ADAPTATIVA EM
PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM E SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada e defendida perante a Comissão Examinadora, constituída pelos Professores:

Rosângela Teixeira – UFMG (Orientadora)

Olindo Assis Martins Filho - CPq René Rachou, Fiocruz (Co-orientador)

Edison Roberto Parise - UNIFESP

Mariléia Chaves Andrade – CPq René Rachou, Fiocruz

Fausto Edmundo Lima Pereira – UFES

Aloísio Sales da Cunha - UFMG

Belo Horizonte, 30 de junho de 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor:

Prof. Dr. Ronaldo Tadeu Pena

Vice-Reitor:

Profa. Dra. Heloísa Maria Murgel Starling

Pró-Reitor de Pós-Graduação:

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor:

Prof. Dr. Francisco José Penna

Vice-Diretor:

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

Chefe:

Prof. Dirceu Bartolomeu Greco

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO GASTROENTEROLOGIA
COLEGIADO:**

Prof. Marco Túlio Costa Diniz (Coordenador)

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Subcoordenador)

Profa. Dra. Cláudia Alves Couto

Profa. Dra. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Dra. Luciana Dias Moretzsohn

Ivan René Viana Omonte (Rep. Discente Titular)

Belo Horizonte

2006

*À minha esposa Cristina e meus filhos,
Matheus e Luísa, porque vocês arcaram com
grande parte do ônus do trabalho; a co-
autoria deste projeto é de vocês.*

*À minha família, que habita meus melhores
pensamentos e meu coração.*

À memória de João e Isabela.

AGRADECIMENTOS

- *Aos meus orientadores, Rosângela e Olindo, pelos constantes ensinamentos e por saberem manter acesa a chama da investigação em uma pesquisa tão longa;*
- *Aos sujeitos da pesquisa, que colaboraram com o conhecimento científico, sem a perspectiva de ganho pessoal;*
- *Aos colegas Gustavo e Jaqueline, pela paciência em me introduzir na arte de ir à bancada;*
- *Às imprescindíveis Bia e Haleta, que realizaram grande parte dos procedimentos de bancada;*
- *Aos pesquisadores, funcionários e estagiários do Laboratório de Chagas – LADOC – que sempre me auxiliaram nas leituras e no processamento dos dados;*
- *Ao Centro de Pós-graduação em Medicina da UFMG, que propiciou meu desenvolvimento como pesquisador e apoiou financeiramente o projeto;*
- *À Fundação Hemominas, que me permitiu o primeiro contato com pesquisa, forneceu a estrutura física, equipamentos e parte dos reagentes para a realização deste projeto;*
- *Ao Centro de Pesquisa René Rachou, fundamental na leitura e aquisição dos dados;*
- *Aos colegas do Ambulatório de Hepatites Virais, pelo trabalho em prol dos nossos pacientes e da elevação do conhecimento científico;*

- *Ao Instituto Alfa de Gastroenterologia, pelo estímulo ao contínuo aprimoramento dos profissionais da área de saúde;*
- *A todos os envolvidos neste ambicioso projeto, direta ou indiretamente, por tornarem possível a sua execução.*

SUMÁRIO

LISTAS

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO	26
INTRODUÇÃO	29
<i>O vírus da hepatite C</i>	<i>29</i>
<i>A doença.....</i>	<i>33</i>
<i>Características da resposta imune em portadores de hepatite C</i>	<i>38</i>
<i>Características da resposta imune em portadores de insuficiência renal crônica (IRC) sob terapia renal substitutiva (TRS)</i>	<i>59</i>
OBJETIVOS.....	68
<i>Objetivo geral.....</i>	<i>68</i>
<i>Objetivos específicos</i>	<i>68</i>
JUSTIFICATIVA	70
CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO.....	77
<i>População estudada</i>	<i>77</i>
<i>Análise do fenótipo de subpopulações celulares após cultura do sangue periférico</i>	<i>80</i>
<i>Aquisição e análise dos dados.....</i>	<i>83</i>
<i>Análise estatística</i>	<i>85</i>
RESULTADOS	87

1. <i>Análise de freqüências de populações e subpopulações dos leucócitos do sangue periférico.....</i>	<i>87</i>
2. <i>Análise da expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD38 e a freqüência de expressão da molécula co-estimuladora CD28 em leucócitos circulantes.....</i>	<i>98</i>
3. <i>Avaliação do potencial migratório dos leucócitos circulantes através da análise da expressão de moléculas de adesão CD18 e CD62L</i>	<i>121</i>
4. <i>Correlação da freqüência de linfócitos T ativados (CD4+HLA-DR+ e CD8+HLA-DR+) com aspectos fenotípicos dos linfócitos circulantes</i>	<i>138</i>
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	159
CONCLUSÕES.....	169
PROPOSIÇÕES.....	172
ABSTRACT	175
ANEXOS	195
<i>Consentimento para Participação dos Doadores da Fundação Hemominas</i>	
<i>195</i>	
<i>Consentimento para Participação dos Pacientes do Hospital das Clínicas .</i>	<i>196</i>
<i>Publicação</i>	<i>197</i>
<i>Atividades no período 2001-2005</i>	<i>198</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da organização genética do genoma do HCV. Na posição 5' existem os genes estruturais e na posição 3' os não-estruturais.....32

FIGURA 2 – Esquema de resposta imune durante uma infecção viral.....39

FIGURA 3 – Subpopulações funcionais de células T. As células T expressam o receptor de determinantes antigênicos das células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Os linfócitos T $\alpha\beta$ são subdivididos em populações $CD4^+$ e $CD8^+$, que reconhecem, respectivamente, MHC de classe II e classe I. As células T $CD4^+$, denominadas LT auxiliares (LTa), e as células T $CD8^+$, denominadas LT citotóxicas (LTc), podem ainda ser subdivididas em tipo 1 e tipo 2, com base no perfil das citocinas que secretam.....43

FIGURA 4 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos Ta1. Linfócitos Ta1 secretam citocinas ativadoras de mecanismos efetores da imunidade celular, incluindo a citotoxicidade de LTc e a internalização e apresentação de antígeno por células fagocíticas.....45

FIGURA 5 – Aspectos gerais das funções dos linfócitos Ta2. As células T auxiliares (Ta) são estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos, produzem citocinas que favorecem a ativação B para a produção de anticorpos. As células B interagem com os LTa através de moléculas co-estimuladoras presentes na superfície celular, fornecendo sinais adicionais fundamentais para a ativação celular.....47

FIGURA 6. Componente de resposta imune antiviral. Com a infecção viral, numerosos mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados, iniciando com a resposta imune inata, seguida da adaptativa. A evolução da infecção é determinante de relação entre a resposta imune e o vírus. (adaptado de Chang, 2003).....57

FIGURA 7. Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo. (A) Gráficos de distribuição puntual FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária – R1. (B) Gráficos de distribuição puntual FL1 x FL2 são utilizados para avaliar parâmetros de interesse em populações ou subpopulações celulares específicas.....84

FIGURA 8. Percentual de células NK ($CD3^-CD16^+$) na população de linfócitos totais do sangue periférico circulantes de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com PE e anticorpos anti-CD16 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....89

FIGURA 9. Percentual de células NKT ($CD3^+CD16^+$) na população de linfócitos totais do sangue periférico circulantes de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=30) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com PE e anticorpos anti-CD16 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....89

FIGURA 10. Percentual de linfócitos T circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados - NI - (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=31) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....92

FIGURA 11. Percentual de linfócitos T $CD4^+$ circulantes no sangue periférico de não infectados (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=31) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....92

FIGURA 12. Percentual de linfócitos T CD8⁺ circulantes no sangue periférico de não infectados (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=32) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD8 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....93

FIGURA 13. Percentuais de linfócitos B (CD19⁺ CD5⁻) entre os linfócitos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=30), IRC (n=9) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....96

FIGURA 14. Percentuais de linfócitos B CD19⁺ CD5⁺ entre os linfócitos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=30), IRC (n=9) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....96

FIGURA 15. Fração de linfócitos B CD19⁺ CD5⁺ entre os linfócitos B em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=31), IRC (n=8) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos B do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....97

FIGURA 16. População de monócitos HLA-DR⁺⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR marcados com fluorocromo PE e anti-CD4 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....99

FIGURA 17. Percentual de neutrófilos CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=27) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti- CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos PE e FITC, respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....102

FIGURA 18. Intensidade média de fluorescência de CD38 em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=29), IRC (n=9) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 PE e anticorpos anti-CD8 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....102

FIGURA 19. Percentual de monócitos CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI e HCV. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....103

FIGURA 20. População de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ em *gate* de linfócitos, de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti- HLA-DR e anti-CD4 marcados com fluorocromos FITC e PE, respectivamente. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos totais do sangue periférico. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....105

FIGURA 21. Fração de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=8). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (PE e FITC, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn107

FIGURA 22. Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ em *gate* de linfócitos, de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR e anti-CD8 marcados com fluorocromos PE e FITC, respectivamente. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos totais do sangue periférico. Diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foi observada. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....109

FIGURA 23. Fração média de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ pelo percentual de linfócitos T CD8⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR marcado com fluorocromo PE e anti-CD8 marcado com fluorocromo FITC. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn..111

FIGURA 24. Percentual de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD38 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....113

FIGURA 25. Fração média de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....113

FIGURA 26. Percentual de células T CD8⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=29) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 marcados com fluorocromo PE e anti-CD8 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....115

FIGURA 27. Fração de células T CD8⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico no *gate* de linfócitos T CD8⁺ de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=30) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 marcados com fluorocromo PE e anti-CD8 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....115

FIGURA 28. População de linfócitos T CD4⁺ CD28⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....116

FIGURA 29. População de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão dos valores individuais, ressaltando a mediana dos valores como barra horizontal. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....117

FIGURA 30. Fração de linfócitos T CD4⁺ CD28⁻ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=30), IRC (n=9) e não infectados (n=13). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HCV e IRC e o grupo NI foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....119

FIGURA 31. Percentual de linfócitos T CD8⁺ CD28⁻ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....120

Figura 32. Intensidade de fluorescência de CD18 em neutrófilos de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como média dos valores e foram obtidos a partir da análise de neutrófilos do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....122

FIGURA 33. Intensidade média de fluorescência de CD18 em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=11). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....124

Figura 34. Intensidade de fluorescência de CD18 em monócitos de indivíduos infectados pelo HCV (n=28), IRC (n=8) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....126

FIGURA 35. Percentual de neutrófilos CD62L⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=29), IRC (n=8) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de neutrófilos do sangue periférico. Diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC e o grupo controle NI foi notada. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....128

FIGURA 36. Intensidade de fluorescência de CD62L em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=30), IRC (n=9) e não infectados (n=13). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....129

FIGURA 37. População de monócitos CD4⁻ CD62L⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=30) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo IRC e NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....131

FIGURA 38. Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=11). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....133

FIGURA 39. Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos T CD8⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foi observada. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....135

FIGURA 40. População de células T CD4⁺ CD62L⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD62L marcados com fluorocromo FITC e anti-CD4 marcados com fluorocromo PE. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....137

FIGURA 41. Intensidade de fluorescência de CD62L⁺ em linfócitos T CD8⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD62L marcados com fluorocromo FITC e anti-CD8 marcados com fluorocromo PE. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.....137

FIGURA 42. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo NI. Números de pares XY = 12, r = -0,5045, P = 0,0944 (NS).....139

FIGURA 43. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo HCV. Números de pares XY = 29, r = -0,1595, P = 0,4086 (NS).139

FIGURA 44. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo IRC. Números de pares XY = 9, r = -0,1714, P = 0,6593 (NS).....139

FIGURA 45. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD38⁺ no grupo NI. Números de pares XY = 12, r = -0,5045, P = 0,0944 (NS).....141

FIGURA 46. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD38⁺ no grupo HCV. Números de pares XY = 30, r = -0,2277, P = 0,2263 (NS).....141

FIGURA 47. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD38⁺ no grupo IRC. Números de pares XY = 9, r = 0,2980, P = 0,4361 (NS).....141

FIGURA 48. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺ CD28⁻ no grupo NI. Números de pares XY = 12, r = 0,1599, P = 0,6196 (NS).....143

FIGURA 49. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD28⁻ no grupo HCV. Números de pares XY = 29, r = 0,2588, P = 0,1753 (NS).....143

FIGURA 50. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺ CD28⁻ no grupo IRC. Números de pares XY = 9, r = -0,01182, P = 0,9759 (NS).....143

FIGURA 51. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD62L⁺ do grupo NI. Números de pares XY = 13, r = -0,4345, P= 0,1379 (NS).....145

FIGURA 52. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD62L⁺ do grupo HCV. Números de pares XY = 30, r = -0,3795, P= 0,0386.....145

FIGURA 53. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺CD62L⁺ do grupo IRC. Números de pares XY = 9, r = 0,04914, P= 0,9001 (NS).....145

FIGURA 54. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NK. Números de pares XY = 14, r = -0,3600, P= 0,2061 (NS).....147

FIGURA 55. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NK. Números de pares XY= 30, r = 0,4945, P=0,0055.....147

FIGURA 56. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NK. Números de pares XY= 9, r = -0,1552, P= 0,6901 (NS).....147

FIGURA 57. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NKT. Números de pares XY = 12, r = -0,3972, P= 0,2011 (NS).....149

FIGURA 58. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NKT. Números de pares XY = 29, r = -0,1537, P= 0,4261 (NS).....149

FIGURA 59. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e NKT. Números de pares XY = 9, r = -0,1093, P= 0,7796 (NS).....149

FIGURA 60. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺HLA-DR⁺. Números de pares XY = 13, r = 0,4166, P= 0,1567 (NS).....151

FIGURA 61. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺HLA-DR⁺. Números de pares XY = 31, r = 0,7221, P<0.0001.....151

FIGURA 62. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺HLA-DR⁺. Números de pares XY = 9, r = 0,6603, P= 0,05.....151

FIGURA 63. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD38⁺. Números de pares XY = 13, r = 0,1501, P= 0,6245 (NS).....153

FIGURA 64. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD38⁺. Números de pares XY = 29, r = 0,1775, P= 0,3571 (NS).....153

FIGURA 65. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD38⁺. Números de pares XY = 9, r = 0,03860, P= 0,9215 (NS).....153

FIGURA 66. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 13, r = 0,5102, P= 0,0748 (NS).....155

FIGURA 67. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 31, r = 0,6587, P<0.0001.....155

FIGURA 68. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 9, r = -0,1009, P= 0,7963 (NS).....155

FIGURA 69. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD62L⁺. Números de pares XY = 13, r = 0,1753, P= 0,5667 (NS).....157

FIGURA 70. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD62L⁺. Números de pares XY = 31, r = -0,6430, P<0.0001.....157

FIGURA 71. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD62L⁺. Números de pares XY = 9, r = 0,1651, P= 0,6713 (NS).....157

FIGURA 72. Resumo dos parâmetros imunológicos que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC em relação ao grupo controle não infectado (grupo controle).....167

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Fatores de risco identificados para a transmissão do HCV em 20/32 pacientes portadores de hepatite C crônica.....79

TABELA 2 - Anticorpos monoclonais específicos de superfície celular, para identificação de populações e de subpopulações81

TABELA 3 – Volume de anticorpos monoclonais específicos de superfície celular adicionado aos tubos.....

TABELA 4 - Análise descritiva dos dados das populações de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺.....106

TABELA 5 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD4⁺108

TABELA 6 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD8⁺112

TABELA 7 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos CD28⁻ entre os linfócitos CD4⁺120

TABELA 8 - Análise descritiva dos dados de intensidade de fluorescência de CD18 em monócitos.....127

TABELA 9 - Análise descritiva dos dados de intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos CD8⁺136

ABREVIATURAS

aa - aminoácidos

ADCC – *Antibody dependent cellular cytotoxicity* ou citotoxicidade celular dependente de anticorpo

ALT - alaninaminotransferase

APC - *antigen-presenting cell* ou células apresentadoras de antígeno

CD – *cluster of differentiation* ou grupo de diferenciação

E - região estrutural

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Assay*

HBV – *Hepatitis B virus* ou vírus da hepatite B

HCV - *Hepatitis C virus* ou vírus da hepatite C

HIV – *Human immunodeficiency virus* ou vírus da imunodeficiência humana

HLA – *Human leukocyte antigen* ou antígenos de leucócitos humanos

IL - interleucina

IFN – interferon

LTa - linfócito T auxiliar ou *helper*

LTc – linfócito T citotóxico

MHC – *Major Histocompatibility Complex* ou complexo maior de histocompatibilidade

NK - *natural killer* ou matadora natural

nm - nanômetro

NS - região não-estrutural

PBS - *Phosphate-buffered saline* ou solução salina tamponada com fosfato

RNA – *Ribonucleic acid* ou ácido ribonucleico

TCR – *T cell receptor* ou receptor de células T

TGF – *Tumoral grow factor* ou fator de crescimento tumoral

TNF - *Tumoral necrosis factor* ou fator de necrose tumoral

RESUMO

RESUMO

A história natural da hepatite C crônica varia de lesões mínimas à cirrose. Além disso, a infecção pelo HCV permanece freqüente em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise, com progressão lenta. Fatores virais e do hospedeiro envolvidos na patogênese da doença crônica estão sob investigação. Este estudo teve por objetivo avaliar a resposta imune através da análise da freqüência de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico, a expressão de moléculas de ativação e co-estimuladoras, o potencial migratório e a correlação entre a população de linfócitos T de indivíduos com hepatite C crônica. Para a análise, subpopulações leucocitárias foram avaliadas por citometria de fluxo antes do tratamento. Três grupos foram incluídos: portadores crônicos do vírus da hepatite C (grupo HCV, n=32), portadores crônicos do vírus da hepatite C com insuficiência renal crônica em hemodiálise (grupo IRC, n=9) e controles não infectados (grupo NI, n=14). Os resultados demonstraram que as freqüências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados (HLA-DR⁺) e da fração de linfócitos T CD4⁺ CD28⁻ foram superiores nos grupos HCV e IRC comparados ao grupo NI. A expressão de CD18 em eosinófilos, monócitos, neutrófilos e linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi menor nos grupos HCV e IRC em relação ao grupo NI, bem como CD62L em neutrófilos, mas não em eosinófilos e linfócitos. Apesar da ausência de diferenças, nos três grupos, na freqüência de populações e subpopulações majoritárias de leucócitos do sangue periférico, a análise de subpopulações celulares permitiu identificar características fenotípicas distintas entre os grupos HCV e IRC, o

que pode contribuir para o entendimento das diferenças imunopatogênicas. Fração inferior de monócitos CD62L⁺ foi observada somente no grupo IRC. Houve correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD4⁺HLA-DR⁺ nos grupos HCV e IRC. Além disso, mais quatro correlações foram observadas no grupo HCV, como a correlação direta entre CD8⁺HLA-DR⁺ e NK, reforçando a hipótese de maior dano tissular nesses indivíduos, junto com a correlação inversa entre HLA DR⁺ e a expressão de CD62L⁺ em linfócitos T CD4 e CD8, um marcador fenotípico de ativação contínua e persistente, que não foi observado no grupo IRC. Em conclusão, nossa análise de marcadores fenotípicos envolvidos em eventos de ativação, co-estimulação e migração celular permitiu identificar um perfil imune de caráter inflamatório misto na infecção crônica pelo vírus C, com componentes da imunidade inata e adaptativa.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C

O agente etiológico da hepatite pós-transfusional não-A não-B, reconhecida desde a década de 70, permaneceu desconhecido até 1989, a despeito da identificação dos agentes causadores das hepatites virais A e B havia mais de três décadas (Prince *et al.*, 1974; Feinstone *et al.*, 1975; Knodell *et al.*, 1975). Descrita inicialmente como uma doença leve, os estudos posteriores demonstraram que a hepatite pós-transfusional não-A não-B é doença de alta morbidade, com tendência à evolução para a cronicidade, para a cirrose e a insuficiência hepática (Houghton, 1996).

Em 1989, o genoma do vírus da hepatite não-A não-B foi decifrado por técnicas de biologia molecular (Choo *et al.*, 1989), a partir de amostras colhidas de chimpanzés experimentalmente infectados com o concentrado de fator VIII humano, e foi denominado vírus da hepatite C (HCV). A detecção de anticorpos circulantes comprovou tratar-se do principal vírus responsável pelas hepatites agudas pós-transfusionais não-A não-B (Kuo *et al.*, 1989, Hino *et al.*, 1994) e, em seguida, essa doença passou a ser reconhecida como hepatite C.

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, de pequeno tamanho, variando de 30 a 80nm. Sua estrutura genômica é constituída por um

envelope lipídico contendo RNA de fita simples no seu interior, com uma cadeia de 9.379 a 9.481 nucleotídeos (van der Poel, 1994). A região estrutural, na região amino-terminal, com 191 aminoácidos (aa), contém o *core*, que codifica as proteínas (p22) responsáveis pela formação dos nucleocapsídios internos que envolvem o genoma. Duas regiões estruturais E1 e E2, com 192aa e 367aa, respectivamente, codificam glicoproteínas (gp33 e gp70) que formam o envelope lipídico, e seis regiões não-estruturais na região carboxi-terminal (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a e NS5b), responsáveis pela replicação viral, codificação da proteinase/helicase, e a RNA polimerase RNA-dependente, margeadas por duas regiões não-codificadoras, 5' com 324 a 341 nucleotídeos e 3' com 27 a 55 nucleotídeos (5' e 3' UTR) altamente conservadas, com 92% de identidade da seqüência entre diferentes variantes genéticas.

A região 5' UTR possui um sítio de entrada interno do ribossomo (IRES), onde tem início a tradução dos genes do genoma do vírus (Penin *et al.*, 2004). Sua principal janela de leitura aberta (ORF) codifica uma poliproteína de 3.011 aminoácidos (Choo *et al.*, 1990) que é processada por proteases celulares e virais para produzir proteínas estruturais e não estruturais. No total são produzidas 10 proteínas funcionais (FIG. 1).

O HCV apresenta acentuada variabilidade genômica, que parece estar associada, em parte, à baixa fidelidade da RNA polimerase. Comparando-se seqüências de nucleotídeos de genomas de HCV isolados em diversas partes do mundo, observaram-se diversos tipos virais que se diferenciam em até 35% no seu genoma (Simmonds *et al.*, 1993a; Simmonds *et al.*, 1993b). Com base

na similaridade das seqüências de nucleotídeos, o HCV foi classificado em seis grandes grupos genéticos, denominados genótipos, que são numerados com algarismos arábicos na ordem de sua descoberta (Simmonds *et al.*, 1993a). Outros autores classificaram o HCV em mais grupos.

Os genótipos 1 a 6 são os mais freqüentemente encontrados, sendo que alguns genótipos englobam vários subtipos relacionados: 1a, 1b, 2a, 2b, etc. (McOmish *et al.*, 1994; Forns *et al.*, 1999). As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da seqüência de nucleotídeos entre 76,9 e 80,1%) foram denominadas subtipos, que são indicados por letras. Dentro de cada subtipo foi observado um complexo de variantes genéticas que apresentam heterogeneidade da seqüência de nucleotídeos de 1,0 a 9,2%. Essas variantes foram denominadas *quasispecies* e parecem resultar de mutações acumuladas durante a replicação viral no curso da infecção (Zein *et al.*, 1996; Forns *et al.*, 1999; Bowen e Walker, 2005).

Os vários genótipos circulantes apresentam uma significativa variação geográfica da freqüência com que são observados (McOmish *et al.*, 1994). Apesar de os genótipos 1, 2 e 3 apresentarem distribuição mundial, a prevalência relativa destes varia entre as diversas regiões geográficas. Assim, o genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire, o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia (McOmish *et al.*, 1994; Busek e Oliveira, 2003). No Brasil, o genótipo mais freqüente é o 1, seguido do genótipo 3 (Oliveira *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2002; Busek e Oliveira, 2003).

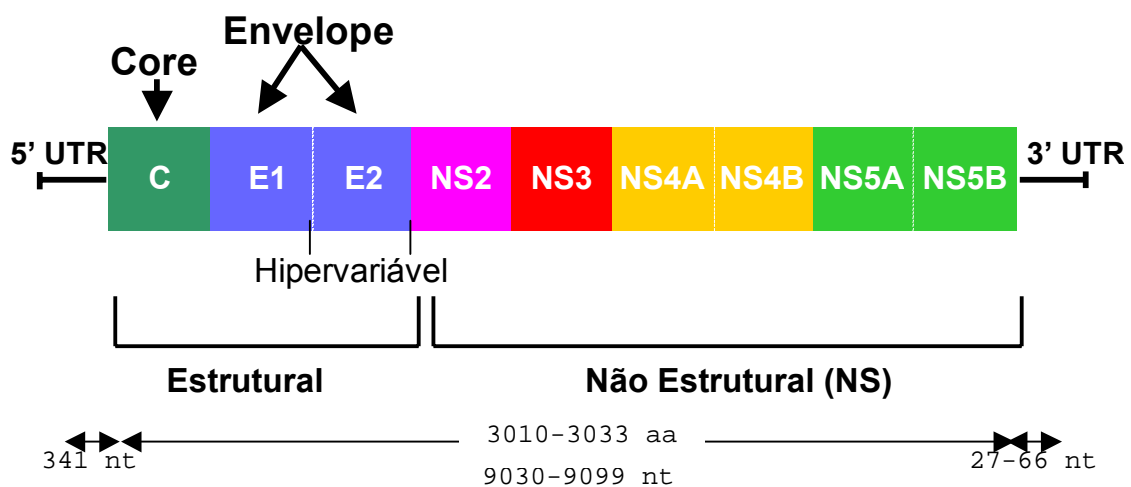


FIGURA 1 – Representação esquemática da organização genética do genoma do HCV. Na posição 5' existem os genes estruturais e na posição 3' os não-estruturais.

A doença

A hepatite C tem distribuição mundial e representa um dos maiores desafios para a saúde pública no atual milênio. Até 1998, registravam-se aproximadamente 170 milhões de pessoas portadoras do HCV no mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 1998; World Health Organization, 1999), mas atualmente as cifras já superam esse valor. Assim, estimam-se em 200 milhões os portadores do HCV, ou cerca de 3% da população mundial infectados por esse vírus (Wasley e Alter, 2000).

As potenciais complicações graves da hepatite C crônica, como a cirrose hepática descompensada e o carcinoma hepatocelular, o elevado custo do tratamento, a limitada eficácia terapêutica dos medicamentos atuais e a marginalização dessa doença nas políticas públicas na maioria dos países subdesenvolvidos podem indicar um panorama sombrio da hepatite C nos próximos decênios.

A transmissibilidade da hepatite viral por produtos sanguíneos é reconhecida há décadas. Contudo, somente a partir da sua identificação, em 1989, e, em seguida, do desenvolvimento do ensaio sorológico para a detecção de anticorpos circulantes contra esse vírus (Kuo *et al.*, 1989), é que se ampliaram os conhecimentos a respeito da epidemiologia, transmissão e fatores de risco para a aquisição da hepatite C. Mais recentemente, informações adicionais oriundas de estudos clínicos sustentam a hipótese de que a hepatite C é a principal causa de doença hepática crônica em todo o mundo e fornecem as

bases para a maior compreensão das implicações globais dessa epidemia mundial silenciosa.

A transmissão do HCV ocorre primariamente pela exposição parenteral direta ao sangue contaminado. A prevalência tem relação com o maior ou menor risco de exposição aos fatores de risco. Portanto, os grupos populacionais com repetidas exposições aos produtos sanguíneos, como os usuários de drogas endovenosas, os portadores de hemoglobinopatias ou coagulopatias que requerem múltiplas transfusões durante a vida e os pacientes portadores de insuficiência renal crônica sob tratamento renal substitutivo em hemodiálise apresentam as maiores chances de adquirir a infecção. São ainda incluídos como grupos de risco os pacientes que receberam transplantes de órgãos, principalmente antes de 1992, e os profissionais de saúde. Contudo, estudos têm revelado que em muitos casos não são reconhecidos os fatores ou a provável via de transmissão do HCV, sugerindo a possibilidade de outras vias de transmissão, como a sexual ou a exposição domiciliar, por exemplo, hipóteses essas não universalmente aceitas.

Os estudos de prevalência da hepatite C de base populacional são ainda restritos a algumas partes do mundo e apresentam grande variação em regiões geográficas distintas. Baixas prevalências têm sido relatadas no Reino Unido e Escandinávia (0,01 a 0,1%), e prevalências ligeiramente mais altas ocorrem nas Américas, Europa Ocidental, Austrália, Nova Zelândia e África do Sul (0,2% a 0,5%). Prevalências intermediárias (1% a 5%) são reportadas no Leste Europeu, no Mediterrâneo e na Índia, enquanto as maiores prevalências têm

sido observadas no Egito (51%) e no Gabão (22%) (Memon e Memon, 2002). Na Itália há indícios de alta prevalência, 14% e 26%, como demonstrado em dois estudos (Guadagnino *et al.*, 1997; Osella *et al.*, 1997), bem como no Paquistão (6,5%) (Luby *et al.*, 1997) e em comunidades aborígenes de Taiwan (17%) (Memon e Memon, 2002). Nos Estados Unidos, estima-se que de 0,1% a 1,8% da população geral sejam portadores do vírus C (Alter *et al.*, 1999).

No Brasil, segundo informações do relatório da Sociedade Brasileira de Hepatologia (1999), os estudos de prevalência em candidatos a doação de sangue, através do teste de triagem anti-HCV, demonstram variações entre as regiões brasileiras. A menor prevalência foi observada na região Sul (0,65%), enquanto prevalências moderadas foram encontradas nas regiões Centro-Oeste (1,04%), Nordeste (1,19%) e Sudeste (1,43%). Alta prevalência foi reportada na região Norte (2,21%).

A infecção aguda acomete pessoas de todas as idades e raças, porém apresenta um pico de incidência entre os 20 e os 49 anos de idade, com predomínio do sexo masculino (CDC, 1998; Cheney *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2003). Os usuários de drogas endovenosas constituem, na atualidade, os principais casos de hepatite C aguda, contribuindo para 38% de todos os novos casos (Alter, 1997).

Considerando-se que a doença hepática causada pela hepatite C progride lentamente e não resulta em maior morbidade durante vários anos, a magnitude das conseqüências da infecção crônica pode estar apenas

começando a ser reconhecida (Davis *et al.*, 2003). Recentemente, foi feita uma revisão da duração provável da infecção em 172 pacientes portadores de hepatite C crônica e verificou-se que 89% relataram um tempo estimado de infecção entre 10 e 30 anos, enquanto apenas 19 (11%) informaram mais de 30 anos de aquisição do vírus C (Souza *et al.*, 2004).

O diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C é baseado na detecção de anticorpos em sangue periférico (anti-HCV) e confirmado com testes moleculares qualitativos que informam a presença do RNA viral na amostra (Pawlotsky, 2002). O HCV RNA torna-se detectável uma a duas semanas após a infecção e, portanto, pode ser útil para o diagnóstico precoce da infecção aguda, já que a sorologia pode permanecer negativa por mais de seis semanas após a infecção (Neng Lai, 2001). Este período de soroconversão pode ser maior em pacientes em hemodiálise, porque esses pacientes são imunossuprimidos (Lok *et al.*, 1993). Na hepatite crônica, um único exame negativo pode significar período intermitente de baixa replicação viral. Contudo, essa possibilidade fica mais remota a partir dos testes atuais de alta sensibilidade. Além de sua aplicação como teste confirmatório, os testes baseados na PCR poderão ser solicitados para confirmar ou excluir a presença do HCV na hepatite aguda ou fulminante, em recém-nascidos de mães portadoras de hepatite C e para diagnosticar a infecção em imunossuprimidos.

Os testes atualmente disponíveis utilizam, em geral, a metodologia de amplificação do genoma viral pela técnica de RT-PCR (transcrição reversa do genoma seguida de amplificação do cDNA formado por reação em cadeia da

polimerase). Alguns métodos realizam um ciclo adicional de amplificação (*nested-PCR*), que aumenta significativamente a especificidade e a sensibilidade da técnica do PCR original (Specter, 1999).

Diversos métodos de RT-PCR *in house* (desenvolvidos pelos próprios laboratórios de análise) têm sido descritos, dificultando a padronização da metodologia. Contudo, testes padronizados estão disponíveis comercialmente para a detecção qualitativa do RNA do HCV. O Amplicor[®] (Roche Diagnostic) é um dos mais utilizados na prática e apresenta limite de detecção de 50IU/ml e especificidade de 97 a 99% (Gretch, 1997). Existem ainda testes moleculares que detectam a quantidade de RNA viral do HCV (ou a carga viral) no soro ou no plasma, sendo, portanto, uma estimativa das taxas de replicação viral ou da eliminação do vírus pelo hospedeiro.

A genotipagem é clinicamente importante na abordagem clínica dos pacientes portadores de hepatite C crônica. As distintas variantes genômicas do HCV apresentam diferentes respostas à terapia antiviral.

Duas drogas estão disponíveis atualmente para o tratamento da hepatite C, em uso combinado, o interferon alfa e a ribavirina. O interferon induz a um estado antiviral inespecífico e a efeitos imunomoduladores, entretanto o papel destas ações no clareamento viral sustentado permanece desconhecido. A ribavirina é um análogo sintético da guanósina e, adicionada ao interferon alfa, melhora significativamente as taxas de erradicação viral (Pawlotsky, 2006). A utilização da ribavirina em monoterapia leva a uma redução moderada e transitória na

replicação viral, em 50% dos pacientes, mas insuficiente para explicar a ação em longo prazo (Pawlotsky *et al.*, 2004).

Características da resposta imune em portadores de hepatite C

O termo imunidade é derivado de *immunitas*, que se referia à isenção de vários deveres cívicos e processos legais concedida aos senadores romanos. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune, e sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substância estranha no organismo é denominada resposta imune.

Após a infecção, diversos mecanismos da resposta imune são desencadeados com o objetivo de controlar a infecção (FIG. 2).

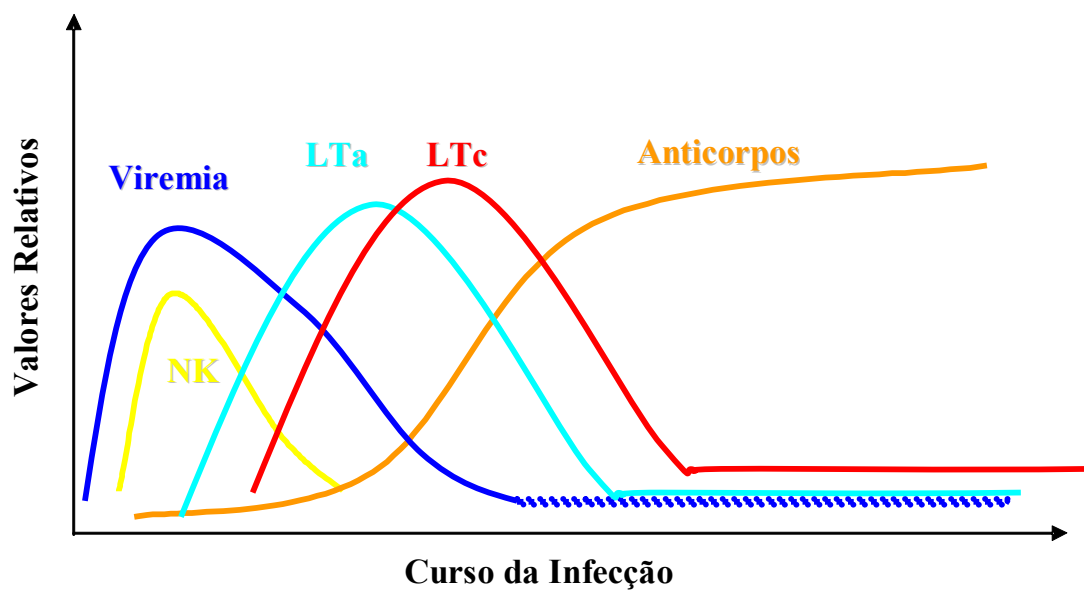


FIGURA 2 – Esquema de resposta imune durante uma infecção viral¹, onde NK, LTa e LTc são, respectivamente, linfócitos NK, T auxiliares e T citotóxicos.

¹ As figuras 2 (PÁG. 39), 3 (PÁG.43), 4(PÁG.45) e 5(PÁG.47) foram adaptadas de ABBAS, A.K. **Imunologia Celular e Molecular**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2002. 544p.

A infecção de uma célula hospedeira permite a replicação viral intensa, favorecendo o aparecimento de viremia e subsequente ativação do sistema imune do hospedeiro. Um dos mecanismos imunológicos desencadeados consiste na produção de interferon (IFN) alfa e beta, que atuam na ativação de mecanismos protetores da infecção de células adjacentes, além de substâncias com ação antiviral direta, como a proteína quinase, que inibe a síntese de proteínas, e a 2'5' oligoadenilato sintetase envolvida na degradação do genoma viral (Janeway e Medzhitov, 2002). Dois dias após a infecção, mecanismos da imunidade inata já podem ser evidenciados no organismo hospedeiro, incluindo a atividade de células fagocíticas e a ativação de linfócitos *natural killer* (NK) ou matadoras naturais (Freemant *et al.*, 2001), sendo que a ausência ou redução da atividade desses linfócitos pode levar à maior suscetibilidade à infecção viral.

Uma das principais contribuições dos linfócitos NK consiste na produção de IFN-gama (Agrati *et al.*, 2002), codificado por um único gene no cromossomo 12, importante tanto para a ativação de outras células NK, macrófagos apresentadores de antígeno e linfócitos B, como de elementos da imunidade adaptativa, a exemplo dos linfócitos T. Os linfócitos se compõem de distintas subpopulações, que diferem nas suas funções e produtos, porém são morfológicamente idênticos.

Proteínas de membrana podem ser usadas como marcadores fenotípicos para distinguir populações de linfócitos. Esses marcadores são denominados CD, sigla que indica o grupo de diferenciação (do inglês *cluster of differentiation*) e

refere-se a uma molécula reconhecida por um grupo ou coleção de anticorpos monoclonais (Zola, 2001).

À medida que a infecção viral progride, essas respostas imunes específicas são ativadas, com o aparecimento de linfócitos T auxiliares (LTa CD4⁺), anticorpos secretados por linfócitos B (LB) e a expansão de clones de células T citotóxicas (LTc CD8⁺) (Chang, 2003). A ligação seletiva do CD4 às moléculas do MHC de classe II e do CD8 às de classe I assegura que as células T CD4⁺ reconheçam e respondam aos antígenos peptídicos associados à classe II e que as células T CD8⁺ respondam aos peptídeos associados à classe I (Bowen e Walker, 2005).

Os anticorpos produzidos contra proteínas virais podem apresentar especificidades variadas, porém aqueles contra glicoproteínas do envelope ou capsídeo viral ou da membrana da célula infectada são os mais importantes no controle da infecção. A ativação do sistema do complemento mediada por anticorpos pode levar à destruição da célula infectada, desde que haja uma grande concentração de antígenos virais expressos em sua membrana plasmática. Além disso, mecanismos de neutralização da partícula viral e citotoxicidade mediada por anticorpos podem estar presentes durante a infecção.

Os linfócitos T exibem uma grande variedade de funções na resposta imune à infecção viral (FIG. 3). Essas células podem ser identificadas pela presença de receptores de superfície celular, denominados receptores de células T (TCR) e

subdivididas em duas principais populações em função do tipo de TCR que apresentam: $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Os linfócitos T $\alpha\beta$ representam cerca de 95% dos linfócitos circulantes e possuem funções distintas, determinadas pelo tipo de marcador de superfície celular que apresentam. Os LT que possuem o marcador CD4 são capazes de interagir com moléculas de MHC de classe II, presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno, e possuem uma função auxiliar na montagem da resposta imune, através da síntese de citocinas (Bowen e Walker, 2005). Duas subpopulações principais de LTA podem ser identificadas em função do padrão de citocinas que elas secretam: LTA1 e LTA2 (Chang, 2003).

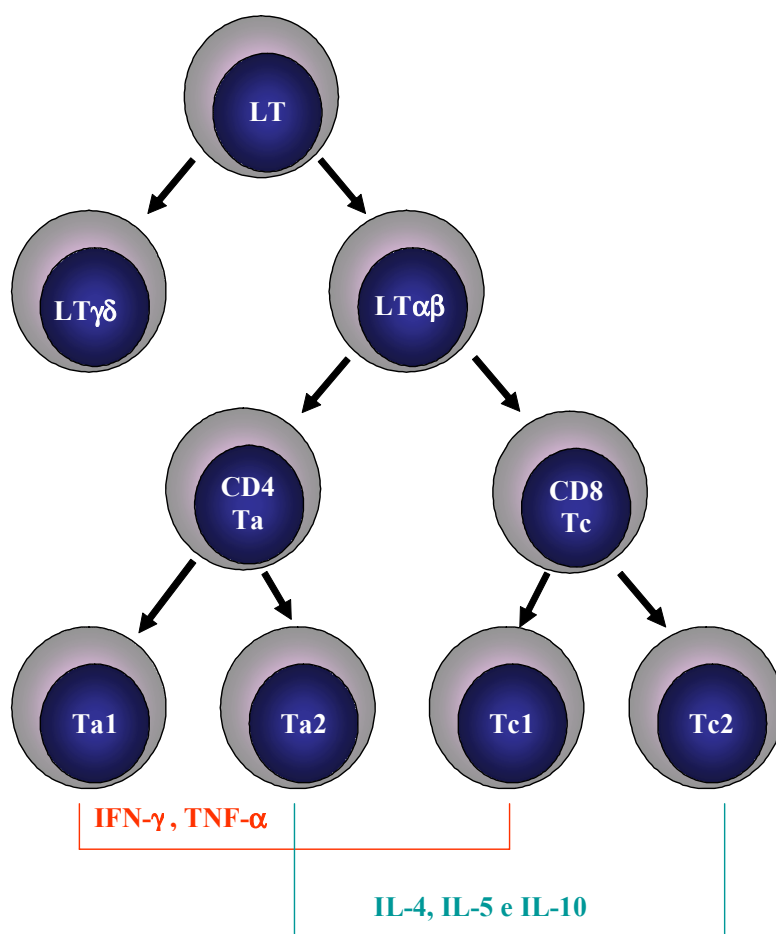


FIGURA 3 – Subpopulações funcionais de células T. As células T expressam o receptor de determinantes antigênicos das células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. Os linfócitos T $\alpha\beta$ são subdivididos em populações $CD4^+$ e $CD8^+$, que reconhecem, respectivamente, MHC de classe II e classe I. As células T $CD4^+$, denominadas LT auxiliares (LTa), e as células T $CD8^+$, denominadas LT citotóxicas (LTc), podem ainda ser subdivididas em tipo 1 e tipo 2, com base no perfil das citocinas que secretam.

Os linfócitos T citotóxicos CD8⁺, capazes de interagir com moléculas de MHC de classe I, presentes em todas as células nucleadas do corpo humano, são os principais sistemas de vigilância contra os vírus. São uma resposta eficiente e seletiva na maioria das infecções virais, focalizando o local de replicação viral e destruindo a célula infectada (Chang, 2003). Esse tipo de linfócito T também pode apresentar funções distintas durante a resposta imune e se divide em duas populações: LTc1 e LTc2.

De um modo geral, os linfócitos T do tipo 1 (LTa1) secretam principalmente citocinas, IFN-gama e TNF-alfa, ativadoras de mecanismos da imunidade celular, como a fagocitose e a citotoxicidade (FIG. 4).

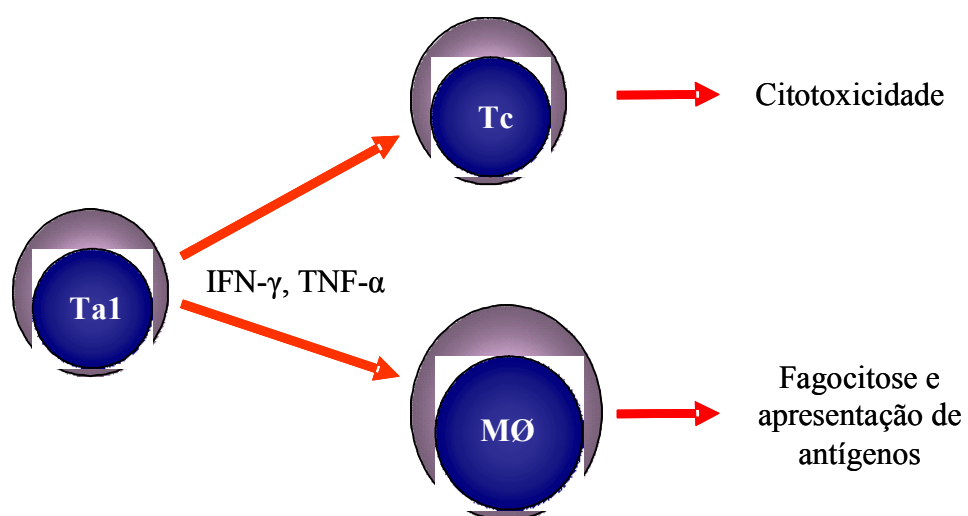


FIGURA 4 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos Ta1. Linfócitos Ta1 secretam citocinas ativadoras de mecanismos efetores da imunidade celular, incluindo a citotoxicidade de LTc e a internalização e apresentação de antígeno por células fagocíticas.

Por outro lado, os linfócitos T do tipo 2 (LTa2), estimulados por células apresentadoras de antígeno, secretam citocinas, IL-4, IL-5 e IL-10, que, em associação com moléculas co-estimuladoras, favorecem mecanismos da imunidade humoral antígeno-específicos (FIG. 5).

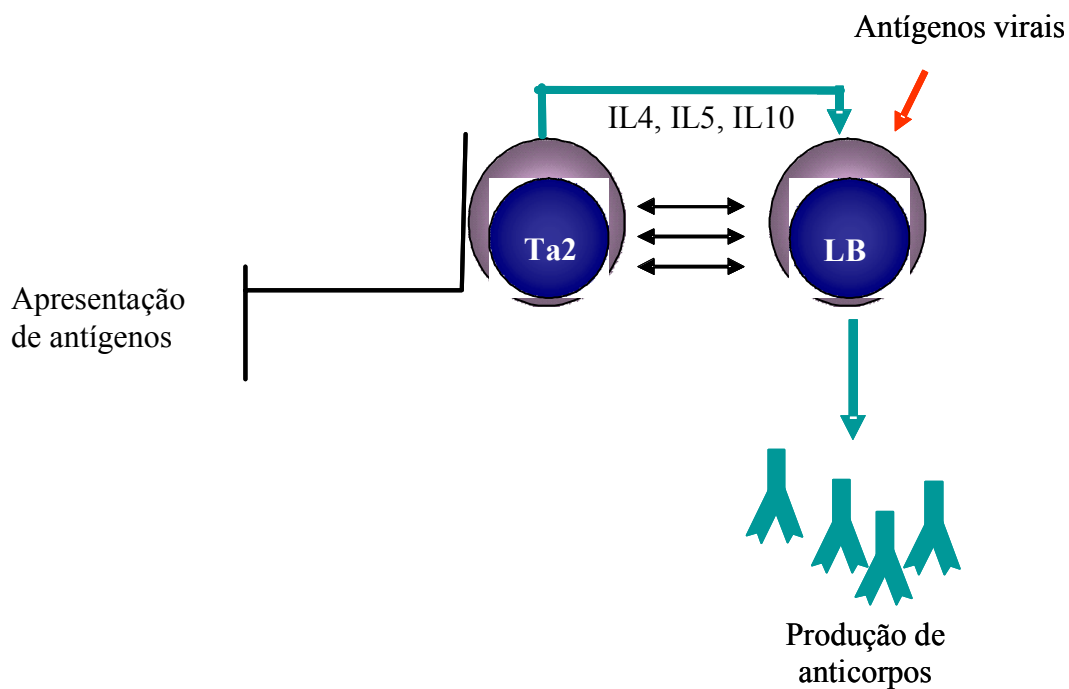


FIGURA 5 – Aspectos gerais das funções dos linfócitos Ta2. As células T auxiliares (Ta) são estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos, produzem citocinas que favorecem a ativação B para a produção de anticorpos. As células B interagem com os LTa através de moléculas co-estimuladoras presentes na superfície celular, fornecendo sinais adicionais fundamentais para a ativação celular.

É importante ressaltar que certos vírus desenvolvem mecanismos que interferem no seu reconhecimento pelo sistema imune. Proteínas virais mutadas imunogenicamente dominantes representa uma das principais estratégias de evasão que, além de dificultar o desenvolvimento de vacinas e de proteção duradoura contra novas infecções, favorece a persistência de infecções crônicas. Além das mutações virais e formação de *quasispecies* (Forns *et al.*, 1999; Bowen e Walker, 2005), os vírus podem interferir na ativação do complemento, na produção de anticorpos, na síntese de IFN-alfa e beta; podem também inibir o transporte de moléculas MHC de classe I para a membrana da célula infectada, além de codificar proteínas com homologia estrutural com receptores de superfície celular e/ou citocinas e seus receptores.

Vários co-fatores estão implicados no desenvolvimento e evolução mais grave da infecção crônica pelo HCV, incluindo a idade do paciente por ocasião da infecção - em geral, os pacientes que adquirem a doença em idade mais avançada apresentam evolução mais rápida para cirrose, enquanto a progressão é mais lenta em pacientes jovens; alcoolismo - os estudos atuais demonstram que o álcool é um importante co-fator na progressão da hepatite crônica para cirrose; co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) ou o vírus da hepatite B (HBV) e o estado imunológico (NIH, 2002).

Asanza *et al.* (1997) correlacionaram o grau de lesão hepática com a expressão intra-hepática de moléculas envolvidas na resposta imune com o

emprego da imunohistoquímica. Elevado número de linfócitos T citotóxicos ativados foram encontrados no foco inflamatório, e esse número está associado com o grau de lesão hepática, mas não correlacionado com o nível de viremia. Tal fato chama a atenção para o importante papel do sistema imune na patogênese da infecção pelo HCV, sugerindo uma natureza imunopatológica para dano hepático em pacientes infectados.

Nesse contexto, o sistema imune do hospedeiro parece desempenhar, na verdade, um papel duplo: participa tanto da limitação da replicação do HCV como do estabelecimento da lesão tecidual observada na doença hepática relacionada à infecção pelo vírus (Cheney *et al.*, 2000; Pawlotsky, 2004; Shoukry *et al.*, 2004). Estudos sobre os mecanismos imunológicos desencadeados durante a infecção crônica pelo HCV demonstram que o perfil da resposta imune celular, em particular o perfil de citocinas produzidas durante a infecção, parece estar envolvido com a lesão hepatocelular, podendo ser um fator determinante, relacionado com a cronificação da doença e a resistência ao tratamento antiviral (Cacciarelli *et al.*, 1996; Edwards-Smith *et al.*, 1999).

Os fatores imunológicos que determinam o desenvolvimento de uma infecção crônica pelo HCV ainda não estão bem esclarecidos. Recentemente, a evolução da hepatite B e da imunodeficiência humana adquirida foi relacionada com o polimorfismo de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), determinado pelos antígenos de leucócitos humanos (HLA). O polimorfismo dessas moléculas de MHC teria um impacto

direto nas funções do sistema imune, considerando-se a sua importância no processo de apresentação de antígeno para os linfócitos T, ambos CD4⁺ e CD8⁺. Haruna *et al.* (2000), estudando o perfil de expressão de moléculas de MHC de classe II (HLA-DR) em pacientes com hepatite C crônica, demonstraram que a necrose em saca-bocado, o infiltrado linfocitário portal, os níveis de lesão ductal e a viremia estão diretamente associados a haplotipos específicos do HLA DRB1. Isso sugere que muitos fenômenos histopatológicos que ocorrem na hepatite C crônica são causados por reações imunomediadas pelos haplotipos do HLA. Estudos de Mangia *et al.* (1999) demonstraram ainda a predominância do alelo HLA DQB1 em pacientes cirróticos com doença rapidamente progressiva, enquanto os haplotipos HLA DRB1 estavam presentes como um fator que favorece a eliminação do HCV, conferindo proteção contra a evolução crônica dessa infecção. Não obstante, é ainda incerto o papel do polimorfismo do HLA no estabelecimento das lesões pela infecção crônica pelo HCV (Kuzushita *et al.*, 1998). Postula-se que outros mecanismos de defesa imunológica ainda não bem esclarecidos possam estar envolvidos na resposta imune à infecção pelo HCV.

O papel da imunidade inata na hepatite C, com o envolvimento de polimorfonucleares, células NK, NKT e das linhagens fagocíticas, ainda não está totalmente elucidado, embora as células NK e NKT pareçam ter função significativa na resposta imune em relação aos patógenos hepatotrópicos, tais como o vírus da hepatite C (Freemann *et al.*, 2001). De acordo com Isagulants (2003), o hospedeiro responde precocemente à replicação viral por meio da resposta imune inata através da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais

como o IFN-gama e o TNF-alfa, que favorecem a ativação de células NK e NKT, bem como a atividade de apresentação de antígenos por fagócitos. A potência e eficácia da resposta inata parecem ser determinadas tanto por variáveis genéticas predisponentes como por variáveis adquiridas inerentes à complexidade de interações do sistema imune, que, em conjunto, são determinantes do repertório e do histórico imunológico do indivíduo.

As células NK, células-chave na resposta imune inata, são as células imunológicas predominantes no fígado humano, contribuindo para mais de 50% do *pool* linfóide total do fígado sadio (Doherty e O'Farrelly, 2000). As células NK não possuem receptores antígenos-específicos, mas podem detectar mudanças na expressão de glicoproteínas nas células-alvo. Essa atividade é controlada por receptores que medeiam a ativação, como o CD16. Moléculas da superfície das células NK se ligam com moléculas de classe I nas células-alvo, resultando tanto na ativação ou na inibição das células NK, sendo que o sinal inibitório exerce um efeito dominante sobre o ativador. A complexa interação entre as células NK e moléculas de histocompatibilidade da classe I permite uma rápida resposta a súbitas mudanças na expressão de MHC de classe I e a apresentação de antígenos, que pode ocorrer em tumores ou células infectadas por vírus. A vigilância imunológica a tumores, células metastáticas e infecções virais é o principal papel imunológico do fígado (Norris *et al.*, 2003).

Células NK constituem a primeira linha de defesa contra patógenos e usualmente tornam-se ativadas na fase inicial da infecção viral. O fígado é

particularmente rico em células NK, que são ativadas por vírus hepatotrópicos, como o HCV. A ativação das células NK exerce um papel essencial no recrutamento de células T e na eliminação de hepatócitos infectados (Ahmad *et al.*, 2004).

Em relação à resposta imune adaptativa, os linfócitos T auxiliares (LTa) são fundamentais na orquestração da imunidade celular contra patógenos intracelulares. Essas células reconhecem os peptídeos virais antigênicos ligados às moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe II na membrana das células apresentadoras de antígenos. Os LTa também desempenham papel fundamental na ativação dos linfócitos T citotóxicos, responsáveis pela eliminação das células infectadas por vírus e, em conjunto, produzem citocinas que podem inibir a replicação viral. As respostas dos LTa aos diferentes antígenos virais, incluindo o do *core*, estão associadas a uma evolução benigna da infecção pelo vírus da hepatite C (Lasarte *et al.*, 1998).

É importante salientar que a reatividade imunológica celular do hospedeiro, incluindo tanto os LTa (CD4⁺) quanto os LTc (CD8⁺), encontra-se ativada em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (Naveau *et al.*, 1999). A patogenia da hepatite C parece estar relacionada à intensidade da resposta dos linfócitos T na fase inicial da infecção, a qual pode ser crítica na evolução da doença. A resposta inicial à infecção pelo HCV é uma defesa imune não-específica por macrófagos, atividades celulares citotóxicas de células NK e produção de interferons. Subseqüentemente, a resposta imune específica, adaptativa, consiste em mecanismos imunológicos clássicos descritos para

infecções virais. Como mencionado anteriormente, nesse tipo de resposta imune, linfócitos T CD4⁺ reconhecem antígenos virais ligados a moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) da classe II. Linfócitos Ta1 favorecem a ativação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ específicos, enquanto linfócitos Ta2 induzem a proliferação de linfócitos B específicos e a produção de anticorpos anti-HCV (Papatheodoridis *et al.*, 1999; Koziel, 2006).

Os linfócitos T CD8⁺ são fundamentais na evolução da infecção aguda pelo HCV. Durante os primeiros seis meses da infecção, a citotoxicidade direta mediada por linfócitos T CD8⁺ contra múltiplos epitopos de diferentes regiões estruturais ou não-estruturais do HCV pode favorecer um caráter autolimitante da infecção pelo HCV (Grüner *et al.*, 2000), desde que ocorra uma significativa resposta de LT CD4⁺ contra proteínas das regiões NS3 e NS4. Em todas as infecções autolimitadas, mais importante que o genótipo viral, o principal fator diferencial seria a habilidade do hospedeiro de estabelecer precocemente uma resposta mediada por LTa1 a pelo menos uma proteína viral.

Cerca de 66% dos pacientes que evoluem para a forma crônica não respondem com um padrão de resposta Ta1 a qualquer proteína viral. Nessa forma evolutiva, a presença de LTc CD8⁺ em pacientes com resposta antiviral de células CD4⁺ torna a replicação viral fraca ou ausente (Gerlach *et al.*, 1999). A hierarquia da responsividade das células CD4⁺ às proteínas do HCV é representada pela proteína do *core*, sendo esta a mais imunogênica, seguida pela NS4 (Diepolder *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1997). A persistência viral, a despeito de significativa proliferação de LT CD4⁺, pode estar relacionada à

observação de que, embora 40 a 80% das células CD4⁺ presentes no infiltrado inflamatório hepático expressem marcadores de ativação, apenas 1% dessas células são específicas para antígenos do HCV (Tsai *et al.*, 1997).

Os LTc, que reconhecem antígenos do HCV presentes na superfície dos hepatócitos infectados através de MHC da classe I, não atuam diretamente contra as células infectadas, mas secretam citocinas que evocam um ataque de células inflamatórias não-específicas. Essa observação remete à importância dos relatos de Asanza *et al.* (1997) sobre a natureza imunopatológica para dano hepático em pacientes infectados.

O papel dos linfócitos B e anticorpos anti-HCV na eliminação viral e na patogênese da infecção pelo HCV permanece também desconhecido (Papatheodoridis *et al.*, 1999). Apesar de estudos da imunidade humoral na infecção pelo HCV revelarem anticorpos para todos os antígenos virais, nenhum anticorpo confere imunidade para o HCV. Além disso, a queda dos níveis de anticorpos durante o tratamento com interferon alfa chama a atenção para o papel pouco relevante dos anticorpos no clareamento viral (Gerlach *et al.*, 1999). De fato, a maioria dos pacientes com anticorpos anti-HCV persiste com replicação viral ativa e com evidência de injúria hepática, o que sugere que os anticorpos não apresentam papel protetor (Esteban *et al.*, 1991). Entretanto, anticorpos E2-específicos podem estar envolvidos na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) contra células infectadas. Embora a ADCC contribua na facilitação do clareamento viral, esse mecanismo pode

também contribuir para a agressão hepatocelular, ilustrando o papel duplo do sistema imune na infecção pelo HCV (Schneiders *et al.*, 2000).

No contexto da resposta imune protetora, Gluck *et al.* (1997) concluíram que, além dos fatores virais, a intensidade da resposta imune do hospedeiro, ou seja, o elevado número de células CD8⁺ nos infiltrados linfocitários hepáticos, é fator preditivo de uma boa resposta ao tratamento com interferon. Os níveis de receptores hepáticos para IFN- α/β são também importantes, sendo que a resistência à terapia pode ser devida aos baixos níveis desses receptores (Yatsushashi *et al.*, 1999). Nelson *et al.* (1998) demonstraram ainda que, na infecção crônica pelo HCV, a presença de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ antígeno-específicos parece ter um papel importante para uma resposta completa ao tratamento, uma vez que em 78% dos pacientes que apresentavam linfócitos T citotóxicos (LTc) com atividade HCV-específicas obteve-se eficácia terapêutica, contra 10% de indivíduos que não apresentavam estes LTc antes do tratamento (Nelson *et al.*, 1998). Ballardini *et al.* (1995) demonstraram a presença de linfócitos CD8⁺ em contato com hepatócitos infectados e uma significativa correlação entre o número de células CD8⁺ e os níveis séricos da alaninaminotransferase (ALT), sugerindo um papel importante da citotoxicidade mediada por células T na gênese da lesão hepatocelular.

As citocinas atuam na defesa contra infecções virais tanto diretamente, através da inibição da replicação viral, quanto indiretamente, através da determinação do padrão predominante da resposta imune do hospedeiro.

Há evidências que suportam a hipótese de que, na infecção pelo HCV, o estabelecimento de um padrão de resposta imune com predomínio de citocinas do tipo 1 correlaciona-se com a erradicação da infecção aguda, uma vez que indivíduos que apresentam resposta predominante do tipo 2 tendem a apresentar persistência da infecção (Cheney *et al.*, 2000). Mesmo durante a infecção crônica, uma forte resposta de linfócitos T auxiliares do tipo 1 parece estar associada com componente inflamatório menos intenso e curso mais favorável da doença (Lechmann *et al.*, 1996; Woitas *et al.*, 1997). Entretanto, considerando a presença de um processo inflamatório contínuo na infecção crônica pelo HCV, as citocinas também podem contribuir para a lesão hepatocelular (Koziel, 1999). A compreensão dos padrões de resposta imune e de seus determinantes pode ser útil para explicar por que a maioria dos indivíduos infectados desenvolve hepatite crônica, enquanto outros apresentam evidência mínima de inflamação e alguns poucos conseguem erradicar a infecção (Fig. 6).

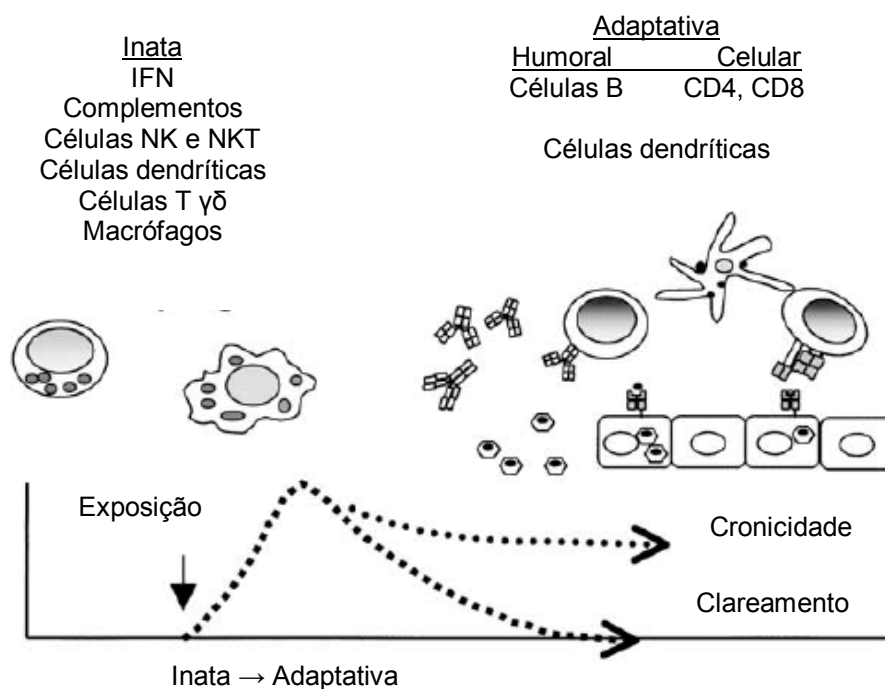


FIGURA 6. Componente de resposta imune antiviral. Com a infecção viral, numerosos mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados, iniciando com a resposta imune inata, seguida da adaptativa. A evolução da infecção é determinante da relação entre a resposta imune e o vírus (adaptado de Chang, 2003)

A produção de níveis inadequados de algumas citocinas parece contribuir para a persistência do vírus e, também, influenciar a resposta à terapia antiviral na infecção pelo HCV. Por exemplo, a quantidade de IL-10 produzida pode potencialmente influenciar a evolução da doença, uma vez que a IL-10 parece ser capaz de controlar a resposta imune antiviral do indivíduo (De Waal Malefyt, 1998). Observou-se que os níveis séricos de IL-10 e de outras citocinas do tipo 2 encontravam-se bastante elevados em pacientes com infecção crônica pelo HCV não tratados, quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que o desvio do perfil imunológico para um padrão do tipo 2 poderia comprometer a resposta imune do hospedeiro, resultando na infecção crônica pelo HCV (Cacciarelli *et al.*, 1996). Níveis séricos elevados de IL-10 também parecem estar associados com persistência da viremia e resistência à terapia antiviral com IFN- α (Fukuda *et al.*, 1996; Osna *et al.*, 1997).

Outra citocina que parece ser importante na infecção crônica pelo HCV é o TNF- α . Pacientes com infecção aguda e crônica apresentam níveis plasmáticos de TNF- α elevados quando comparados com indivíduos não infectados (Tilg *et al.*, 1992). Níveis séricos de TNF- α elevados previamente ao tratamento parecem estar associados com resistência ao IFN- α (Larrea *et al.*, 1996).

Níveis plasmáticos de TGF- β 1 encontram-se também elevados em pacientes com hepatite crônica pelo HCV (Shirai *et al.*, 1994). Demonstrou-se que a expressão do gene do TGF- β 1, medida pela concentração intra-hepática de RNA mensageiro da citocina, encontra-se significativamente aumentada em

pacientes com infecção crônica pelo HCV (Roulot *et al.*, 1995). Tsushima *et al.* (1999) observaram que os níveis plasmáticos de TGF- β 1 estão elevados em pacientes cronicamente infectados, previamente ao tratamento, e parecem predizer uma pior resposta ao tratamento com IFN- α . Ito *et al.* (1991) demonstraram a presença de níveis elevados de mRNA de TGF- β 1 em amostras de tecido hepático com hepatite crônica. Em estudo recente, Vidigal *et al.* (2002) observaram que pacientes que apresentaram os genótipos específicos da seqüência líder do gene do TGF- β 1 responderam mais freqüentemente ao tratamento antiviral com IFN- α e ribavirina.

Dessa forma, acredita-se que o balanço entre os padrões de resposta do tipo 1 e do tipo 2 pode ser fundamental na determinação da resposta imune eficaz. A resposta do tipo 1 na presença de um componente da resposta do tipo 2 como elemento modulador parece ser a chave para uma resposta imune antiviral não imunopatológica.

Características da resposta imune em portadores de insuficiência renal crônica (IRC) sob terapia renal substitutiva (TRS)

Okuda e Yokosuka (2004) publicaram uma coorte com 189 pacientes com anti-HCV positivo e em hemodiálise, acompanhados por mais de quatro anos, e concluíram que a infecção pelo HCV nesse grupo de pacientes possui uma história natural distinta daqueles com função renal preservada, caracterizada

pela atividade menos intensa de doença e menos progressão para a cirrose, o que tem sido atribuído às diferenças imunológicas desse grupo específico de pacientes.

Em um estudo clássico da resposta imune celular e humoral (Giacchino *et al.*, 1982), os autores demonstraram importante comprometimento da imunidade celular em pacientes com IRC inicial ou em hemodiálise, e menor comprometimento da imunidade humoral, com contagem de linfócitos B e dosagens de imunoglobulinas normais, tendo-se observado apenas redução do complemento (C3). Tem-se reconhecido que os portadores de IRC apresentam imunodeficiência, tornando-os mais susceptíveis a complicações, como a maior frequência de infecções observadas nesse grupo específico, além de menor resposta imune às vacinações.

Acredita-se que a imunodeficiência específica dos portadores de IRC esteja associada à uremia e à terapia renal substitutiva (TRS) (Kaul *et al.*, 2000), entre outros fatores. Por exemplo, Barros e Romão, em 1996, sugeriram que a resposta imune comprometida poderia ser atribuída a diversos fatores, como a uremia, a associação de múltiplas doenças crônicas e, ainda, a circunstâncias relacionadas à TRS, como a modalidade e o tempo de diálise.

Na uremia, a alteração da homeostase pode ser atribuída, entre outros fatores, à regulação anormal da apoptose, considerada essencial para a manutenção das funções biológicas. Pacientes em hemodiálise (HD) apresentam alteração da apoptose quando comparados àqueles em diálise

peritoneal e a controles sadios. Esse fato também pode estar envolvido na disfunção imune em pacientes em HD (D'Intnini *et al.*, 2003). Outros fatores que podem contribuir para diminuir a resposta imune são a anemia e a desnutrição, que o tratamento em diálise acentua (Barros e Romão, 1996).

A deficiência de oligoelementos, principalmente o selênio (Se) e o zinco (Zn), pode constituir mais um fator para a deficiência da resposta imune nesses pacientes. Esse fato foi comprovado em um estudo realizado em pacientes urêmicos, que demonstrou a propriedade imunoestimulatória do selênio administrado a esses pacientes (Bonomini *et al.*, 1995). Apesar de os autores não observarem alterações na contagem de leucócitos, linfócitos ou subpopulações de linfócitos, a reposição de selênio melhorou a resposta de células T à fitohemaglutinina e na hipersensibilidade tardia, que se reduziram a valores basais três meses após a suspensão da reposição desse oligoelemento.

A resposta proliferativa reduzida dos linfócitos a estimulação com concanavalina A, fitohemoaglutinina e a mitógenos foi demonstrada em 24 pacientes em HD, quando comparados a controles sadios, além de linfopenia, mas sem alteração na proporção de linfócitos CD4/CD8 (Kurz *et al.*, 1986). Contudo, ainda não está esclarecido se as várias anormalidades funcionais que ocorrem nas células T desses pacientes podem ser atribuídas a distúrbios intrínsecos dessas células (van Riemsdijk *et al.*, 2003).

A contagem de leucócitos e neutrófilos é, em geral, normal ou discretamente aumentada em portadores de IRC sob tratamento dialítico. Entretanto, observa-se acentuada leucopenia mediada por complemento, logo após o início da sessão de HD, sobretudo naqueles pacientes nos quais se utilizam capilares com membranas biocompatíveis. As funções dos polimorfonucleares são, em geral, normais, a despeito de ser observada deficiência da função fagocitária e da quimiotaxia neutrofílica, que pode, eventualmente, resultar em maior susceptibilidade às infecções (Barros e Romão, 1996).

A interferência da biocompatibilidade das membranas dialisadoras nos níveis séricos de citocinas, durante o procedimento da hemodiálise, é assunto controverso. Acredita-se que essas membranas levem à ativação da imunidade humoral, do sistema de complemento e de neutrófilos. As moléculas médias do soro urêmico são retidas nas membranas, o que pode, teoricamente, contribuir para diminuir a função das células T e, conseqüentemente, inibir a estimulação de linfócitos pelos mitógenos, a proliferação de fibroblastos e a atividade fagocítica dos leucócitos. Várias hipóteses tentam explicar essas alterações; contudo, permanecem as controvérsias. Tem-se notado, por exemplo, que a HD não parece contribuir para essas alterações; o que se observa, na prática, nesses pacientes, é a progressiva diminuição da imunidade, que tem relação direta com o tempo de HD (Giacchino *et al.*, 1982).

O ferro é um elemento sérico supressor dos linfócitos T no plasma urêmico, conforme observado *in vitro*. Nos pacientes com IRC em programa de diálise,

as múltiplas transfusões sangüíneas e a reposição de ferro durante o uso da eritropoietina levam ao acúmulo de ferro e à hemossiderose hepática, podendo agravar as lesões causadas pelo vírus C (Barros e Romão, 1996).

Estudos *in vitro* que visam à compreensão da imunodeficiência secundária da IRC têm revelado múltiplos defeitos na imunidade humoral e celular. Concentrações subnormais de imunoglobulinas e componentes do complemento têm sido relatadas. O plasma de pacientes urêmicos pode apresentar atividades inibitórias que influenciam a resposta linfocitária *in vitro*. Além disto, alguns parâmetros de função granulocitária, como a aderência, a fagocitose e a quimiotaxia, apresentam-se anormais (Kurz *et al.*, 1986). Distúrbios da função celular e alterações nas subpopulações de linfócitos podem contribuir para uma resposta imune anormal na uremia.

A resposta proliferativa das células mononucleares periféricas tende a ser deprimida nos pacientes urêmicos em relação aos controles não urêmicos, a despeito das controvérsias a esse respeito. Estudos *in vitro* demonstram que a produção do interferon gama pelos linfócitos, necessário para a ativação de macrófagos, linfócitos B e células T citotóxicas, é reduzida em pacientes urêmicos (Yousefi *et al.*, 1987), mas não nos pacientes em hemodiálise (Daichou, *et al.*, 1999). Também se observa diminuição na produção de IL-2 (Interleucina-2) e, conseqüentemente, há comprometimento da resposta proliferativa e da diferenciação linfocítica das células B. Acredita-se que a HD possa remover moléculas e, entre estas, a IL-2. A redução da IL-2 na uremia tem sido um fator fundamental para explicar a imunodeficiência que ocorre em

pacientes urêmicos (Waldherr *et al.*, 1992). Todavia, a função dos macrófagos parece estar preservada em urêmicos (Yousefi *et al.*, 1987) e aumentada na HD (Daichou, *et al.*, 1999).

Tem-se observado que os níveis séricos das imunoglobulinas (Ig) G, IgA e IgM são normais em urêmicos; contudo, os níveis de IgE e de C3 são inferiores aos valores normais nesses pacientes (Giacchino *et al.*, 1982). Além disso, os pacientes urêmicos produzem títulos baixos de anticorpos neutralizantes contra antígenos de superfície, aumentando os riscos de infecções pelos vírus da hepatite B e C, além de respostas subnormais ou reduzidas às vacinas virais. Em alguns casos, os anticorpos podem estar ausentes ou muito reduzidos, fato que pode explicar resultados de exames soronegativos (Barros e Romão, 1996).

Tem-se reconhecido que os pacientes urêmicos e em HD produzem excesso de citocinas pró-inflamatórias derivadas dos monócitos e macrófagos, tais como a IL-1, o TNF-alfa e a IL-6. Algumas das hipóteses para explicar esse fato seriam a produção dessas citocinas induzida pela própria uremia, a estimulação das células mononucleares em contato com as membranas de cuprofane ou de poliacrilonitrila, a contaminação bacteriana do dialisado pelas endotoxinas, considerada um potente estímulo para a produção de citocinas, e a ativação do complemento (C3a, C5a e anafilotoxinas) decorrente do contato do plasma com as membranas de celulose. Não obstante, os níveis de citocinas diminuem progressivamente com o tempo de HD. Isso pode

significar que a ativação crônica de monócitos resulta em exaustão e disfunção dessas células (Malaponte *et al.*, 2002).

O hormônio da paratireóide, ou paratormônio (PTH) é, em geral, aumentado em pacientes com IRC terminal. Uma vez que os linfócitos T apresentam receptores de superfície para o PTH, é possível que esse hormônio interfira na função linfocitária. Assim, estudos *in vitro*, realizados em indivíduos normais, demonstraram que o contato do PTH com células mononucleares induz à produção de IL-2, com conseqüente proliferação celular (Waldherr *et al.*, 1992).

Em conformidade com as prioridades para futuras pesquisas, definidas no Consenso Internacional para o Tratamento da Hepatite C (NIH, 2002), os estudos que visam ao maior entendimento da patogenia da infecção pelo vírus da hepatite C, particularmente a melhor caracterização dos aspectos virológicos, imunológicos e outros fatores ligados ao hospedeiro, que determinam o curso e o desfecho da infecção, constituem prioridade e precisam ser desenvolvidos. Os pacientes portadores de IRC, inseridos entre aqueles com maior prevalência de hepatite C, com particularidades imunológicas que interferem na evolução da doença, representam um desafio a ser investigado. Assim, as pesquisas sobre a resposta imune em pacientes portadores de hepatite C poderão contribuir para a maior compreensão dos determinantes do clearance viral e dos elementos necessários para o desenvolvimento de imunidade. O maior entendimento dessas correlações imunológicas poderá também favorecer o desenvolvimento de estratégias

imunoterapêuticas e de uma vacina eficaz contra o vírus da hepatite C (Freemann *et al.*, 2001).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar aspectos fenotípicos celulares da imunidade inata e adaptativa em portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica.

Objetivos específicos

1. Analisar, no contexto *ex vivo*, a frequência de populações e subpopulações dos leucócitos do sangue periférico.
2. Analisar a expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD38 e a frequência de expressão da molécula co-estimuladora CD28 em leucócitos circulantes.
3. Avaliar o potencial migratório dos leucócitos circulantes através da análise da expressão de moléculas de adesão CD18 e CD62L.
4. Correlacionar a frequência de linfócitos T ativados ($CD4^+HLA-DR^+$ e $CD8^+HLA-DR^+$) com aspectos fenotípicos dos linfócitos circulantes.

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A realização de investigações sobre a resposta imune em indivíduos infectados com o vírus da hepatite C (HCV) é justificável pelo fato de a hepatite C constituir uma doença infecciosa cujas alterações imunológicas têm relação direta com o desenvolvimento e a manutenção da infecção. Portanto, este projeto visa a estudar, entre os diversos aspectos que compõem a resposta imunológica dos portadores de hepatite C crônica, as características da celularidade do sangue periférico desses pacientes.

Diversas informações relacionadas à resposta imune de indivíduos portadores de hepatite crônica C têm sido relatadas. Contudo, os mecanismos imunológicos associados à evolução da hepatopatia crônica e à resposta terapêutica são controversos.

O desenvolvimento de novas técnicas de citometria de fluxo tem permitido ampliar as investigações sobre a resposta imune celular. O estabelecimento de protocolos experimentais que permitem a análise simultânea de múltiplos parâmetros numa célula individual contribuiu para ampliar as possibilidades de estudos fenotípico-funcionais. A análise do perfil intracitoplasmático de citocinas associado ao estudo simultâneo de marcadores de superfície celular, bem como o estudo paralelo de receptores de quimiocinas, permitem identificar os componentes imunológicos envolvidos em respostas complexas, como ocorre na hepatite crônica pelo HCV.

As investigações da estimulação celular rápida *in vitro* fornecem informações mais próximas dos eventos que ocorrem *in vivo*, no momento da coleta das amostras, sem as interferências de outros fatores que poderiam ser observados em culturas celulares de longa duração *in vitro*. Além disso, a pequena quantidade de sangue periférico necessária para essas investigações torna viável a sua realização.

São escassos os estudos publicados a respeito do fenótipo dos linfócitos do sangue periférico de indivíduos infectados com o HCV. A investigação do fenótipo celular de leucócitos circulantes, à semelhança de estudos realizados em outras infecções humanas, pode representar um importante instrumento para a busca de informações relacionadas ao estado geral da imunidade celular dos pacientes. Portanto, no nosso entendimento são importantes os estudos do fenótipo celular no contexto *ex vivo*, para a maior compreensão dos mecanismos imunes associados às diferentes manifestações clínicas e cursos da doença. Esses estudos poderão contribuir para maiores conhecimentos a respeito dos fatores preditivos da resposta ao tratamento da hepatite C.

Os estudos que avaliam a reatividade de linfócitos T demonstram que a ativação dessas células envolve uma complexa interação com as células apresentadoras de antígenos (APC). Um número distinto de moléculas é capaz de mediar a ativação de linfócitos T. Nesse contexto, tem-se demonstrado que a ligação do receptor de células T (TCR) ao MHC/antígeno na superfície da APC e um segundo sinal co-estimulador são necessários para a completa

ativação dessas células (Lenschow *et al.*, 1996). A participação da molécula CD28 e de seu ligante natural B7 nos mecanismos de co-estimulação de células T é bem conhecida, sendo considerada um dos principais eventos co-estimuladores (Linsley *et al.*, 1990). Em situações em que os eventos de co-estimulação via CD28/B7 são bloqueados, observam-se fenômenos de anergia celular.

Considerando que os mecanismos de proteção em portadores do HCV têm sido correlacionados ao padrão de resposta imune do tipo 1, é possível que o bloqueio da via CD28/B7 possa representar um ponto de controle, favorecendo a resposta do tipo 1. Entretanto, existem estudos em modelos experimentais murinos sugerindo que a interação CD28/B7 é um importante mecanismo para o processo de recrutamento de uma resposta imune do tipo 1, e que o bloqueio dessa via poderia ser desfavorável à ativação dessas células (Corry *et al.*, 1994).

Com o objetivo de contribuir para a maior compreensão do papel desse mecanismo co-estimulador na ativação de linfócitos T nos eventos imunológicos da hepatite C, este projeto visa correlacionar o predomínio de populações celulares CD28⁺ e CD28⁻ e a expressão do marcador B7 pelas células T e APC presentes no sangue periférico de indivíduos infectados com o HCV antes do tratamento da hepatite C crônica.

O processo de ativação celular compreende uma série de alterações bioquímicas que resultam na expressão de diferentes mediadores e moléculas

sinalizadoras, com conseqüente alteração no fenótipo molecular da superfície celular. Muitas moléculas são expressas na superfície de células B e T após a ativação. Muitas dessas moléculas têm sido bem caracterizadas e vêm sendo empregadas como marcadores da ativação celular, tais como CD38 e HLA-DR.

Estudos realizados por Rocco *et al.* (1996) demonstraram que pacientes portadores de hepatite C apresentam, no sangue periférico, um aumento no percentual de células expressando o marcador HLA-DR. Considerando que a imunidade celular parece desempenhar um importante papel nos mecanismos de controle da infecção humana pelo HCV, propõe-se avaliar se a expressão desses marcadores de ativação por subpopulações celulares CD4⁺ e CD8⁺ poderá contribuir para melhor compreender os eventos imunológicos que ocorrem na infecção humana pelo HCV.

O processo inflamatório na hepatite crônica C envolve inúmeros mecanismos imunológicos, como a adesão de linfócitos ao endotélio vascular hepático, o extravasamento celular ou diapedese e a adesão celular aos hepatócitos. Diversos estudos têm demonstrado que o processo de migração celular para um foco inflamatório envolve uma série de interações celulares, mediadas, em sua grande maioria, por moléculas de adesão, conhecidas como L-selectinas (CD62L) ou adressinas, e pelos receptores de quimiocinas, substâncias quimiotáticas importantes no recrutamento celular para o foco inflamatório. Essas duas categorias de moléculas são importantes no direcionamento e no processo seletivo da migração celular para os tecidos afetados pelo agente infeccioso. Entretanto, o papel da expressão diferencial de moléculas de

adesão em populações celulares, com potencial de migração para o foco inflamatório no compartimento hepático, é pouco conhecido.

Estudos desenvolvidos por Banner *et al.* (1997), em biópsia hepática de portadores de hepatite C, demonstraram que a reação inflamatória na infecção crônica pelo HCV envolve vias de ativação celular comuns a outros processos infecciosos, em que a inflamação na tríade portal é caracterizada por agregados celulares constituídos de linfócitos T, mais freqüentes, e B e por um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células do estroma portal. O estudo do potencial migratório permitirá uma abordagem mais completa desse processo de migração celular.

Todos os estudos que avaliam a reatividade celular antígeno específica *in vitro*, bem como os estudos imunohistoquímicos, demonstram que as células T CD8⁺ estão envolvidas tanto nos mecanismos de imunidade protetora quanto na patogenia da hepatite crônica C. Scognamiglio *et al.* (1999) demonstraram a presença de células CD8⁺ efetoras específicas para proteínas do HCV em 24,1% dos familiares de pacientes cronicamente infectados com o HCV, possivelmente conferindo uma proteção antiviral.

Assim, propõe-se estudar o perfil fenotípico de leucócitos, incluindo subpopulação de células T (CD4⁺ e CD8⁺), bem como de linfócitos B, células NK e NKT, marcadores de ativação celular e de potencial migratório, através da avaliação de amostras de sangue coletadas de portadores de diferentes

manifestações clínicas da hepatite C, incluindo os pacientes com IRC em hemodiálise.

Diversos estudos já foram publicados sobre a resposta imune dos pacientes com IRC com ou sem tratamento dialítico. Não obstante, são escassos na literatura os relatos da resposta imune em portadores de IRC em hemodiálise e infectados pelo HCV. Em razão de esses pacientes constituírem um dos principais contingentes de infectados pelo HCV, o Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG, centro de referência em hepatites virais no Estado de Minas Gerais, tem se dedicado a investigar os diversos aspectos clínicos e epidemiológicos dessa associação de doenças.

A contribuição original que essa pesquisa oferece é o conhecimento de um grande painel de aspectos fenotípicos de leucócitos de sangue periférico em uma ampla amostra de pacientes cronicamente infectados pelo HCV, incluindo um grupo de portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise, além da expressão dos marcadores de ativação, de co-estimulação, do potencial migratório e correlacionar a frequência de linfócitos T ativados com aspectos fenotípicos dos linfócitos circulantes.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODO

Amostra estudada

No período de abril de 2002 a abril de 2003, selecionaram-se prospectivamente 41 portadores crônicos do HCV. Esses pacientes são assistidos no Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da UFMG e concordaram em participar da pesquisa, após esclarecimentos e orientações sobre os objetivos desta e assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. Este projeto é parte das investigações conduzidas no Ambulatório de Hepatites Virais e foi aprovado pelo Departamento de Clínica Médica e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais. O projeto de pesquisa foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas em 27 de julho de 2000 e aprovado em 2 de outubro de 2000, com o número 051, tendo sido conduzido em conformidade com a Resolução nº. 196 do Conselho Nacional de Saúde (Ministério da Saúde, 1996) e resoluções complementares.

Definiu-se como portador crônico do HCV o indivíduo com sorologia (anti-HCV ELISA 3ª geração) positiva em pelo menos duas amostras com intervalos nunca inferiores a 180 dias, com infecção confirmada através da pesquisa positiva do HCV-RNA no sangue periférico por técnicas de biologia molecular (HCV RNA qualitativo, Amplicor, Roche). Esses exames fazem parte do protocolo de assistência e não foram solicitados para a finalidade desta

pesquisa. O uso de imunossupressores e as co-infecções com os vírus da hepatite B e da imunodeficiência adquirida foram critérios de exclusão.

A participação na pesquisa não foi remunerada, e os pacientes foram orientados em relação à possibilidade de desistência, se fosse de seu interesse, em qualquer etapa da pesquisa, com garantia de continuidade da assistência médica. Os participantes que concordaram em participar, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram submetidos a entrevista clínica, seguida de exame físico e coleta de 15ml de sangue em veia periférica, sendo 5ml em tubo contendo EDTA e 10ml em heparina. Após a coleta, o sangue era enviado à Fundação Hemominas em até duas horas, para processamento imediato.

Os pacientes foram subdivididos em dois grupos. O primeiro subgrupo foi constituído por pacientes com hepatite C crônica e função renal preservada, denominado, para a finalidade da pesquisa, de Grupo HCV. Outro subgrupo foi composto por pacientes com hepatite C crônica e insuficiência renal crônica em regime de terapia renal substitutiva por hemodiálise, denominado Grupo IRC.

No grupo HCV (n=32 pacientes), 15 participantes eram homens e 17 mulheres, com idade variando de 20 a 71 anos. Pouco mais de 60% relataram fator de risco conhecido para a infecção pelo HCV (Tabela 1).

TABELA 1 – Fatores de risco identificados para a transmissão do HCV em 20/32 pacientes portadores de hepatite C crônica

Fator de risco	n	Percentual
Hemotransfusão	12	60%
Uso de droga ilícita injetável	2	10%
Uso de droga ilícita não-injetável	1	5%
Tatuagem	1	5%
Profissional da área de saúde	2	10%
Outros	2	10%

O genótipo mais prevalente foi o 1b (54,5%). A carga viral do HCV foi menor que 1.000.000UI/ml (6,0 log) em 82,4% dos avaliados (HCV-RNA quantitativo, Amplicor, Roche, limite de detecção de 600UI/ml). Cinco por cento dos pacientes desse grupo apresentaram níveis séricos de ALT superiores a quatro vezes o limite superior de referência.

O grupo IRC foi constituído por nove pacientes com idade variando de 33 a 50 anos, com predomínio do sexo masculino sobre o feminino (2:1), mas sem diferença estatística quando comparado com o grupo HCV ($p=0,45$). Nesse grupo a infecção ocorreu entre os anos de 1984 e 1992 (mediana 1990), e o tempo médio de infecção foi significativamente inferior que o do grupo HCV ($p=0,033$). Não havia cirróticos entre os participantes que foram submetidos à biópsia hepática ($n=5$).

Um terceiro grupo de participantes – controle não-infectado (grupo NI, n=14) – foi constituído por doadores de sangue aptos, da Fundação Hemominas. Todos os indivíduos foram analisados em relação aos mesmos parâmetros imunológicos.

Análise do fenótipo de subpopulações celulares após cultura do sangue periférico

As alíquotas 50µL de sangue total (em EDTA) foram adicionadas na parede dos tubos e incubadas com anticorpos monoclonais de interesse (anti-marcadores fenotípicos de subpopulações) (Tab. 2) por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os marcadores de superfície celulares avaliados CD3, CD4, CD5, CD8, CD16, CD18, CD28 e CD62L foram marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e os marcadores CD3, CD4, CD8, CD19, CD38 e HLA-DR foram marcados com ficoeritrina (PE), todos colocados nos fundos dos tubos, em capela de fluxo laminar (Tab. 3).

Após a marcação, as hemácias presentes foram lisadas com 2ml de FACS Lysing Solution, sendo lavadas posteriormente com 2ml de PBS (*phosphate-buffered saline*), centrifugadas por 10 minutos, a 1300 rotações por minuto, à temperatura de 18 graus, desprezando-se o sobrenadante por inversão, tendo-se adicionado 200µl de PBS. A leitura foi realizada imediatamente, em citômetro de fluxo FACScalibur com sistema de detecção de três cores (Becton Dickinson).

TABELA 2 - Anticorpos monoclonais específicos de superfície celular, para identificação de populações e de subpopulações celulares.

Anticorpos Monoclonais	Populações Celulares Alvo
Controle Isotópico G1CL - FITC	
Controle Isotópico G1CL - PE	
Anti-CD3-PE e FITC	Células T
Anti-CD4-PE e FITC	Células T helper/Indutoras
Anti-CD5-FITC	Células B e T
Anti-CD8-PE e FITC	Células T supressoras/citotóxicas
Anti-CD16-FITC	Células NK
Anti-CD18-FITC	Adesão celular
Anti-CD19-PE	Células B
Anti-CD28-FITC	Molécula co-estimuladora
Anti-CD 38-PE	Células B e T ativadas
Anti-CD 62L-FITC	Adesão celular e potencial migratório
Anti-HLA-DR-PE	Células T ativadas-MHC II

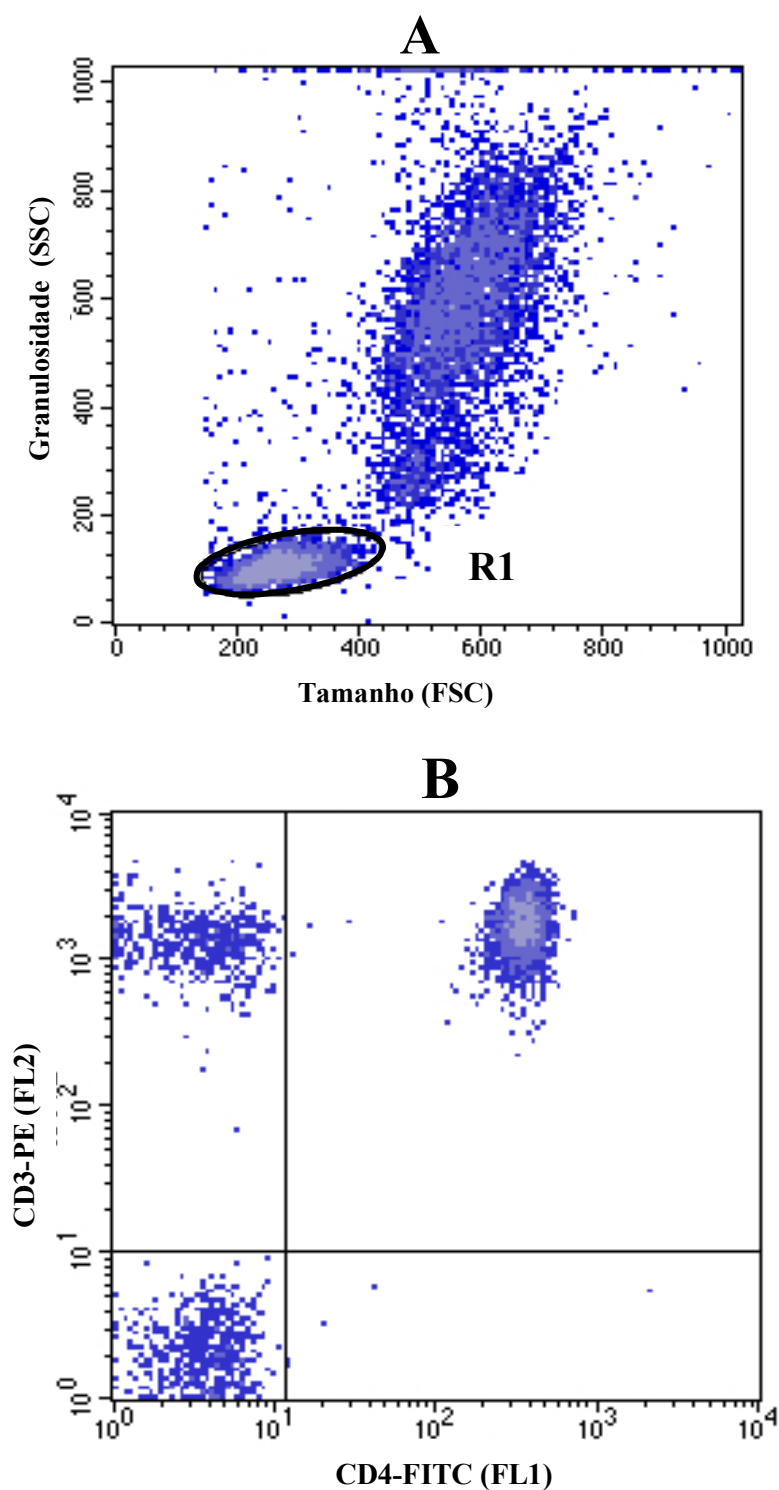
TABELA 3 – Volume de anticorpos monoclonais específicos de superfície celular adicionado aos tubos.

Tubo	FITC	Volume	PE	Volume
1	IgG2a	2,0µl	IgG1	2,0µl
2	CD3	0,25µl	CD4	1,0µl
3	CD3	0,5µl	CD8	1,0µl
4	CD4	1,0µl	CD38	2,0µl
5	CD4	1,0µl	HLA-DR	1,0µl
6	CD8	0,5µl	HLA-DR	1,0µl
7	CD8	0,5µl	CD38	2,0µl
8	CD16	2,0µl	CD3	1,0µl
9	CD18	2,0µl	CD4	1,0µl
10	CD18	2,0µl	CD8	1,0µl
11	CD19	0,5µl	CD5	1,0µl
12	CD28	2,0µl	CD4	2,0µl
13	CD28	2,0µl	CD8	2,0µl
14	CD62	2,0µl	CD4	2,0µl
15	CD62	2,0µl	CD8	2,0µl

Aquisição e análise dos dados

As amostras foram analisadas no Laboratório de Doença de Chagas do Centro de Pesquisas René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, em Belo Horizonte. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares foram realizadas utilizando-se o programa Cell-Quest (Becton Dickinson). A Figura 7 demonstra, de forma esquemática, a seqüência de procedimentos adotados para a análise dos dados obtidos pela citometria de fluxo.

A primeira etapa consistiu em identificar a população de linfócitos, neutrófilos, monócitos e eosinófilos. Foram utilizados gráficos de distribuição puntual, nos quais a população de interesse ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho (*Foward Scatter* – FSC) e granulosidade (*Side Scatter* – SSC) (R1) (FIG. 7A). Após a seleção da região de interesse, analisou-se a intensidade de fluorescência mostrada pelas células presentes nessa região, através de gráficos de distribuição puntual de fluorescência 1 (FL1) *versus* fluorescência 2 (FL2) (FIG. 7B). Em seguida à definição das regiões, determinou-se o percentual de células positivas, utilizando-se um histograma simples de análise de R1. Os resultados foram expressos em valores percentuais ou em números absolutos na comparação da intensidade de fluorescência (*Y mean*) de populações únicas.



Análise estatística

A análise estatística foi realizada através dos programas EPIINFO 6.04d (CDC, 2001) e Prism 3.0 (GraphPad Software, Inc., 1999). As variáveis quantitativas foram comparadas através do teste Kruskal-Wallis seguidas da comparação dos grupos, dois a dois, com o pós-teste de Dunn. Compararam-se as variáveis categóricas com distribuição normal através do teste exato de Fisher. Definiu-se o erro alfa de 5%. Na comparação dos grupos, rejeitou-se a hipótese nula de que os grupos eram semelhantes quando o valor de p foi inferior a 0,05. Valores atípicos (*outliers*), detectados através do teste de Grubbs, foram excluídos previamente às análises estatísticas. A correlação de Pearson foi utilizada para verificar a possibilidade de correlação entre as populações de linfócitos.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análise de freqüências de populações e subpopulações dos leucócitos do sangue periférico

1.1 IMUNIDADE INATA

1.1.1 Percentual de linfócitos NK

No estudo das populações de linfócitos NK nos grupos NI, HCV e IRC, não se observaram diferenças significantes entre os valores percentuais de células NK ($CD3^- CD16^+$) na população de linfócitos totais do sangue periférico. O grupo HCV apresentou média de $7,954 \pm 4,670\%$ de células NK, o grupo IRC de $8,608 \pm 6,885\%$ e o grupo NI de $8,762 \pm 6,341\%$. As medianas (representadas como linhas horizontais na Figura 8) foram de 7,910% no grupo NI, 6,830% no grupo HCV e 6,220% no grupo IRC. Não se observaram valores atípicos.

1.1.2 Percentual de linfócitos NKT

A Figura 9 demonstra os valores percentuais de células NKT ($CD3^+ CD16^+$) na população de linfócitos totais do sangue periférico dos grupos estudados. A análise dos dados revelou que o grupo IRC ($0,600 \pm 0,344\%$) apresentou percentual de células NKT circulante estatisticamente semelhante ao grupo NI

($0,278 \pm 0,247\%$) e ao grupo HCV ($0,594 \pm 0,781\%$), o mesmo acontecendo entre este último e o grupo NI ($p > 0,05$). Dois valores atípicos foram suprimidos das análises estatísticas pelo teste de Grubbs, sendo um no grupo HCV (10,43%) e outro no grupo NI (1,24%).

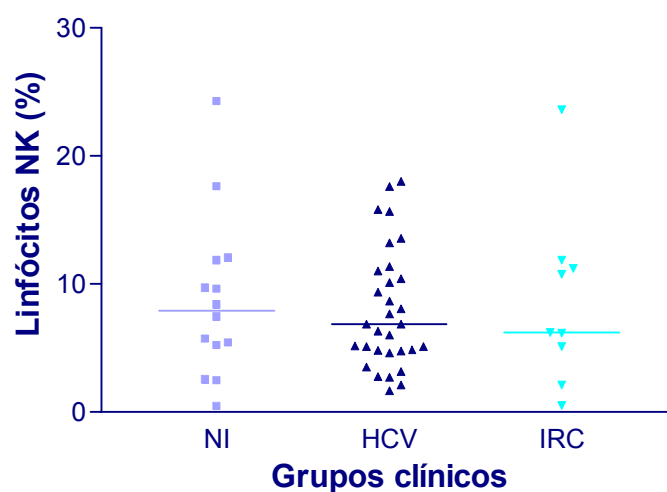


FIGURA 8. Percentual de células NK ($CD3^{-} CD16^{+}$) na população de linfócitos totais do sangue periférico circulantes de indivíduos não infectados ($n=14$), infectados pelo HCV ($n=31$) e infectados com IRC ($n=9$). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com PE e anticorpos anti-CD16 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

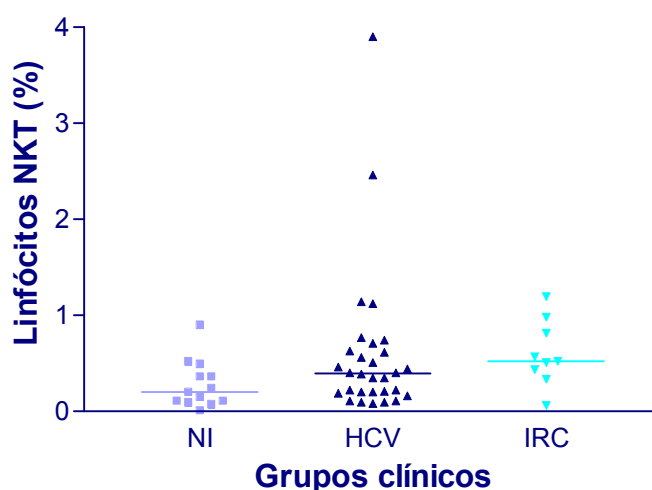


FIGURA 9. Percentual de células NKT ($CD3^{+} CD16^{+}$) na população de linfócitos totais do sangue periférico circulantes de indivíduos não infectados ($n=13$), infectados pelo HCV ($n=30$) e infectados com IRC ($n=9$). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com PE e anticorpos anti-CD16 marcados com FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

1.2 IMUNIDADE ADAPTATIVA

1.2.1 *Percentual de linfócitos T totais*

As médias percentuais de células T nos grupos NI (n=14), HCV (n=31) e IRC (n=9) foram, respectivamente, de $67,55 \pm 6,485\%$, $68,45 \pm 7,292\%$ e $66,37 \pm 9,455\%$. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As medianas (Figura 10 – barra horizontal) foram de 67,17%, 69,04% e 66,68% nos três grupos, respectivamente.

1.2.1.1. *Percentual de linfócitos T CD4⁺*

O percentual de células T CD4⁺ do grupo NI (n=14), variou de 33,53% a 52,26%. A média de células T CD4⁺ foi de $42,81 \pm 4,946\%$ e a mediana foi de 42,17%. No grupo HCV (n=31) obteve-se a média de células T CD4⁺ de $43,97 \pm 6,507\%$ e a mediana de 43,85%. O grupo IRC (n=9) apresentou média de células T CD4⁺ de $42,56 \pm 7,741\%$ e mediana de 41,25%. Na comparação dos três grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, obtiveram-se percentuais de células T CD4⁺ semelhantes. O coeficiente de variação dos três grupos foi, respectivamente, de 0,11, 0,14 e 0,18, demonstrando-se que houve homogeneidade dos dados. A Figura 11 demonstra os resultados dos valores percentuais de linfócitos T CD4⁺ na população de linfócitos totais do sangue periférico dos três grupos analisados. A barra horizontal representa as medianas.

1.2.1.2. *Percentual de linfócitos T CD8⁺*

As médias percentuais de células T CD8⁺ nos grupos NI (n=14), HCV (n=32) e IRC (n=9) foram, respectivamente, de 22,43±5,812%, 24,23±6,342% e 23,55±8,750%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No grupo NI o percentual de células T CD8⁺ variou de 9,10 a 34,67%, no grupo HCV de 13,82 a 38,02%, enquanto no grupo IRC a variação encontrada foi de 13,11 a 39,63%, como demonstrado na Figura 12.

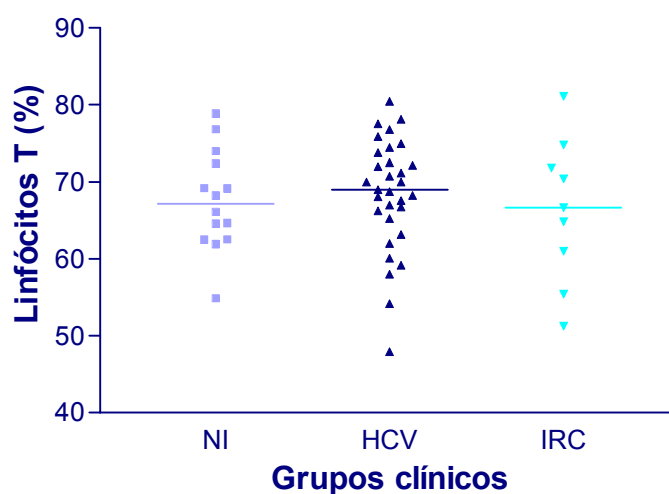


FIGURA 10. Percentual de linfócitos T circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados - NI - (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=31) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

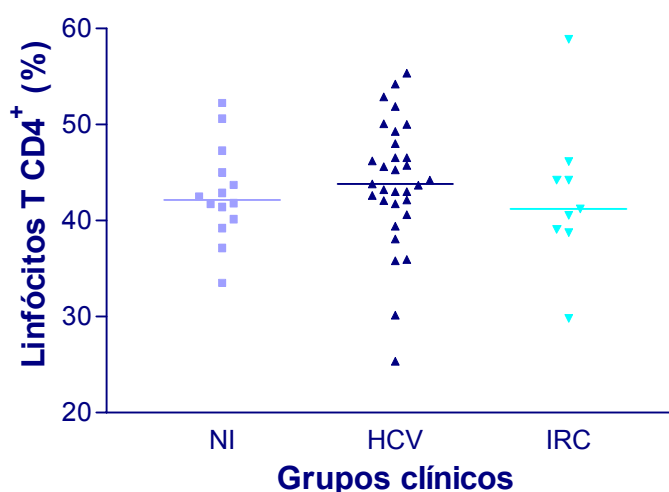


FIGURA 11. Percentual de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico de não infectados (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=31) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

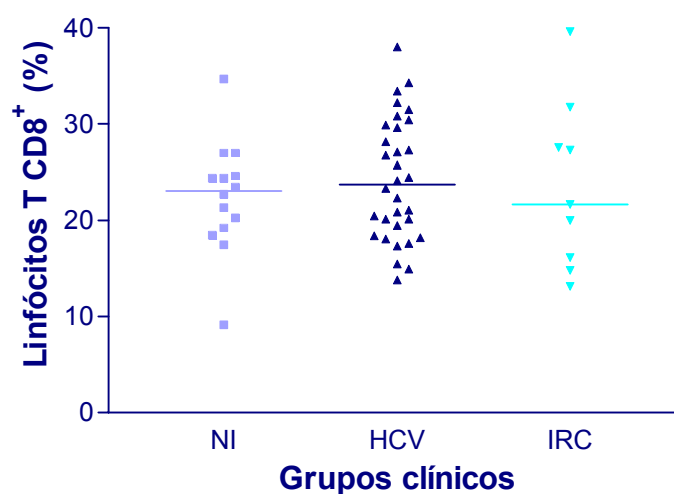


FIGURA 12. Percentual de linfócitos T CD8⁺ circulantes no sangue periférico de não infectados (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=32) e de infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD8 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

1.2.2 *Percentual de linfócitos B*

A partir da seleção dos linfócitos totais, analisou-se uma população marcada pelo CD19, mas não marcada pelo CD5 – linfócitos B. A comparação foi feita entre os percentuais de linfócitos B CD19⁺ CD5⁻. Não houve diferença significativa entre os grupos. Um valor atípico do grupo HCV (32,73%) foi excluído. Os valores médios encontrados foram de 14,02±4,48% (grupo HCV), 11,59±6,41% (grupo IRC) e 13,714±2,638% (grupo NI). As medianas do grupo NI (13,28%), HCV (14,02%) e IRC (9,070%) estão representadas na Figura 13 (barras horizontais).

1.2.2.1. *Percentual de linfócitos B1*

Na análise da população de linfócitos duplamente marcada as médias de linfócitos CD19⁺ CD5⁺ foram de 2,305±1,428% no grupo HCV, de 3,296±3,483% no grupo IRC e de 1,417±1,169% no grupo NI. Excluiu-se um valor atípico no grupo HCV (10,30%). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos. No grupo NI, os valores mínimos de linfócitos CD19⁺ CD5⁺ foram de 0,11%, mediana de 1,025% e limite superior de 3,74%. No grupo HCV os valores variaram de 0,37% a 7,06% (mediana de 1,99%), e, no grupo IRC a variação encontrada foi de 0,15% a 10,63% (mediana de 2,53%) (Figura 14).

1.2.2.2. *Fração de linfócitos B1 entre os linfócitos B*

Na divisão do percentual de células duplamente marcadas pelo percentual de linfócitos CD19⁺ CD5⁻ obteve-se um percentual de linfócitos B1. Um valor do grupo IRC (65,09%) foi excluído da análise. Na comparação dos grupos não se observou diferença estatisticamente significativa. Os valores médios encontrados foram de 15,49±11,10% no grupo HCV (n=31), de 14,742±12,057% no grupo IRC (n=8) e de 8,953±6,788% no grupo NI (n=14). A Figura 15 representa os valores encontrados, e as medianas dos grupos NI (7,420%), HCV (11,91%) e IRC (12,05%) estão representadas como barras horizontais.

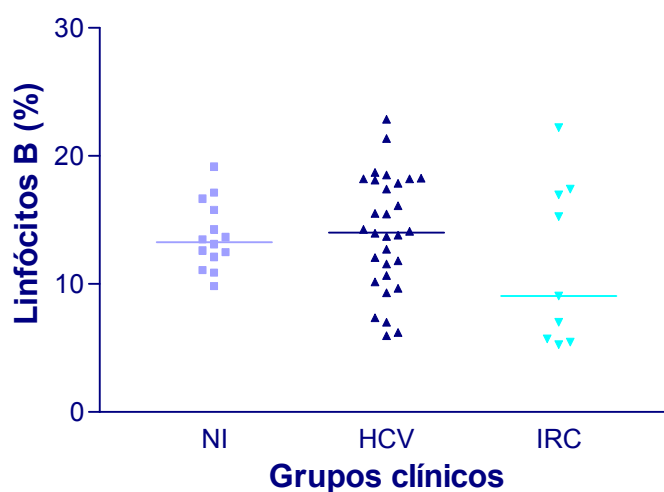


FIGURA 13. Percentuais de linfócitos B ($CD19^+ CD5^-$) entre os linfócitos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV ($n=30$), IRC ($n=9$) e não infectados ($n=14$). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

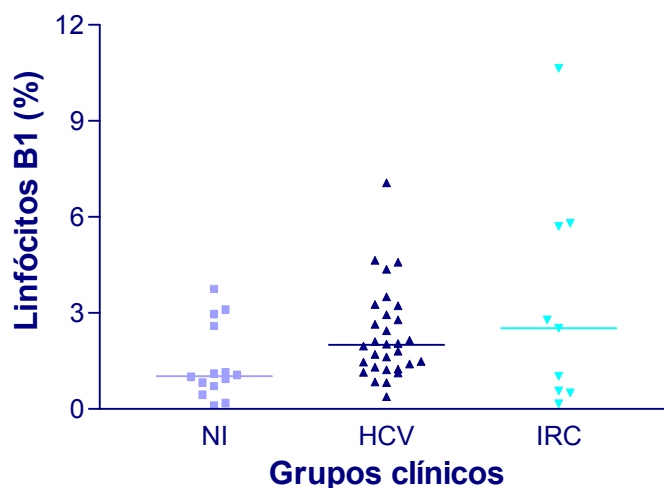


FIGURA 14. Percentuais de linfócitos B $CD19^+ CD5^+$ entre os linfócitos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV ($n=30$), IRC ($n=9$) e não infectados ($n=14$). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Não observamos

diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

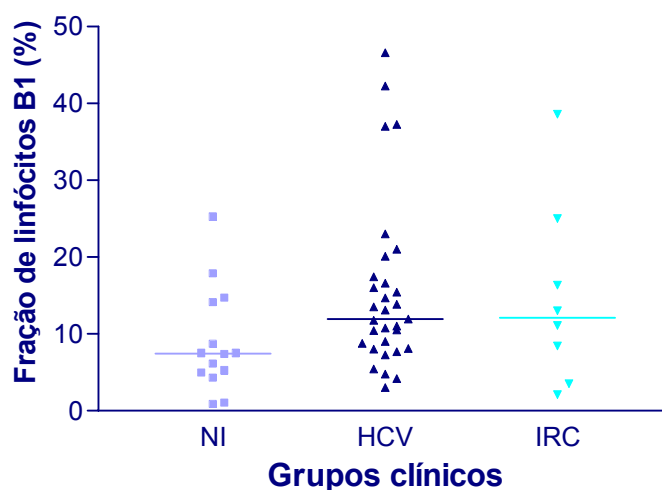


FIGURA 15. Fração de linfócitos B CD19⁺ CD5⁺ entre os linfócitos B em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=31), IRC (n=8) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 PE e anticorpos anti-CD5 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos B do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2. Análise da expressão dos marcadores de ativação HLA-DR e CD38 e a frequência de expressão da molécula co-estimuladora CD28 em leucócitos circulantes

2.1 IMUNIDADE INATA

2.1.1 Percentual de monócitos HLA-DR⁺⁺

Com a finalidade de estudar a população de monócitos HLA-DR⁺⁺, ou monócitos pró-inflamatórios, construiu-se inicialmente um histograma para identificar, na população de monócitos HLA-DR⁺, aquela que expressa mais HLA-DR (*high*). Nas análises das populações de monócitos dos quadrantes, não houve diferença estatística entre os três grupos. O percentual médio (\pm desvio padrão) de monócitos pró-inflamatórios no grupo HCV foi de $62,17 \pm 17,55\%$, no grupo IRC foi de $68,470 \pm 14,334\%$ e no grupo controle não-infectado foi de $65,342 \pm 12,782\%$, com medianas de 63,64%, 66,47% e 64,71%, respectivamente. Os valores encontrados, exceto um valor atípico no grupo NI (6,53%), estão representados na Figura 16.

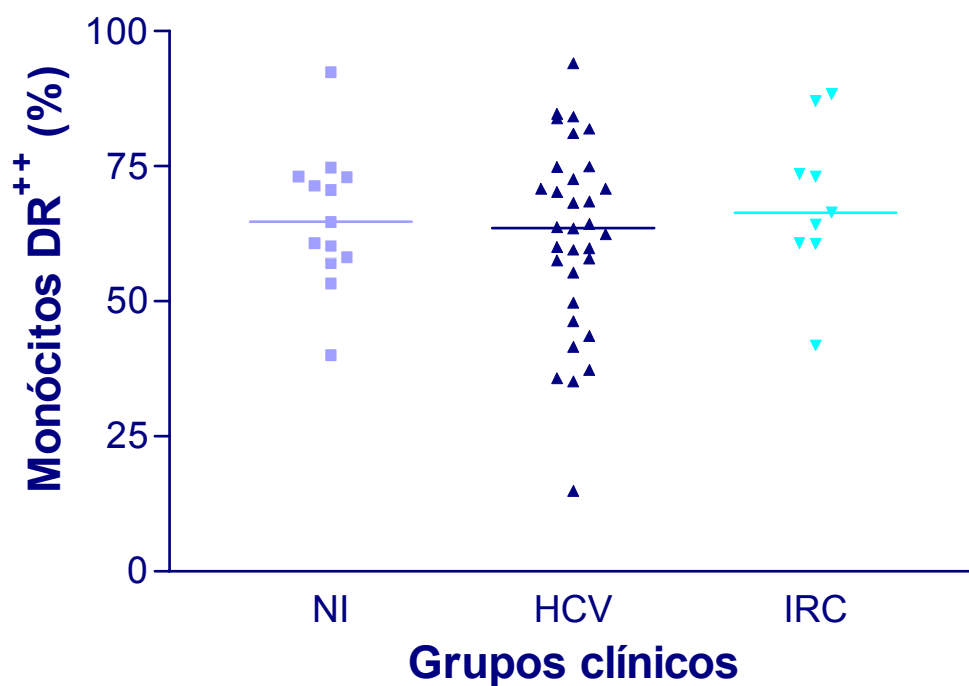


FIGURA 16. População de monócitos HLA-DR⁺⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR marcados com fluorocromo PE e anti-CD4 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.1.2 Percentual de neutrófilos CD38⁺

Na análise do percentual de neutrófilos CD38⁺, não se observou diferença estatística entre os grupos infectados pelo vírus C (grupos HCV e IRC). Não obstante, na comparação entre esses dois grupos e o grupo não-infectado (NI), observou-se menor percentual de neutrófilos CD38⁺, com diferença estatisticamente significativa. Os valores variaram de 98,20%, 95,92% e 97,15% até 99,88%, 99,62% e 99,52% nos grupos NI, HCV e IRC, respectivamente, com medianas (linhas horizontais da Figura 17) de 99,62%, 98,90% e 98,70%. Os valores médios (\pm desvio-padrão) foram de $99,36\pm 0,5274\%$, $98,67\pm 0,8481\%$ e $98,45\pm 0,9475\%$ nos grupos NI, HCV e IRC. Um valor atípico no grupo HCV foi excluído da análise.

2.1.3 Intensidade de fluorescência de CD38 em eosinófilos

Em razão de haver população única de eosinófilos, fez-se a comparação entre os três grupos quanto à intensidade de fluorescência da expressão de CD38. Não foram observados *outliers* nos três grupos. A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD38⁺ no grupo IRC foi de $58,118\pm 16,257$, semelhante à do grupo HCV ($48,94\pm 14,73$) e à do grupo NI ($46,53\pm 18,12$). Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. As medianas estão demonstradas na Figura 18 como barras horizontais.

2.1.4 Percentual de monócitos CD38⁺

Com o *gate* situado na população de monócitos foi possível determinar o percentual de monócitos ativados, ou seja, a expressão CD38. As médias percentuais de monócitos CD38⁺ nos grupos NI, HCV e IRC foram, respectivamente, de 84,87±6,262%, 85,17±7,533% e 71,00±16,03%. No grupo NI (n=14) o percentual de monócitos CD38⁺ variou de 70,00 até 93,94%; no grupo HCV (n=32) variou de 64,33 a 97,50% e no grupo IRC (n=9) de 38,27 a 84,03%. Na análise estatística, utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo IRC e os grupos HCV (p<0,01) e NI (p<0,05). Contudo, não se observou diferença significativa entre os grupos NI e HCV (p>0,05) (Figura 19).

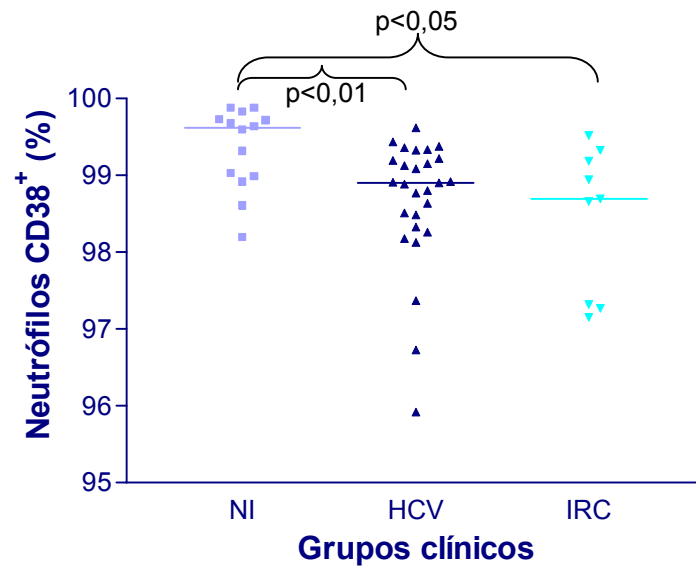


FIGURA 17. Percentual de neutrófilos CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=27) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti- CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos PE e FITC, respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

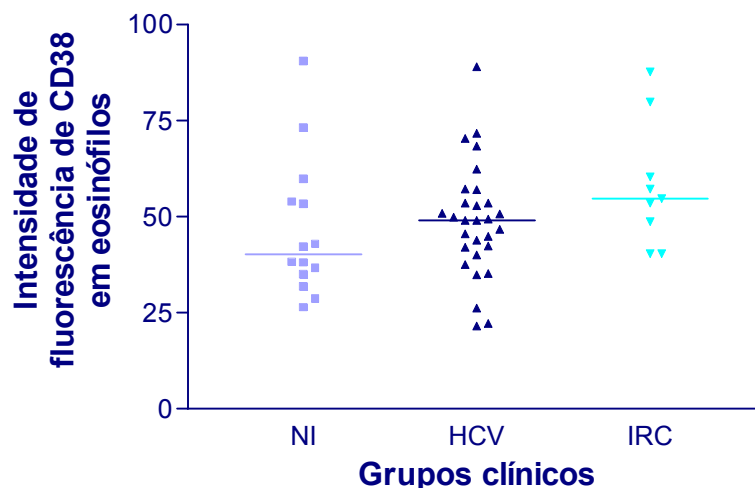


FIGURA 18. Intensidade média de fluorescência de CD38 em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=29), IRC (n=9) e não infectados (n=14). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 PE e anticorpos anti-CD8 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de

fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

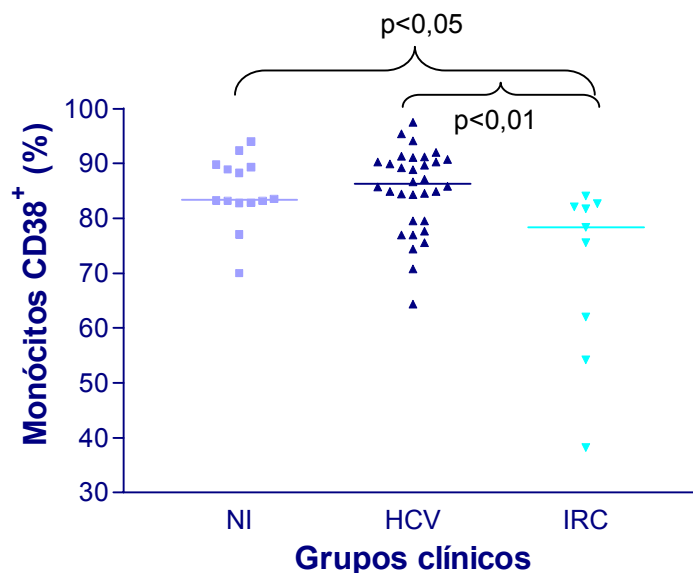


FIGURA 19. Percentual de monócitos CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI e HCV. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

IMUNIDADE ADAPTATIVA

2.2.1 Percentual de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺

Na avaliação da população de linfócitos T CD4⁺ ativados, observou-se um valor atípico no grupo NI, o qual foi suprimido da análise. Na comparação das populações de linfócitos T CD4⁺ ativados entre os grupos, notou-se semelhança estatística entre as médias dos grupos infectados (HCV e IRC); contudo, o grupo controle (NI) apresentou população de linfócitos T CD4⁺ ativados significativamente menor que a do grupo HCV ($p < 0,001$) e a do grupo IRC ($p < 0,01$) (Figura 20, Tabela 3).

TABELA 4 - Análise descritiva dos dados das populações de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺

	NI (n=13)	HCV (n=31)	IRC (n=9)
Mínimo	0,0700	0,7500	0,8300
Primeiro quartil	0,5750	2,230	1,965
Mediana	0,8500	4,490	4,020
Terceiro quartil	1,145	7,285	6,535
Máximo	1,700	12,23	11,35
Média	0,8600	4,688	4,559
Desvio padrão	0,4638	3,020	3,293
IC (95%)	0,5797-1,140	3,581-5,796	2,028-7,090

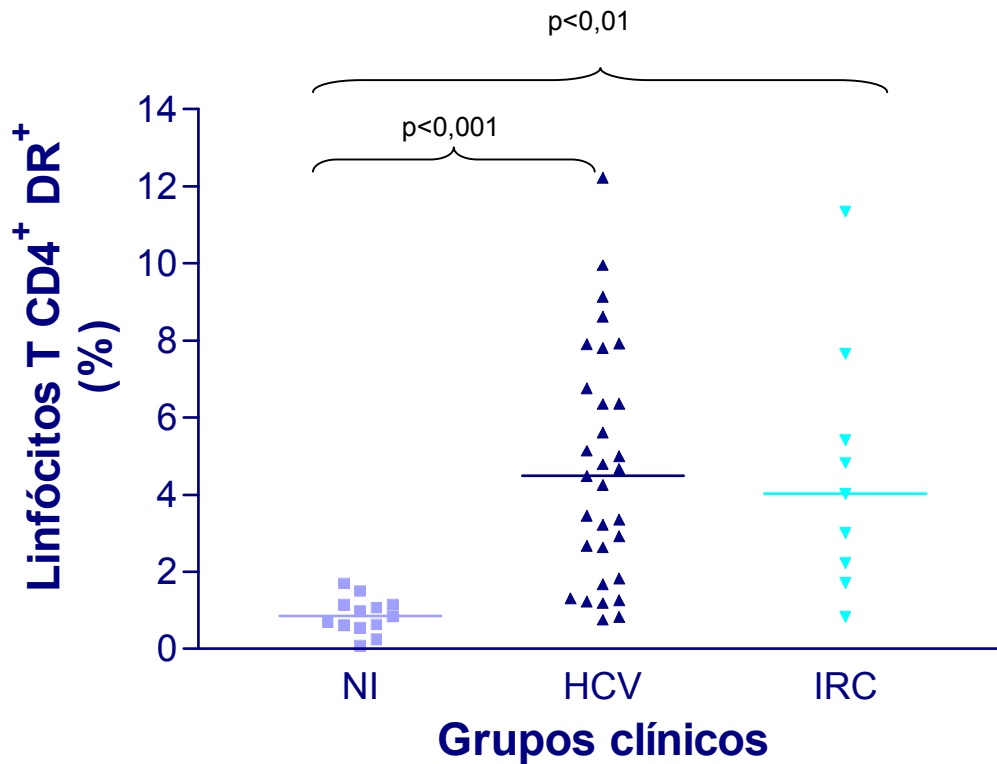


FIGURA 20. População de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ em *gate* de linfócitos, de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR e anti-CD4 marcados com fluorocromos FITC e PE, respectivamente. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos totais do sangue periférico. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.2 Fração de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD4⁺

Ao se dividir o percentual de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺, obteve-se a fração de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD4⁺. Na análise dos três grupos (FIG. 21), observou-se que o grupo NI apresentou a fração de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ estatisticamente menor que o grupo HCV ($p < 0,001$) e o grupo IRC ($p < 0,05$). Um valor atípico no grupo NI e outro no grupo IRC foram excluídos. A análise descritiva dos dados está sumarizada na Tabela 4.

TABELA 5 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD4⁺

	NI (n=13)	HCV (n=31)	IRC (n=8)
Mínimo	0,1400	1,190	2,130
Primeiro quartil	1,330	4,900	5,340
Mediana	1,940	10,50	8,395
Terceiro quartil	2,830	17,03	11,71
Máximo	4,190	30,77	13,03
Média	2,093	10,96	8,256
Desvio padrão	1,206	7,291	3,833
IC (95%)	1,364-2,822	8,289-13,64	5,052-11,46

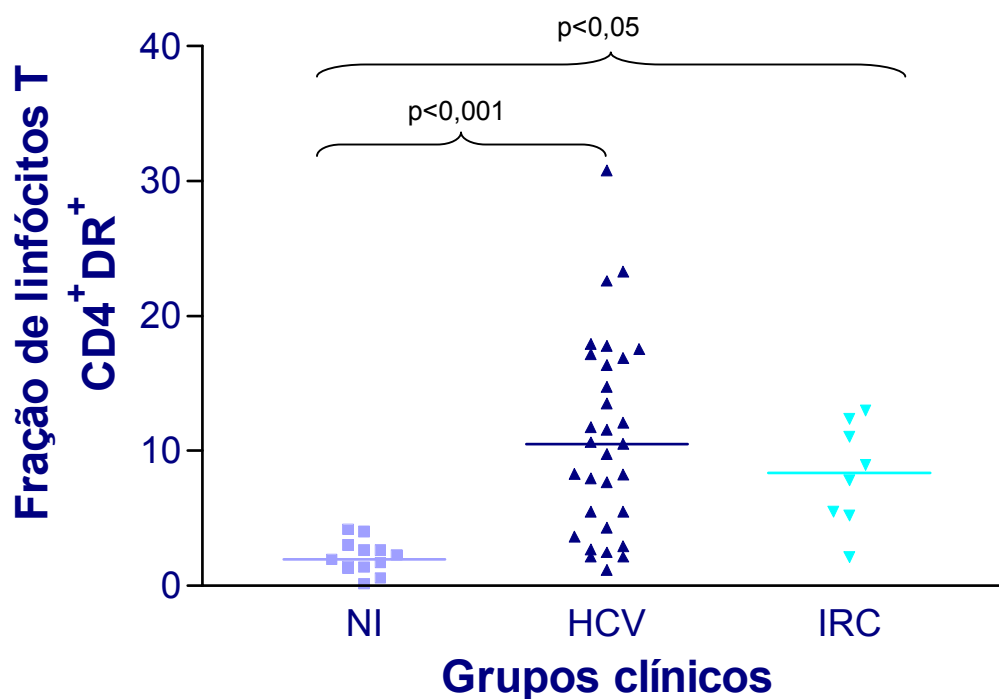


FIGURA 21. Fração de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=8). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (PE e FITC, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.3 Percentual de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺

As médias percentuais de células T CD8⁺ HLA-DR⁺ dos grupos foram de 0,4262±0,2925% no grupo NI (variações entre 0,05 e 1,06%), 5,328±5,331% no grupo HCV (variações entre 0,3 e 18,11%) e 4,929±4,696% (variações entre 0,31 e 14,19%) no grupo IRC. Notou-se grande dispersão dos dados em torno da média, com os coeficientes de variação de 0,68, 1,00 e 0,95 para os grupos NI, HCV e IRC, respectivamente. As medianas foram de 0,410%, 3,710% e 2,950%, respectivamente (Figura 22). Um valor atípico no grupo NI (2,44%) foi excluído. Nas comparações dos três grupos estudados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, observou-se diferença estatisticamente significativa na população de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Não obstante, não houve diferença entre os grupos HCV e IRC.

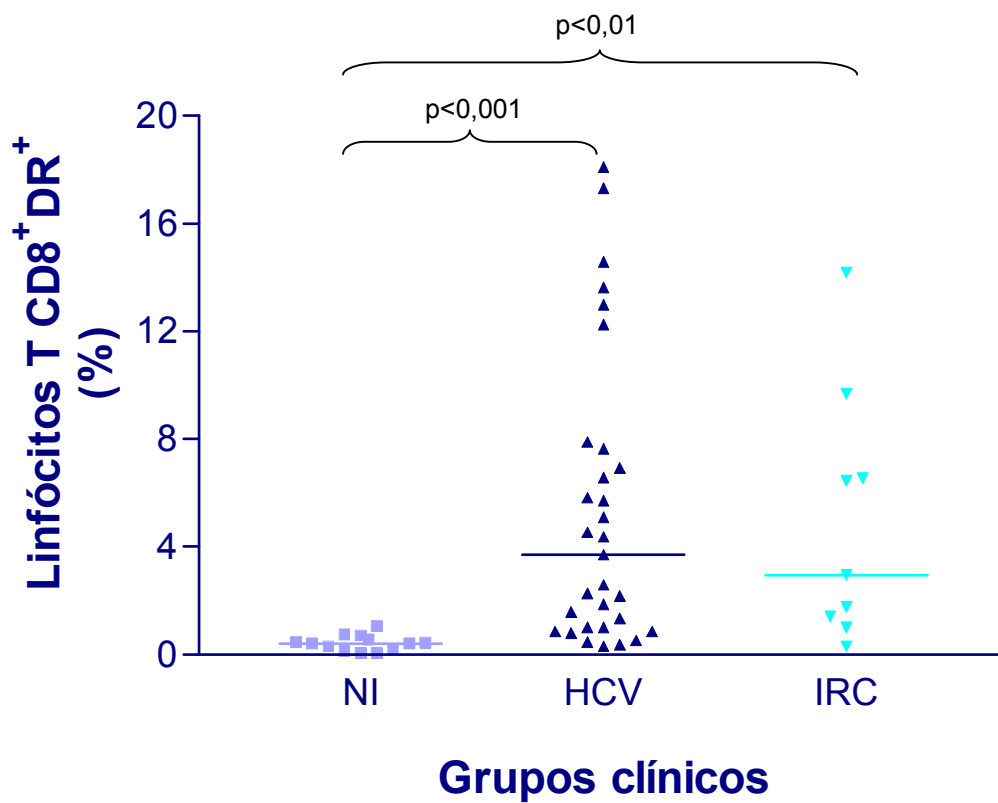


FIGURA 22. Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ em *gate* de linfócitos, de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti- HLA-DR e anti-CD8 marcados com fluorocromos PE e FITC, respectivamente. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos totais do sangue periférico. Diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foi observada. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.4 Fração de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD8⁺

Na relação entre o quociente do percentual de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ e o percentual de linfócitos T CD8⁺ obteve-se a fração de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD8⁺. No grupo HCV, observou-se fração de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ semelhante à do grupo IRC ($p > 0,05$) (FIG. 23). Na comparação dos grupos, notou-se diferença estatística entre os grupos HCV e NI ($p < 0,001$) e entre os grupos IRC e NI ($p < 0,01$). Um valor atípico no grupo NI (14,36%) foi excluído da análise, pelo teste de Grubbs. A Tabela 5 resume a análise descritiva dos dados.

TABELA 6 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ entre os linfócitos T CD8⁺

	NI (N=13)	HCV (N=31)	IRC (N=9)
Mínimo	0,1800	1,220	1,300
Primeiro quartil	0,8950	5,810	5,945
Mediana	2,010	20,34	20,95
Terceiro quartil	4,310	45,52	45,75
Máximo	5,190	77,49	57,53
Média	2,391	25,35	25,93
Desvio padrão	1,773	21,95	20,84
IC (95%)	1,320-3,462	17,30-33,40	9,915-41,95

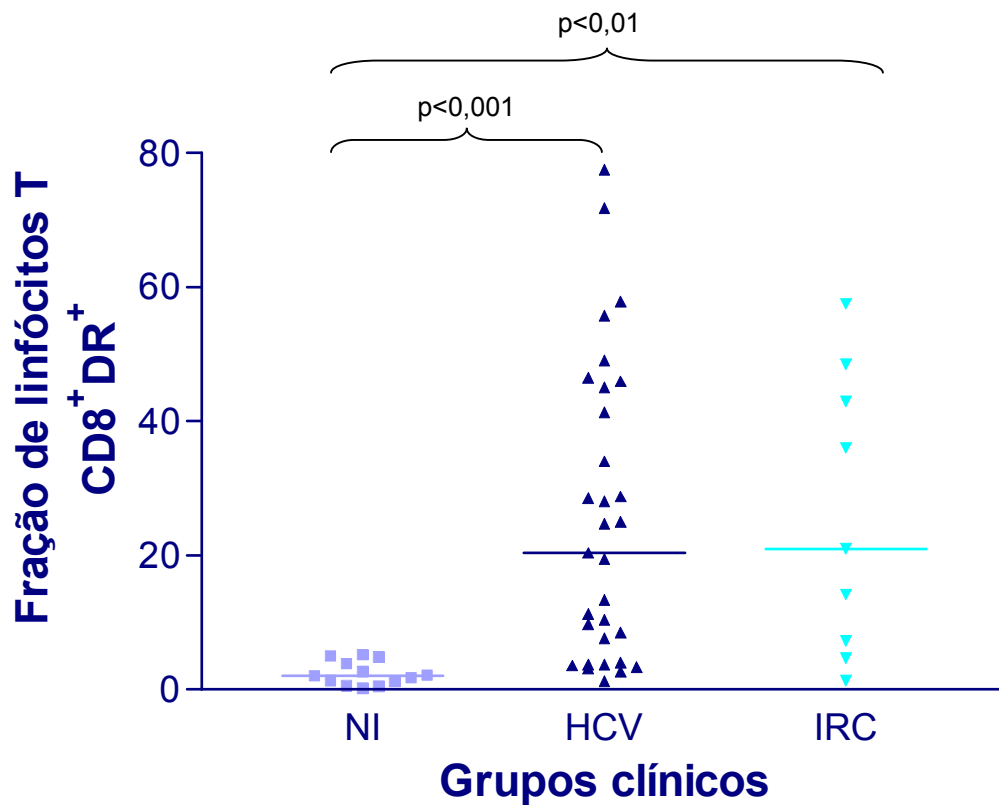


FIGURA 23. Fração média de linfócitos T $CD8^+$ HLA-DR $^+$ pelo percentual de linfócitos T $CD8^+$ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=13), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-HLA-DR marcados com fluorocromo PE e anti-CD8 marcados com fluorocromo FITC. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T $CD8^+$ do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.5 Percentual de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺

As médias percentuais de células T CD4⁺ CD38⁺ dos grupos foram de 22,252±7,123% (grupo NI), 19,181±5,633% (grupo HCV) e 21,467±5,581% (grupo IRC), sem diferença estatisticamente significativa. As medianas foram igualmente semelhantes (20,85%, 20,07% e 20,42%, respectivamente). Não observamos *outlier* em nenhum grupo. Os valores observados estão representados na Figura 24.

2.2.6 Fração de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ entre os linfócitos T CD4⁺

A fração de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ entre os linfócitos T CD4⁺ foi obtida através da divisão do percentual de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺. Na análise dos três grupos (FIG. 25), notou-se, no grupo NI, um percentual médio de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ de 52,21±14,30% (mediana 50,15%) entre os linfócitos T CD4⁺. Esse valor foi estatisticamente semelhante ao do grupo HCV (43,93±13,05%) e do grupo IRC, que apresentou percentual médio de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ de 49,77± 6,692% e mediana de 51,45%.

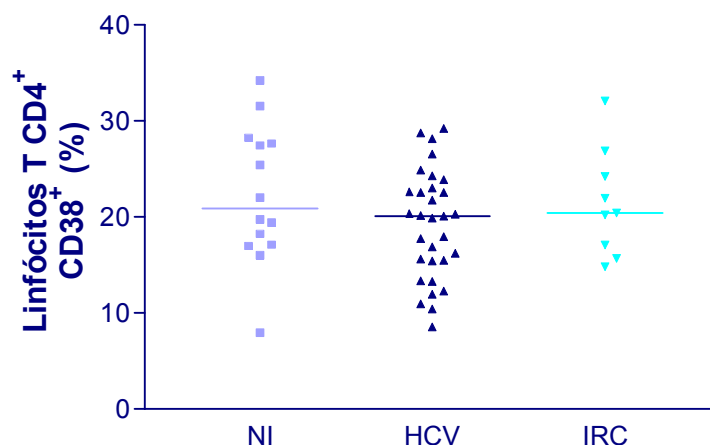


FIGURA 24. Percentual de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico de não infectados (n=14), indivíduos infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD38 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

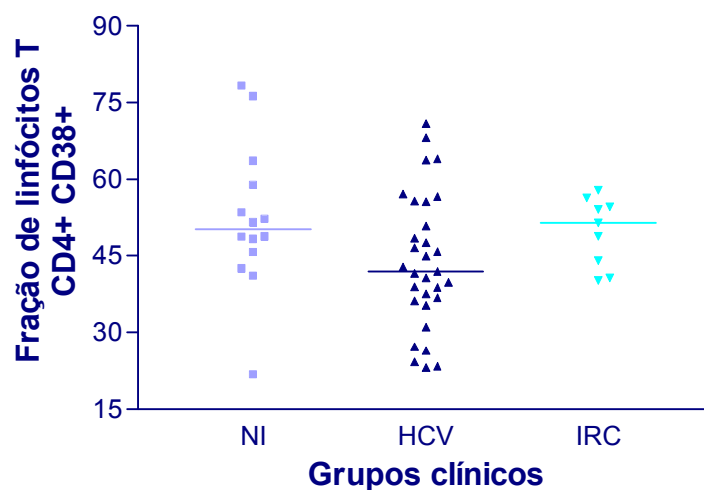


FIGURA 25. Fração média de linfócitos T CD4⁺ CD38⁺ pelo percentual de linfócitos T CD4⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 e anti-CD4 marcados com fluorocromos distintos (FITC e PE, respectivamente), segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.7 Percentual de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺

As médias percentuais de células T CD8⁺ CD38⁺ dos grupos foram 9,409±3,333% (grupo HCV), 10,481±4,918% (grupo IRC) e 8,944± 2,814% no grupo controle (NI), sem diferença estatisticamente significativa entre eles. As medianas dos grupos HCV, IRC e controle não infectado foram de 9,44%, 7,62% e 8,56%, respectivamente. Um *outlier* observado no grupo HCV (21,81%) foi excluído. Os valores observados estão representados na Figura 26.

2.2.8 Fração de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺ entre os linfócitos T CD8⁺

Na análise do percentual médio de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺, entre os linfócitos T CD8⁺ dos três grupos, obteve-se no grupo HCV o valor de 48,241±15,560% (mediana de 48,431%), semelhante ao grupo IRC (51,50±15,23%, mediana de 51,79%) e ao grupo NI (controle), que apresentou percentual médio de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺ de 49,419±16,771% e mediana de 44,495%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Nenhum valor atípico foi observado. A Figura 27 mostra os resultados referidos.

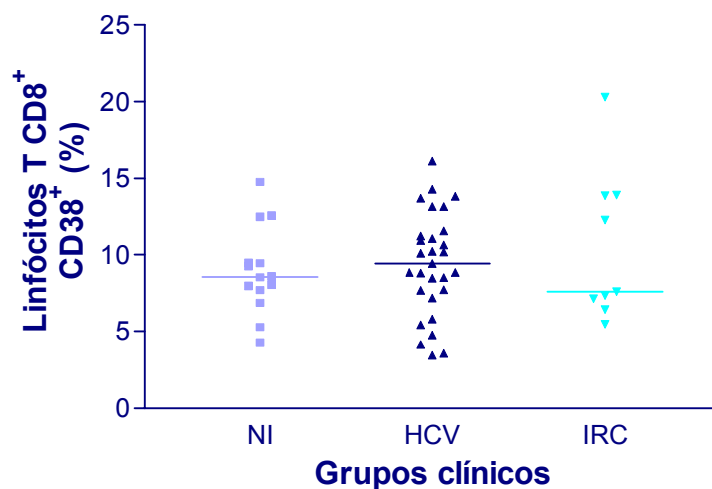


FIGURA 26. Percentual de células T CD8⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=29) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 marcados com fluorocromo PE e anti-CD8 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

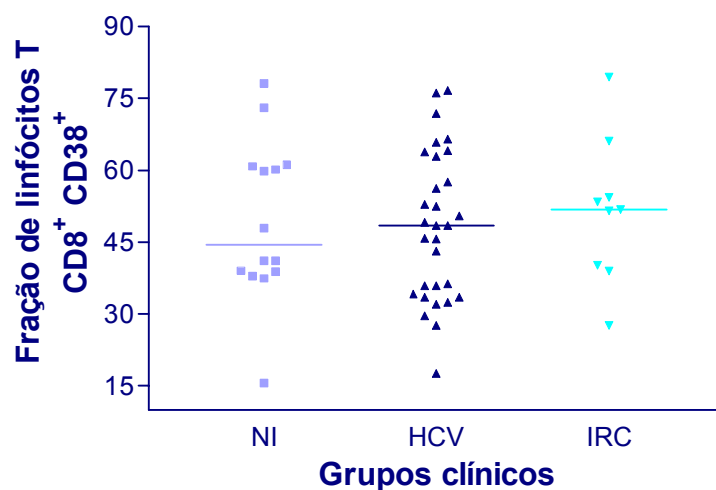


FIGURA 27. Fração de células T CD8⁺ CD38⁺ circulantes no sangue periférico no *gate* de linfócitos T CD8⁺ de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=30) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD38 marcados com fluorocromo PE e anti-CD8 marcados com fluorocromo FITC. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.9 Percentual de linfócitos T CD4⁺ CD28⁺

As médias percentuais de células T CD4⁺ CD28⁺ dos grupos foram de 42,248±7,666% (grupo HCV), 40,41±6,576% (grupo IRC) e 42,273±6,644% (grupo NI). A mediana no grupo HCV foi de 42,71%, (variação de 23,07 a 56,27%); no grupo IRC foi de 39,68% (variação de 32,42 a 54,87%) e, no grupo NI, de 42,515% (variação de 31,69 a 57,11%) (FIG. 28). Na comparação dos três grupos (teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para a comparação dos grupos dois a dois), não se observou diferença significativa para rejeitar a hipótese nula para um índice de significância de 95%.

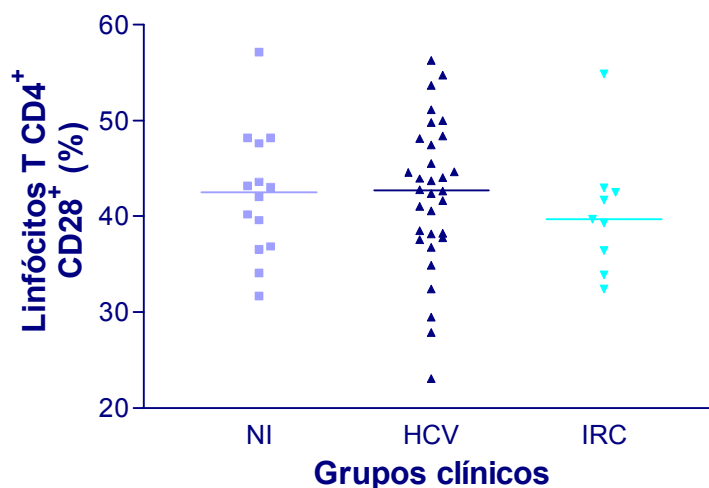


FIGURA 28. População de linfócitos T CD4⁺ CD28⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.10 Percentual de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺

À semelhança dos resultados não significativos observados nos percentuais de células T CD4⁺ CD28⁺ nos grupos avaliados, também não se observou diferença significativa na comparação dos percentuais de células T CD8⁺ CD28⁺ entre os grupos. Na estatística descritiva, os seguintes valores percentuais médios (\pm desvio padrão) de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ foram notados no grupo HCV = 14,146 (\pm 3,963%), no grupo IRC = 13,582 (\pm 5,308%) e no grupo NI = 14,89 (\pm 5,172%), além de medianas de 14,39%, (6,75 até 22,73%) no grupo HCV, de 12,18% (7,99 até 23,56%) no grupo IRC e de 14,57% (8,04 até 27,48%) no grupo NI, representadas como barras horizontais na Figura 29.

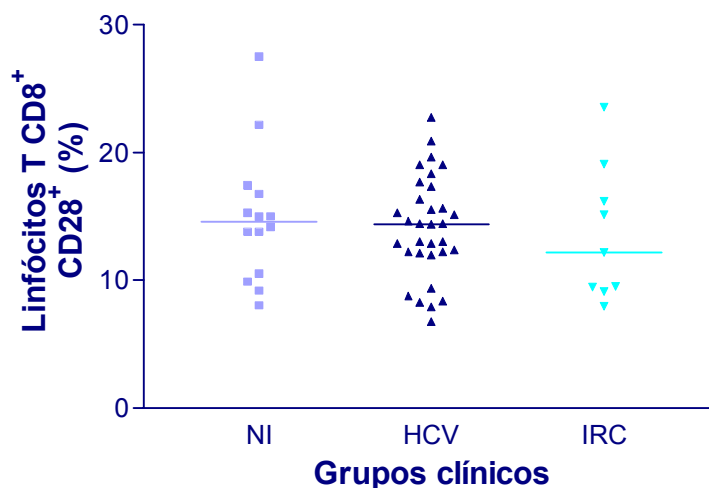


FIGURA 29. População de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos sob a forma de dispersão dos valores individuais, ressaltando a mediana dos valores como barra horizontal. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.11 Fração de linfócitos CD28⁻ entre os linfócitos CD4⁺

A média da população dos linfócitos T CD4⁺ que não expressa a molécula co-estimuladora CD28 na membrana foi de 2,893±2,117% no grupo controle NI, de 7,644±4,672% no grupo IRC e de 5,579±3,704% no grupo HCV. Não se observou diferença estatística entre o grupo HCV e o grupo IRC. Contudo, houve diferença significativa entre o grupo NI e os dois grupos de pacientes infectados pelo HCV (FIG. 30). Para a análise, três valores atípicos foram excluídos, sendo dois no grupo HCV (19,89 e 28,10%) e um no grupo NI (13,87%). A Tabela 6 apresenta uma síntese dos valores encontrados. Os três grupos mostraram grande dispersão dos dados em torno da média, com coeficientes de variação de 0,73, 0,66 e 0,61 para os grupos NI, HCV e IRC, respectivamente.

TABELA 7 - Análise descritiva dos dados das frações de linfócitos CD28⁻ entre os linfócitos CD4⁺

	NI (n=13)	HCV (n=30)	IRC (n=9)
Mínimo	0,1200	0,8900	1,970
Primeiro quartil	1,105	2,545	4,020
Mediana	2,680	4,865	7,170
Terceiro quartil	5,220	8,210	10,53
Máximo	5,910	13,44	16,87
Média	2,893	5,579	7,644
Desvio padrão	2,117	3,704	4,672
IC (95%)	1,614-4,172	4,196-6,962	4,053-11,24

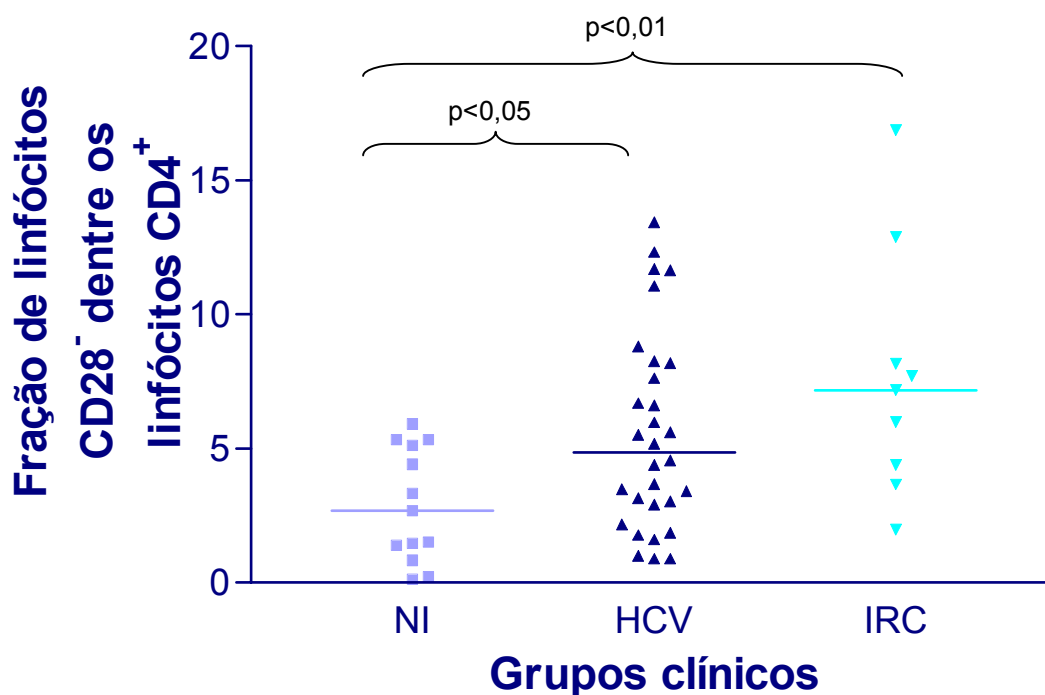


FIGURA 30. Fração de linfócitos T CD4⁺ CD28⁻ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=30), IRC (n=9) e não infectados (n=13). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HCV e IRC e o grupo NI foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

2.2.12 Fração de linfócitos T CD8⁺ CD28⁻ entre os linfócitos CD8⁺

Ao se analisar o percentual de linfócitos T CD8⁺ CD28⁻ entre os linfócitos T CD8⁺ dos três grupos, as seguintes medianas foram obtidas: grupo HCV= 49,12% (variação de 24,59 a 81,71%), semelhante à do grupo IRC (mediana= 54,61%, variação de 24,98 a 74,92%) e à do grupo NI (mediana= 48,76%, variação de 38,04 a 77,11%). No grupo HCV a média foi de 49,825±13,687%; no grupo IRC foi de 51,026±14,559% e no grupo NI foi de 51,916±11,292%. Não foi observado valor atípico. Todos os valores observados estão representados na Figura 31.

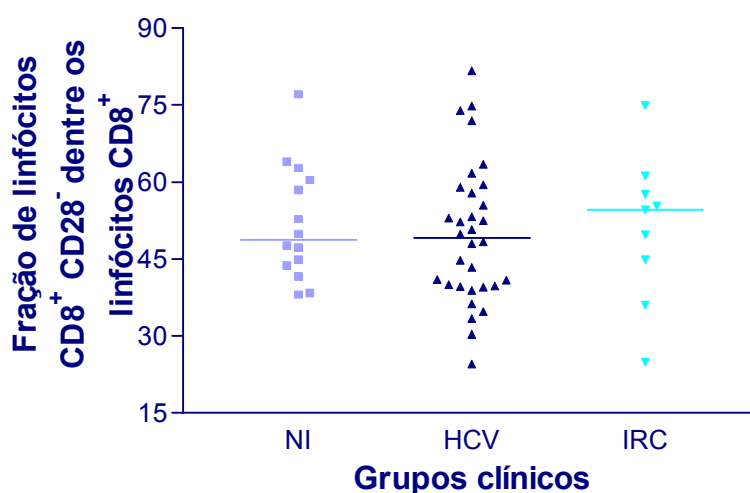


FIGURA 31. Percentual de linfócitos T CD8⁺ CD28⁻ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=32), IRC (n=9) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD28 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3. Avaliação do potencial migratório dos leucócitos circulantes através da análise da expressão de moléculas de adesão CD18 e CD62L

3.1 IMUNIDADE INATA

3.1.1 Intensidade de fluorescência de CD18 em neutrófilos

A comparação dos três grupos quanto à intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no *gate* de neutrófilos está demonstrada na Figura 32, com diferença estatística entre eles (teste Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no grupo NI foi de $132,864 \pm 44,37$; a do grupo HCV foi de $33,770 \pm 13,062$ e a do grupo IRC foi de $41,43 \pm 18,760$. Não houve diferença significativa entre os grupos HCV e IRC ($p > 0,05$). Um *outlier* no grupo HCV (82,34) foi excluído. A mediana no grupo HCV foi de 32,68 (variação de 16,10 a 65,84); no grupo IRC foi de 41,76 (variação de 23,74 a 76,66) e, no grupo NI, foi de 131,015 (variação de 70,34 a 194,91).

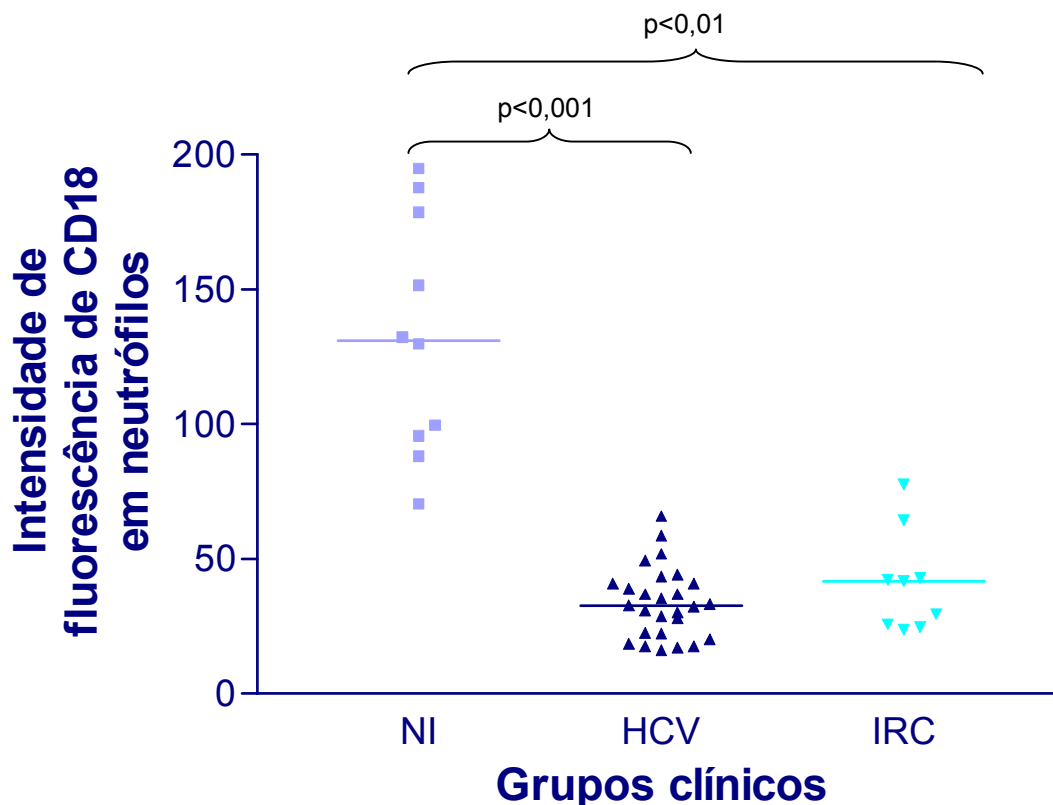


FIGURA 32. Intensidade de fluorescência de CD18 em neutrófilos de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como média dos valores e foram obtidos a partir da análise de neutrófilos do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.1.2 Intensidade de fluorescência de CD18 em eosinófilos

A Figura 33 representa a comparação entre os três grupos em relação à intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no *gate* de eosinófilos. A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no grupo NI (controle não infectado) foi de $154,242 \pm 54,924$, superior à do grupo HCV ($56,165 \pm 15,751$; $p < 0,001$) e à do grupo IRC ($66,07 \pm 16,902$; $p < 0,01$). Não houve diferença estatística entre as médias dos grupos HCV e IRC ($p > 0,05$). Não foram observados *outliers* nos grupos estudados. As medianas foram de 55,19 no grupo HCV, de 60,93 no grupo IRC e de 147,99 no grupo NI.

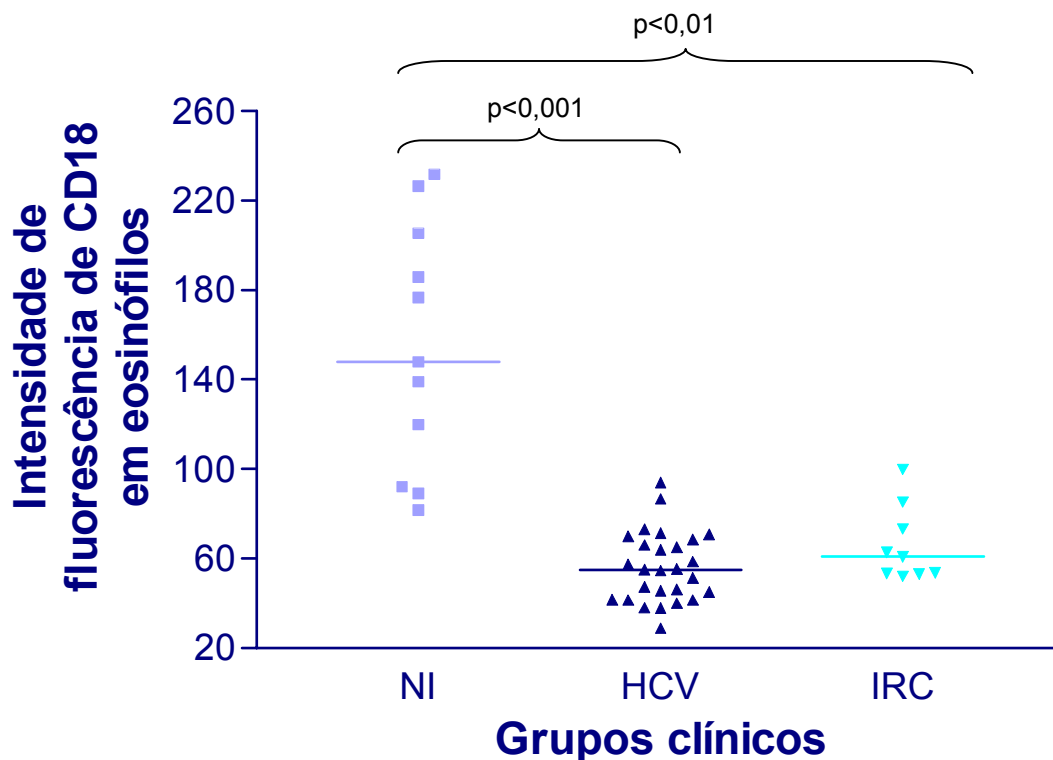


FIGURA 33. Intensidade média de fluorescência de CD18 em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=11). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.1.3 Intensidade de fluorescência de CD18 em monócitos

Na comparação dos valores de intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no *gate* de monócitos, notou-se diferença altamente significativa entre os três grupos ($p < 0,0001$). Na análise pelo pós-teste de Dunn, observou-se que não houve diferença entre os grupos HCV e IRC ($p > 0,05$); contudo, puderam ser observadas diferenças estatísticas nas comparações entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC (FIG. 34). Um valor atípico no grupo IRC (161,96) foi excluído. A Tabela 7 descreve os dados observados.

TABELA 8 - Análise descritiva dos dados de intensidade de fluorescência de CD18 em monócitos

	NI (n=10)	HCV (n=28)	IRC (n=8)
Mínimo	106,1	18,08	58,95
Primeiro quartil	165,6	55,18	61,89
Mediana	249,6	64,43	67,92
Terceiro quartil	314,7	75,87	86,29
Máximo	328,0	124,8	105,2
Média	239,9	66,85	74,54
Desvio padrão	77,04	20,78	18,38
IC (95%)	184,8-295,0	58,80-74,91	59,17-89,91

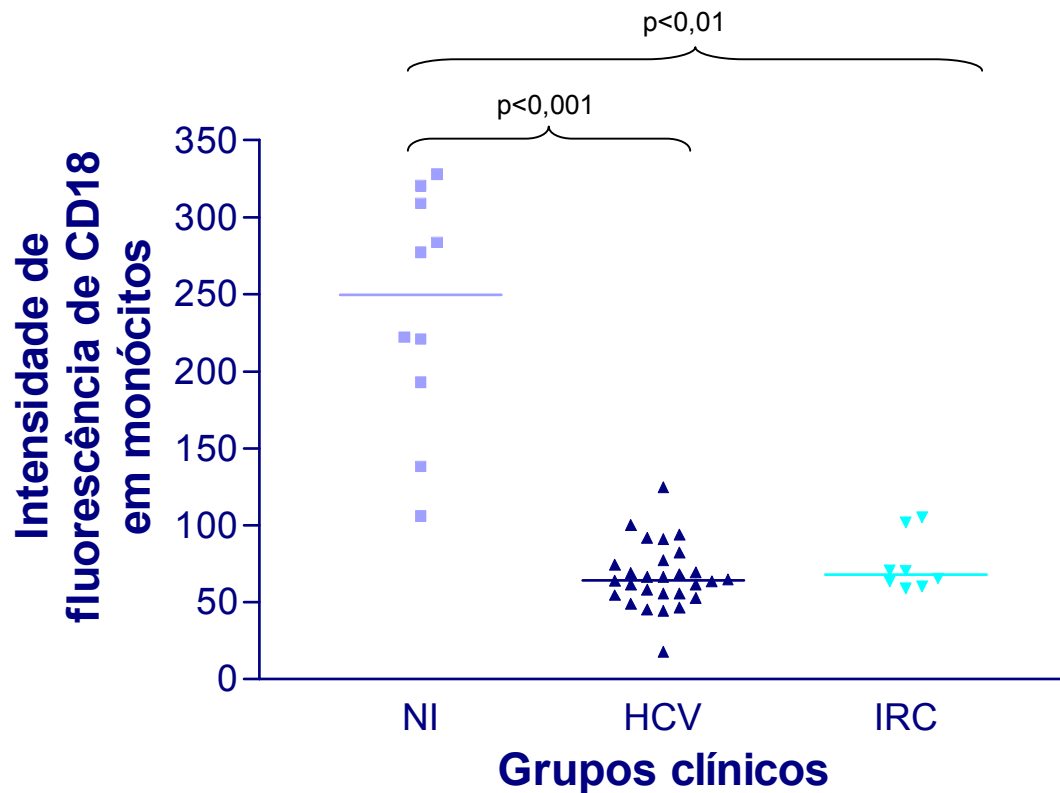


FIGURA 34. Intensidade de fluorescência de CD18 em monócitos de indivíduos infectados pelo HCV (n=28), IRC (n=8) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.1.4 Percentual de neutrófilos CD62L⁺

Na comparação das populações de neutrófilos CD62L⁺, observou-se maior população no grupo NI (controle) em relação aos grupos HCV ($p < 0,01$) e IRC ($p < 0,01$), a despeito de os três grupos terem apresentado proporções elevadas de neutrófilos CD62L⁺. Não houve diferença entre os grupos HCV ($97,130 \pm 1,179\%$; mediana de 97,55%) e IRC ($96,848 \pm 0,805\%$; mediana de 96,68%). Na análise do grupo NI encontrou-se média de 98,433% (desvio-padrão 1,094%) e mediana de 98,585%, com variação de 95,90 a 99,96% (FIG. 35). Três *outliers*, dois no grupo HCV (32,99 e 60,65%) e um no grupo IRC (81,84%) foram excluídos.

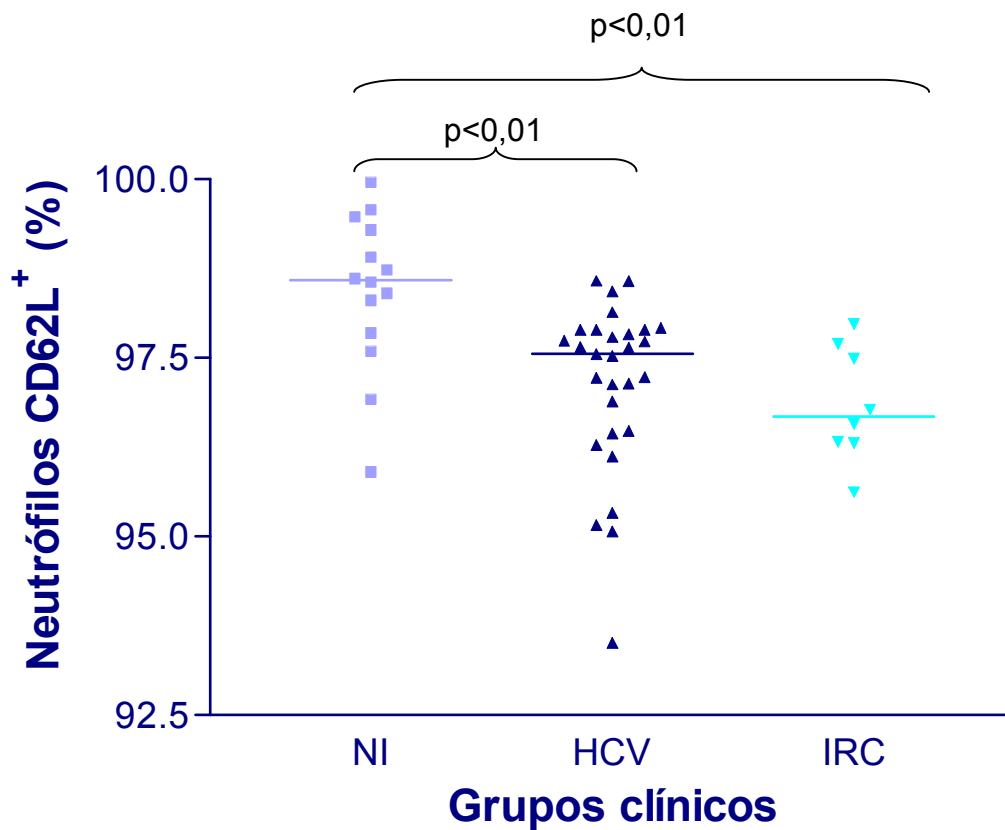


FIGURA 35. Percentual de neutrófilos CD62L⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=29), IRC (n=8) e não infectados (n=14). As populações celulares foram identificadas em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores percentuais e foram obtidos a partir da análise de neutrófilos do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significante entre os grupos HCV e IRC e o grupo controle NI foram notadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.1.5 Intensidade de fluorescência de CD62L em eosinófilos

Não se observou diferença estatisticamente significativa na comparação dos três grupos (teste Kruskal-Wallis, valor $p=0,4613$) em relação à intensidade de fluorescência da expressão de CD62L no *gate* de eosinófilos e na comparação dos grupos dois a dois através do pós-teste de Dunn. A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD62L⁺ no grupo HCV foi de $51,544 \pm 17,589$, semelhante à do grupo IRC ($60,149 \pm 17,963$) e à do grupo NI ($51,85 \pm 14,34$). Na Figura 36 estão representados os valores encontrados nos três grupos avaliados, sem a presença de valores atípicos, e as medianas, como barras horizontais.

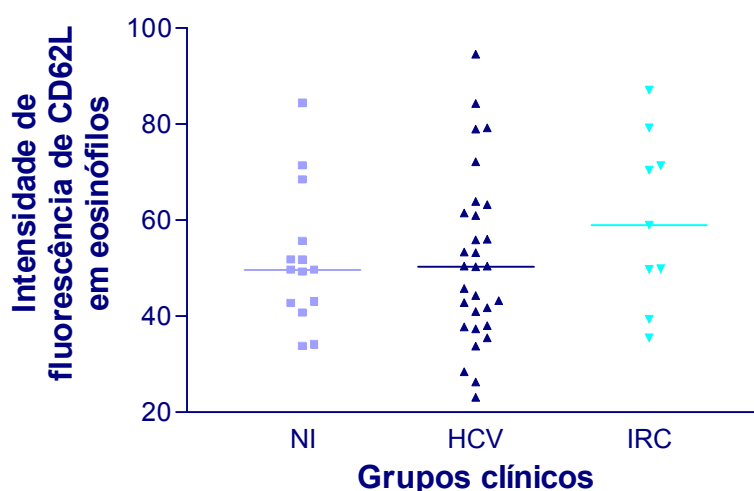


FIGURA 36. Intensidade de fluorescência de CD62L em eosinófilos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV ($n=30$), IRC ($n=9$) e não infectados ($n=13$). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de eosinófilos do sangue periférico. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos NI, HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.1.6 Fração de monócitos CD62L⁺

Na avaliação do *gate* de monócitos, observou-se uma população de monócitos que expressaram CD62L na membrana. Na comparação das populações de monócitos CD62L⁺ observou-se maior população no grupo NI, quando comparado ao grupo IRC ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os grupos HCV (média de $72,924 \pm 11,817\%$; mediana de $73,875\%$) e grupo NI, ou entre os grupos HCV e IRC ($70,211 \pm 9,271\%$; mediana de $74,31\%$). No grupo NI encontrou-se média de $81,858\%$ (desvio-padrão de $7,398\%$) e mediana de $80,395\%$ (variação de $70,52$ a $99,63\%$). A Figura 37 apresenta esses resultados.

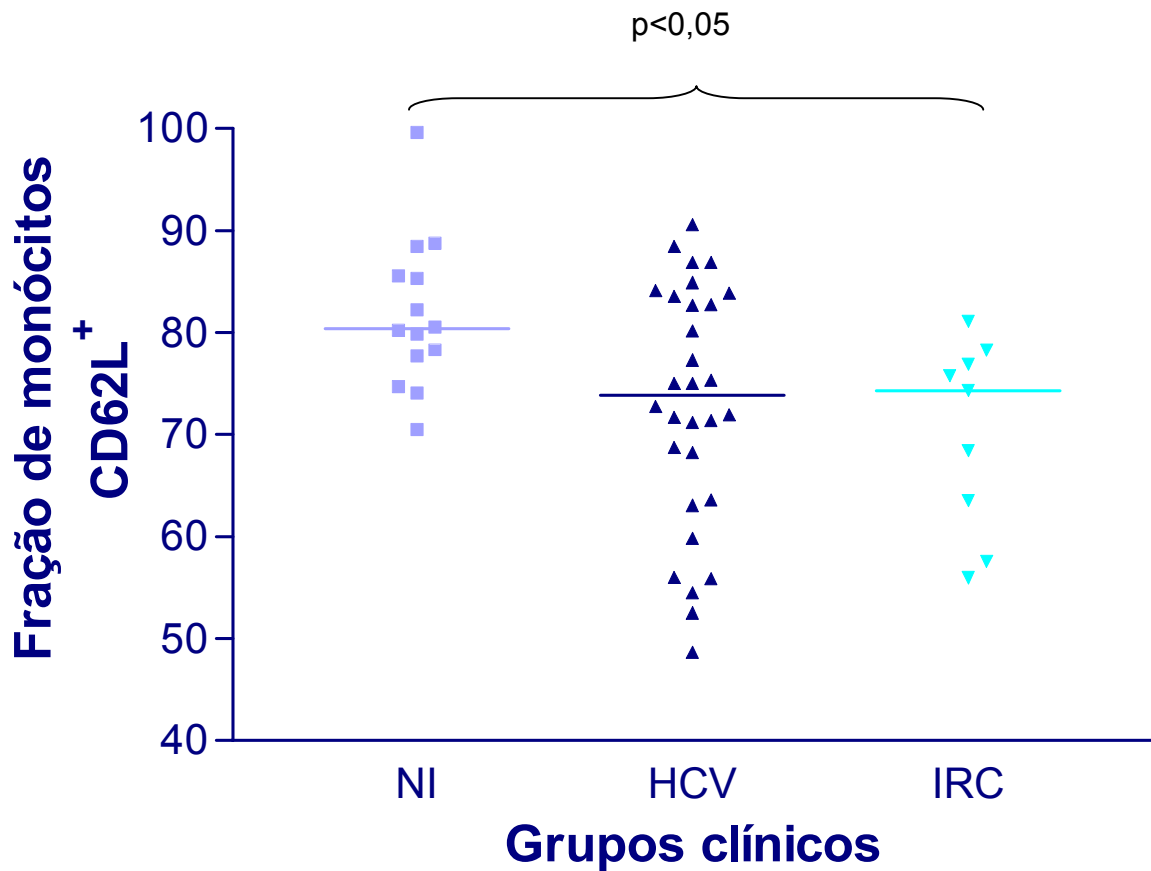


FIGURA 37. População de monócitos CD4⁻ CD62L⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=30) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD62L FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo IRC e NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.2 IMUNIDADE ADAPTATIVA

3.2.1 *Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos T CD4⁺*

A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD18 em linfócitos T CD4⁺ no grupo HCV foi de $16,633 \pm 3,107$, semelhante à do grupo IRC ($16,744 \pm 4,352$). A média do grupo NI, que apresentou elevado coeficiente de variação (0,52), foi de $37,752 \pm 19,575$. As medianas encontradas foram 16,09 no grupo HCV, 15,20 no grupo IRC e 44,03 no grupo NI. Houve diferença significativa na comparação das medianas dos grupos em relação à intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no *gate* de linfócitos CD4⁺ (teste Kruskal-Wallis, $p=0,0034$) e no pós-teste de Dunn, na comparação dois a dois dos grupos de casos (HCV e IRC) com o NI (FIG. 38). Contudo, não houve diferença entre os grupos HCV e IRC ($p>0,05$). Um *outlier* no grupo HCV (3,78) foi excluído.

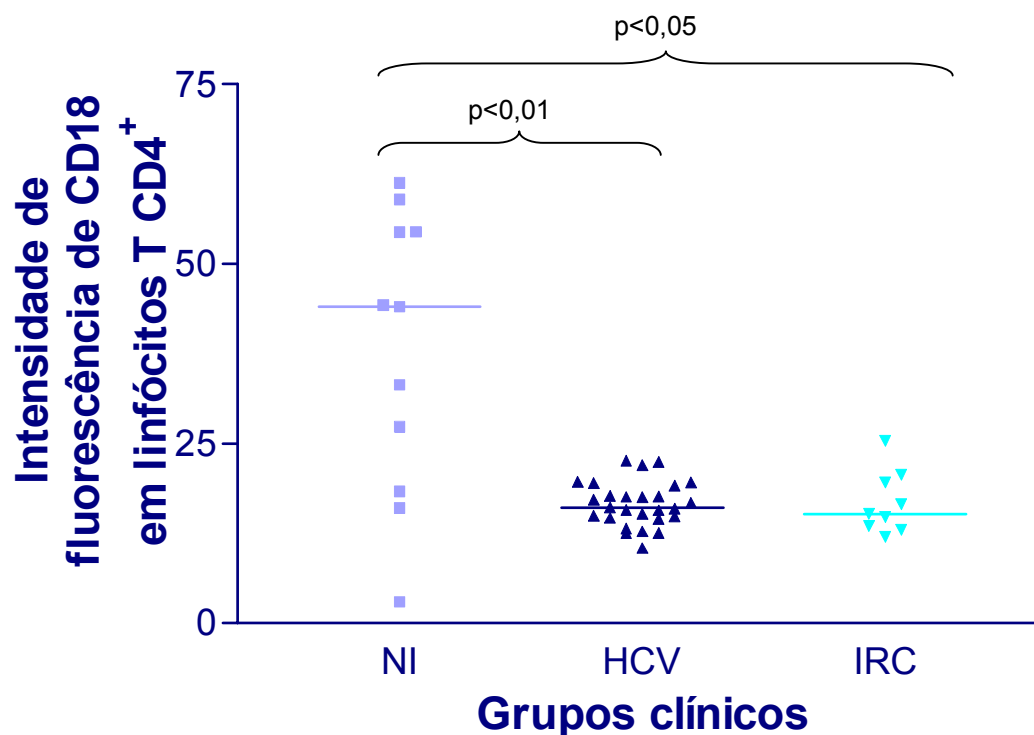


FIGURA 38. Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=11). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.2.2 Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos CD8⁺

Resultados semelhantes aos descritos na análise fenotípica foram encontrados na comparação das medianas da intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no *gate* de linfócitos CD8⁺, com diferença estatística entre os três grupos (teste Kruskal-Wallis, valor $p=0,0003$), e na comparação dos grupos de casos (HCV e IRC) em relação ao controle NI (FIG. 39). As medianas foram 27,65 (variando de 17,45 a 36,47) no grupo HCV, 25,19 (variando de 17,14 a 47,39) no grupo IRC e 63,71 (variando de 26,09 a 121,94) no grupo NI. Um *outlier* no grupo HCV (5,61) foi eliminado. A média da intensidade de fluorescência da expressão de CD18 no grupo HCV foi $27,574 \pm 5,374$, semelhante à do grupo IRC ($27,90 \pm 9,152$). A média do grupo NI foi $73,016 \pm 33,149$ (TAB. 8).

TABELA 9 - Análise descritiva dos dados de intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos CD8⁺

	NI (n=10)	HCV (n=27)	IRC (n=9)
Mínimo	26,09	17,45	17,14
Primeiro quartil	45,67	24,12	21,40
Mediana	63,72	27,65	25,19
Terceiro quartil	110,8	32,39	32,47
Máximo	121,9	36,47	47,39
Média	73,02	27,57	27,90
Desvio padrão	33,15	5,374	9,152
IC (95%)	49,30-96,73	25,45-29,70	20,87-34,94

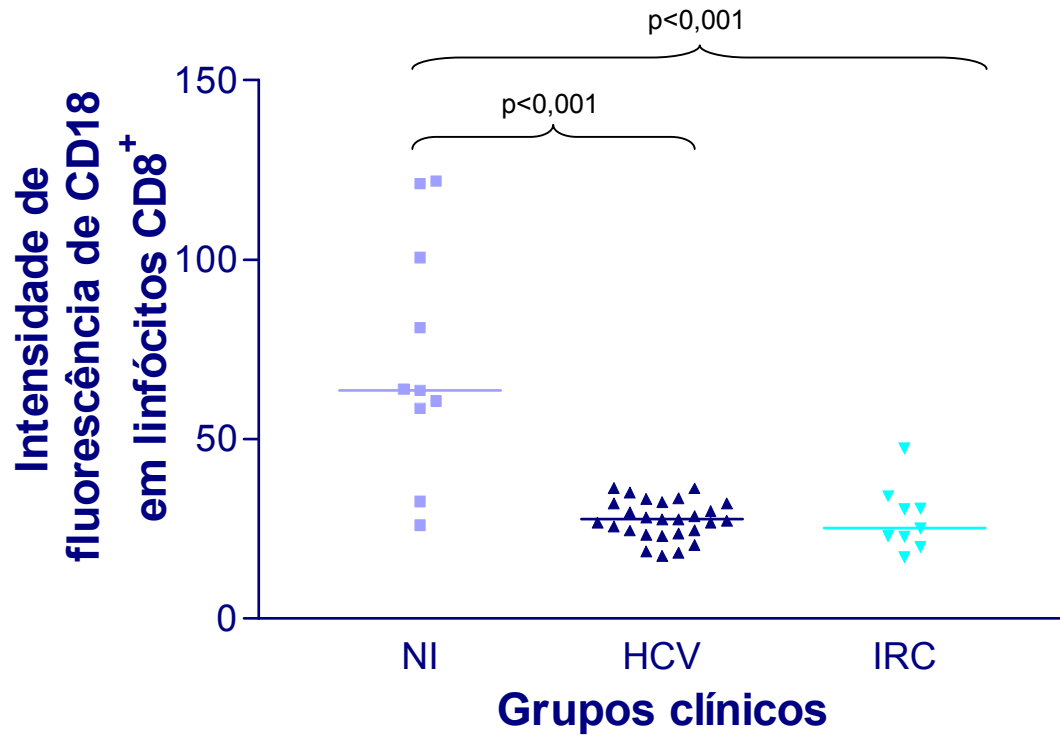


FIGURA 39. Intensidade de fluorescência de CD18 em linfócitos T CD8⁺ em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HCV (n=27), IRC (n=9) e não infectados (n=10). A população celular foi identificada em ensaio de dupla marcação, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 PE e anticorpos anti-CD18 FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como valores de intensidade de fluorescência e foram obtidos a partir da análise de linfócitos do sangue periférico. Diferenças estatisticamente significativas entre o grupo NI e os grupos HCV e IRC foram observadas. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

3.2.3 Percentual de linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺

As médias percentuais de células T CD4⁺ CD62L⁺ nos grupos avaliados foram de 72,04±9,940% (grupo HCV), 72,421±8,114% (grupo IRC) e 76,141±7,062% (grupo NI), sem diferença significativa entre eles. A mediana no grupo HCV foi de 74,45% (variação de 56,99 a 87,49%); no grupo IRC foi de 71,06% (variação de 57,56 a 86,70%) e, no grupo controle (NI), foi de 75,33% (variação de 61,70 a 85,61%) (FIG. 40). Houve baixa dispersão em torno das médias, com coeficiente de variação de 0,09, 0,13 e 0,11 para os grupos NI, HCV e IRC, respectivamente. Nenhum *outlier* foi detectado.

3.2.4 Intensidade de fluorescência de CD62L⁺ em linfócitos T CD8⁺

O percentual médio da intensidade de fluorescência de CD62L⁺ entre os linfócitos T CD8⁺ no grupo HCV foi de 49,296±15,269 (mediana 46,515), semelhante ao grupo IRC (54,869±10,197; p=0,28; mediana de 55,03) e ao do grupo NI, com percentual médio da intensidade de fluorescência de CD62L⁺ de 53,269±14,307 e mediana de 53,235 (FIG. 41). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados, nem valores atípicos nos grupos.

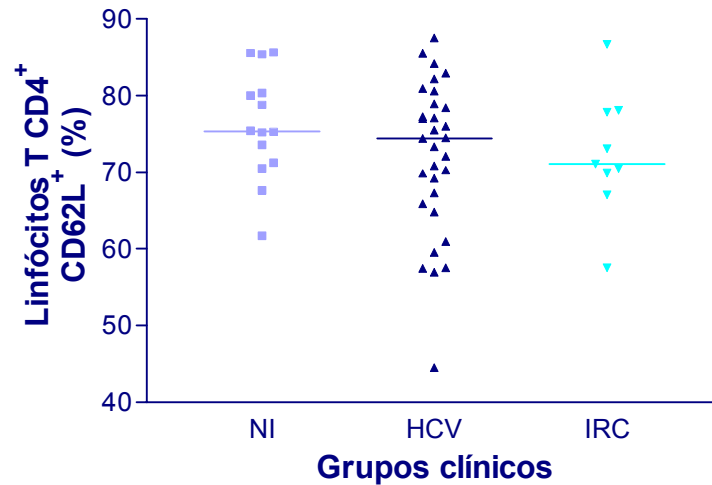


FIGURA 40. População de células T CD4⁺ CD62L⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=31) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD62L marcados com fluorocromo FITC e anti-CD4 marcados com fluorocromo PE. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

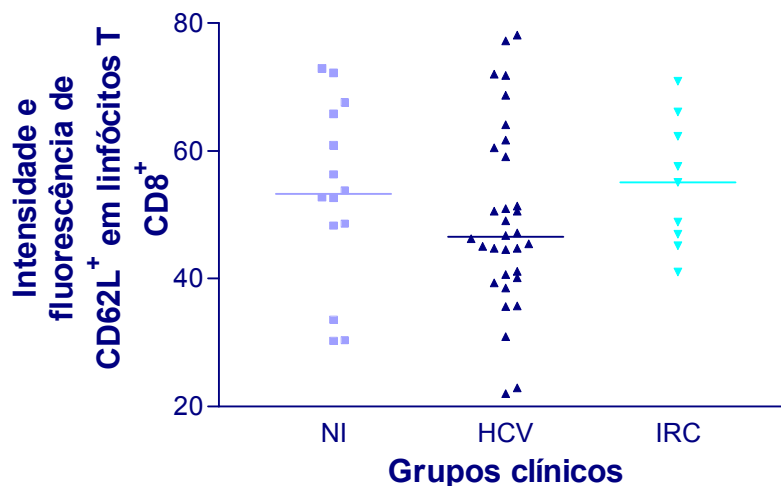


FIGURA 41. Intensidade de fluorescência de CD62L⁺ em linfócitos T CD8⁺ circulantes no sangue periférico de indivíduos não infectados (n=14), infectados pelo HCV (n=32) e infectados com IRC (n=9). As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD62L marcados com fluorocromo FITC e anti-CD8 marcados com fluorocromo PE. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV, IRC e o grupo NI. Método estatístico utilizado: teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

4. Correlação da frequência de linfócitos T ativados ($CD4+HLA-DR+$ e $CD8+HLA-DR+$) com aspectos fenotípicos dos linfócitos circulantes

4.1 Linfócitos T $CD4+HLA-DR+$ versus linfócitos NKT

Na investigação da correlação de Pearson entre a população de linfócitos T $CD4+HLA-DR+$ (eixo horizontal das Figuras 42, 43 e 44) e a população de linfócitos NKT (eixo vertical), observou-se que não houve correlação significativa no grupo NI ($p=0,09$). Tampouco foi notada correlação dessas populações de linfócitos nos grupos HCV e IRC.

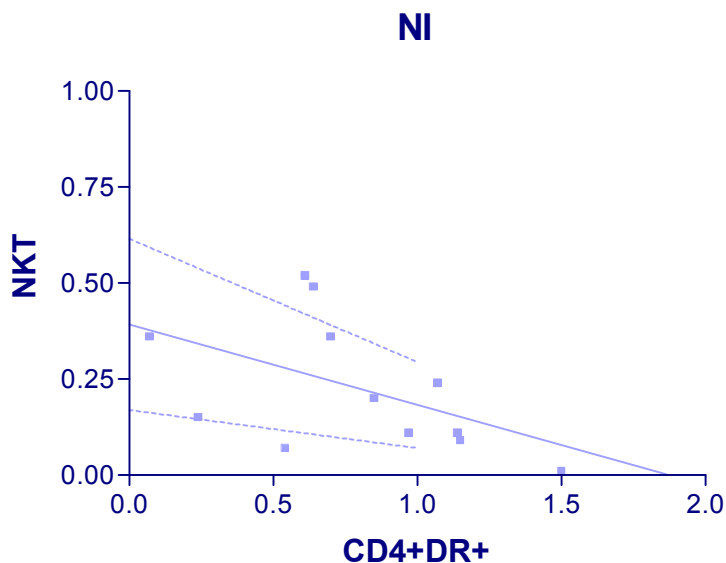


FIGURA 42. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo NI. Números de pares XY = 12, $r = -0,5045$, $P = 0,0944$ (NS).

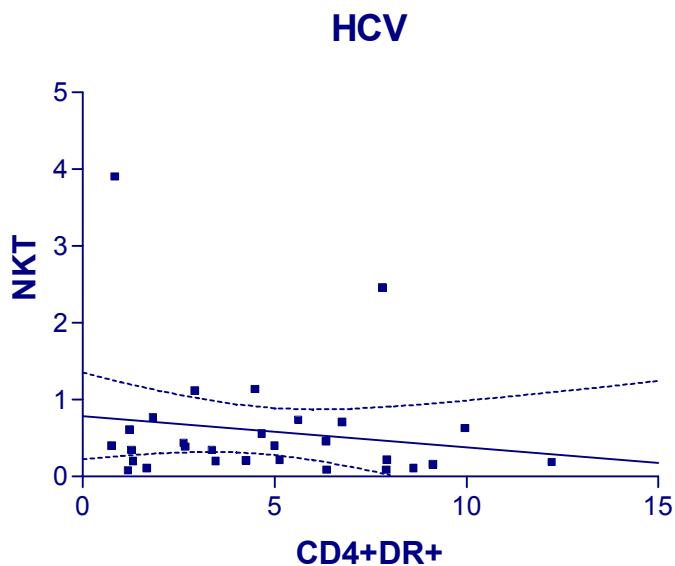


FIGURA 43. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo HCV. Números de pares XY = 29, $r = -0,1595$, $P = 0,4086$ (NS).

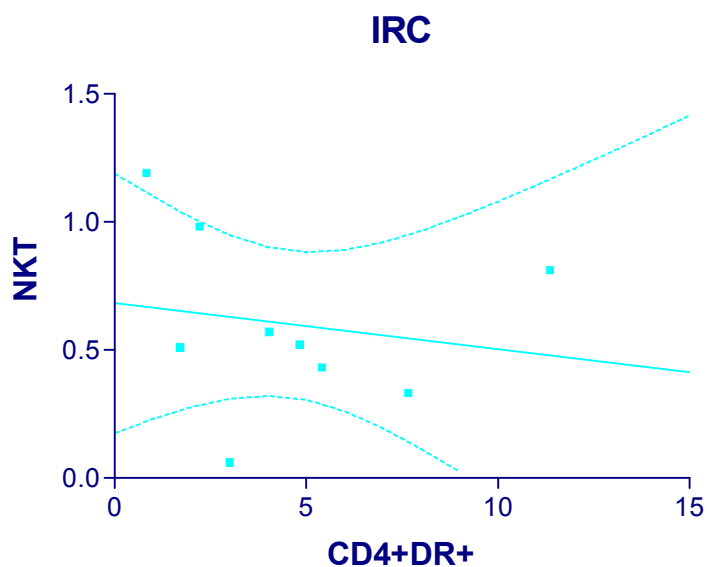


FIGURA 44. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e NKT no grupo IRC. Números de pares XY = 9, $r = -0,1714$, $P = 0,6593$ (NS).

4.2 *Linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD4⁺CD38⁺*

Na nova correlação da população de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) com a população de linfócitos T CD4⁺CD38⁺ (eixo vertical) (Figuras 45, 46 e 47), ou seja, duas populações de linfócitos T CD4⁺ marcadas por marcador de ativação celular, observou-se, pela correlação de Pearson, ausência de correlação significativa nos grupos não-infectado (p=0,08) e infectado (HCV e IRC).

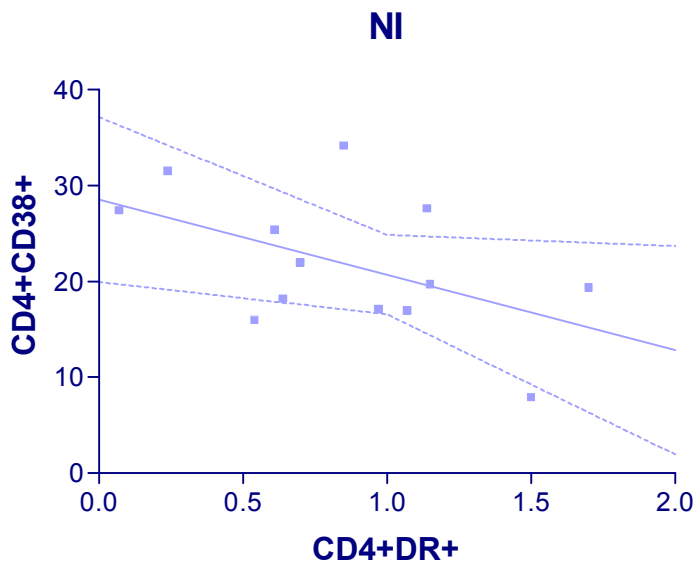


FIGURA 45. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD38^+$ no grupo NI. Números de pares XY = 12, $r = -0,5045$, $P = 0,0944$ (NS).

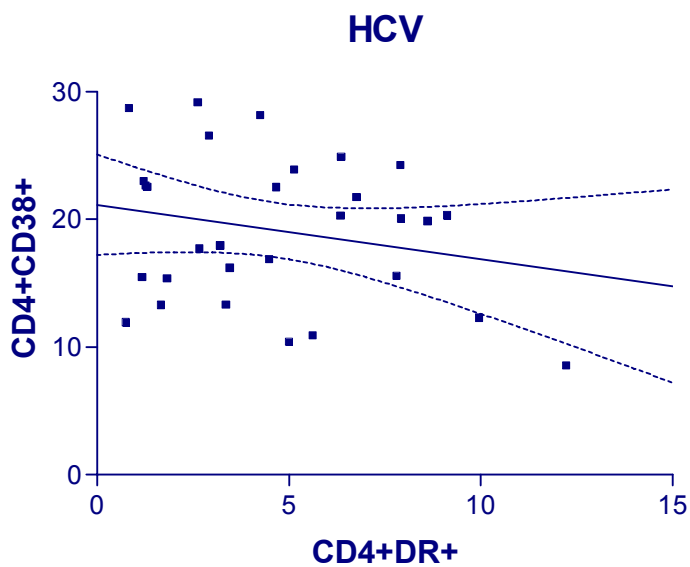


FIGURA 46. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD38^+$ no grupo HCV. Números de pares XY = 30, $r = -0,2277$, $P = 0,2263$ (NS).

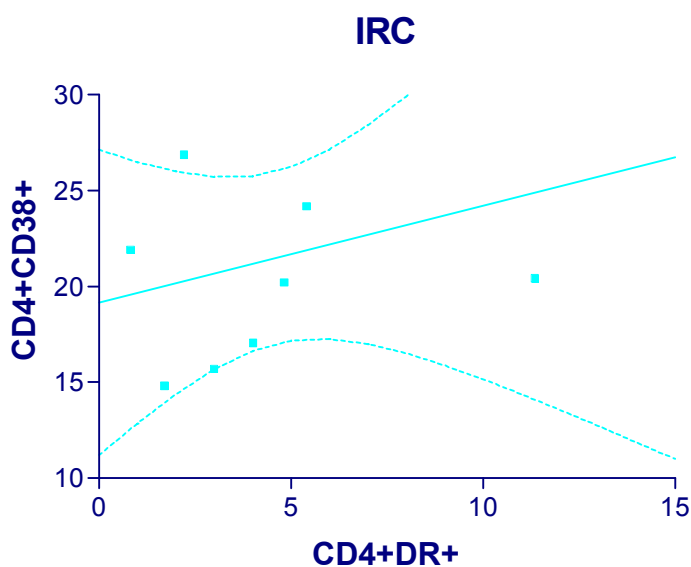


FIGURA 47. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD38^+$ no grupo IRC. Números de pares XY = 9, $r = 0,2980$, $P = 0,4361$ (NS).

4.3 *Linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD4⁺CD28⁻*

Seguindo-se no estudo de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) com a população de linfócitos T CD4⁺CD28⁻ (eixo vertical) (Figuras 48, 49 e 50), ou seja, população de linfócitos T CD4⁺ que não expressa marcador de ativação celular na membrana, também não se observou, pela correlação de Pearson, correlação entre essas populações de linfócitos T nos três grupos.

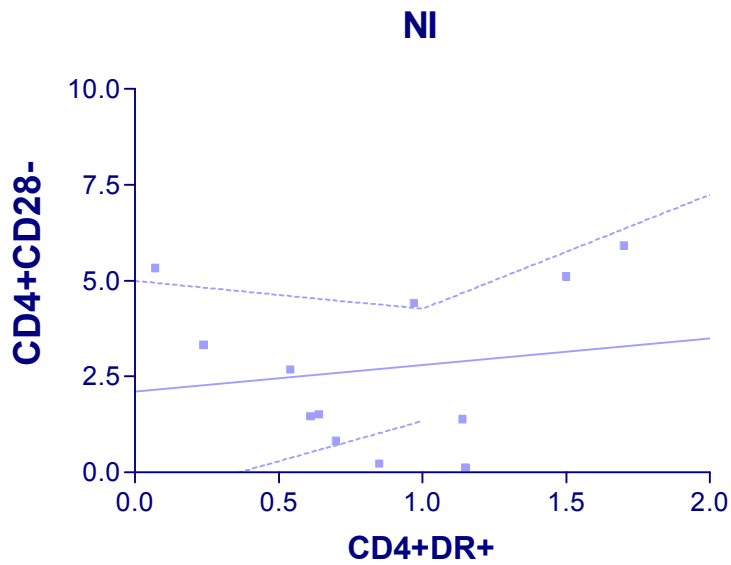


FIGURA 48. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD28^-$ no grupo NI. Números de pares XY = 12, $r = 0,1599$, $P = 0,6196$ (NS).

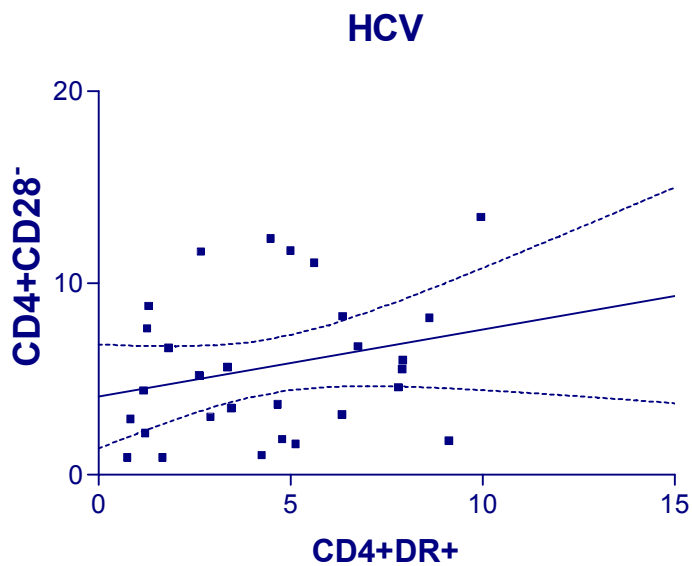


FIGURA 49. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD28^-$ no grupo HCV. Números de pares XY = 29, $r = 0,2588$, $P = 0,1753$ (NS).

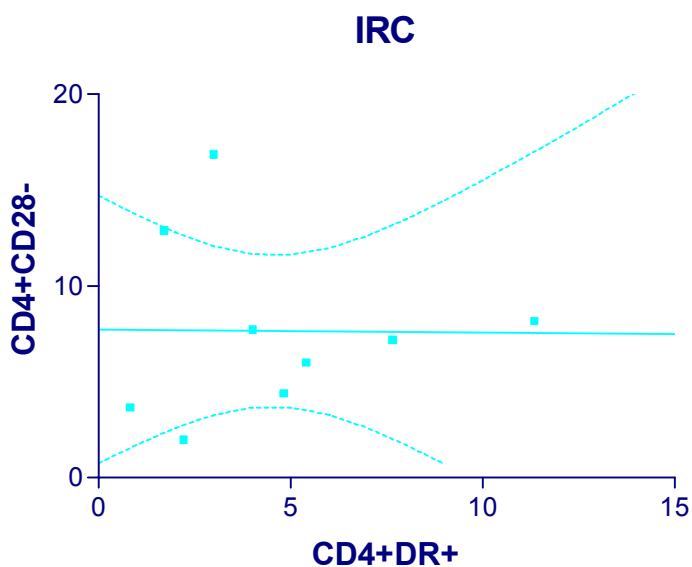


FIGURA 50. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD28^-$ no grupo IRC. Números de pares XY = 9, $r = -0,01182$, $P = 0,9759$ (NS).

4.4 *Linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD4⁺CD62L⁺*

Na correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺, que representam uma população ativada, e a população de CD4⁺CD62L⁺, ou marcadores de potencial migratório, pôde-se observar uma correlação negativa no grupo HCV ($r=-0,3795$; $p=0,0386$), sugerindo que, quanto maior a população de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺, menor a de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ (FIG. 52). Nos grupos NI e IRC não houve correlação estatística entre as variáveis (Figuras 51 e 53, respectivamente).

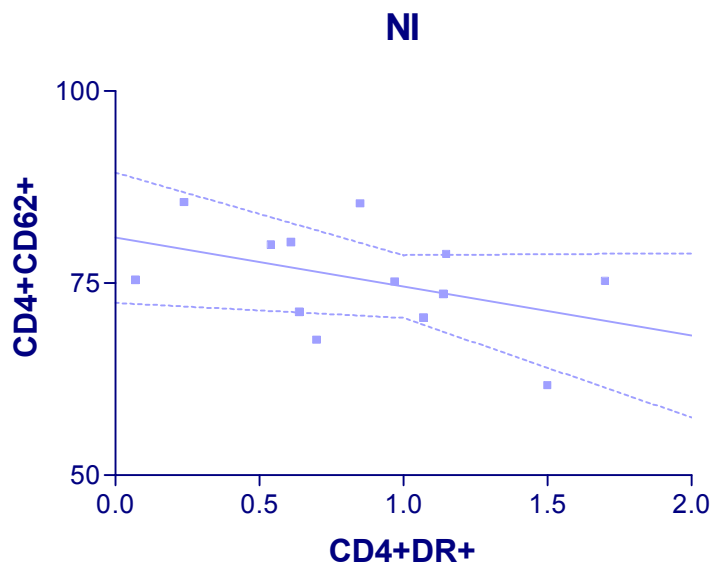


FIGURA 51. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD62L^+$ do grupo NI. Números de pares XY = 13, $r = -0,4345$, $P = 0,1379$ (NS).

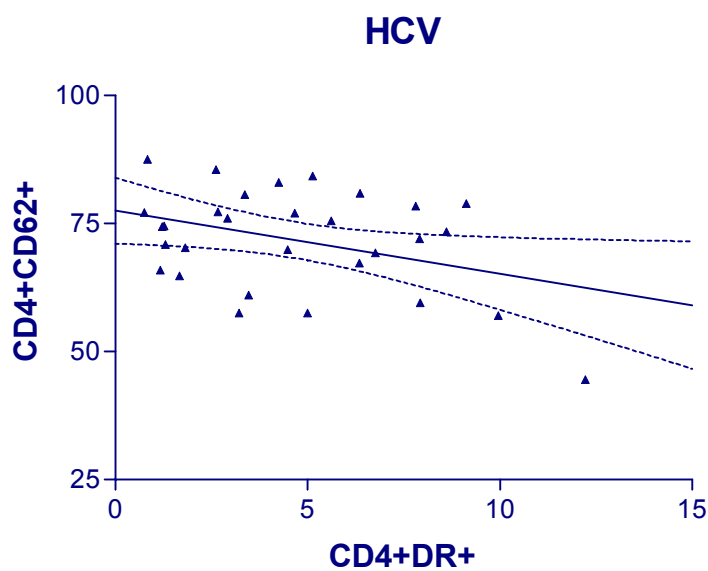


FIGURA 52. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD62L^+$ do grupo HCV. Números de pares XY = 30, $r = -0,3795$, $P = 0,0386$.

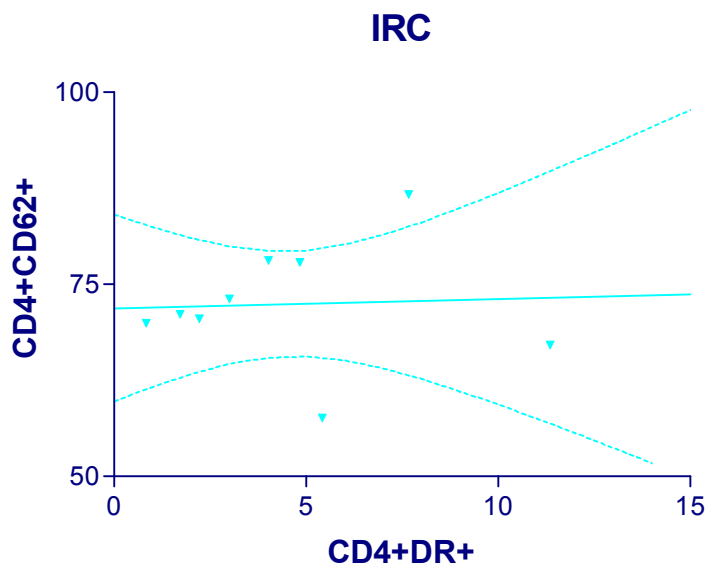


FIGURA 53. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+CD62L^+$ do grupo IRC. Números de pares XY = 9, $r = 0,04914$, $P = 0,9001$ (NS).

4.5 *Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos NK*

Na correlação entre a população de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) com a população de linfócitos NK (eixo vertical) (Figuras 54, 55 e 56), através da correlação de Pearson, pôde-se observar que não houve correlação estatisticamente significativa nos grupos controle não-infectado e IRC. Contudo, no grupo HCV, notou-se correlação positiva entre essas populações de linfócitos.

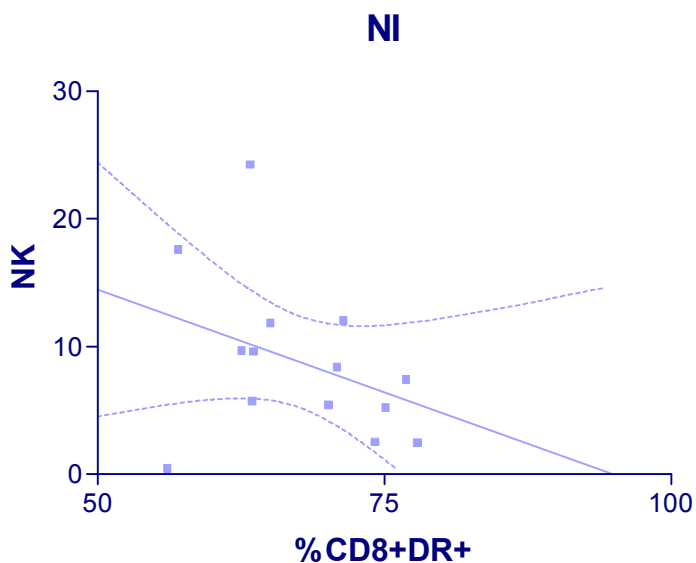


FIGURA 54. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NK. Números de pares XY = 14, $r = -0,3600$, $P = 0,2061$ (NS).

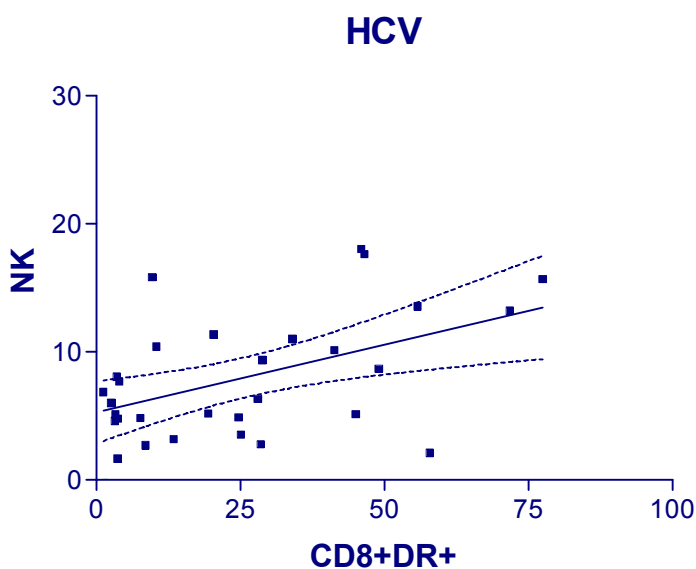


FIGURA 55. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NK . Números de pares XY = 30, $r = 0,4945$, $P = 0,0055$.

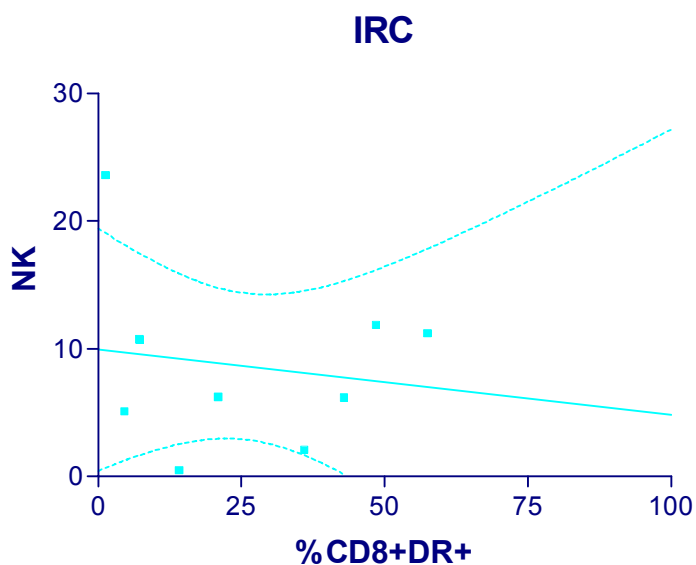


FIGURA 56. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NK . Números de pares XY = 9, $r = -0,1552$, $P = 0,6901$ (NS).

4.6 *Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos NKT*

Na correlação entre a população de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) e a população de linfócitos NKT (eixo vertical) (Figuras 57, 58 e 59), pela correlação de Pearson, pôde-se notar ausência de correlações estatisticamente significantes nos três grupos.

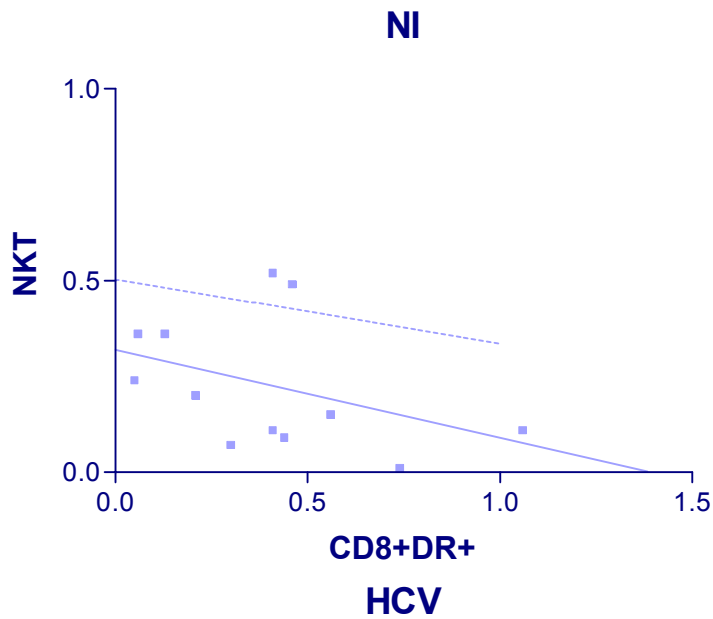


FIGURA 57. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NKT. Números de pares XY = 12, $r = -0,3972$, $P = 0,2011$ (NS).

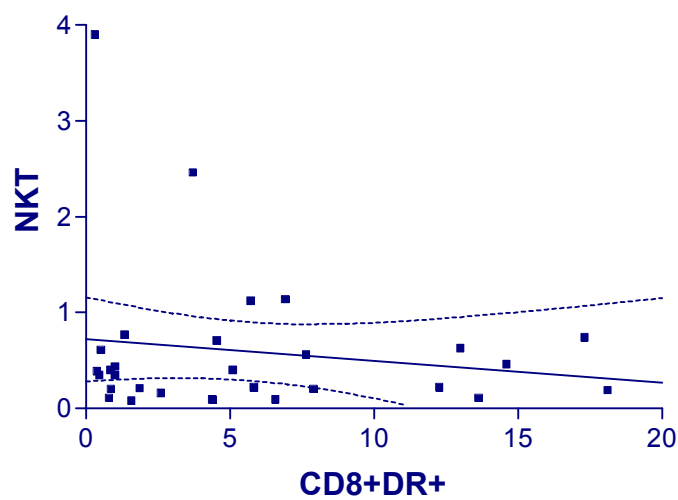


FIGURA 58. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NKT . Números de pares XY = 29, $r = -0,1537$, $P = 0,4261$ (NS).

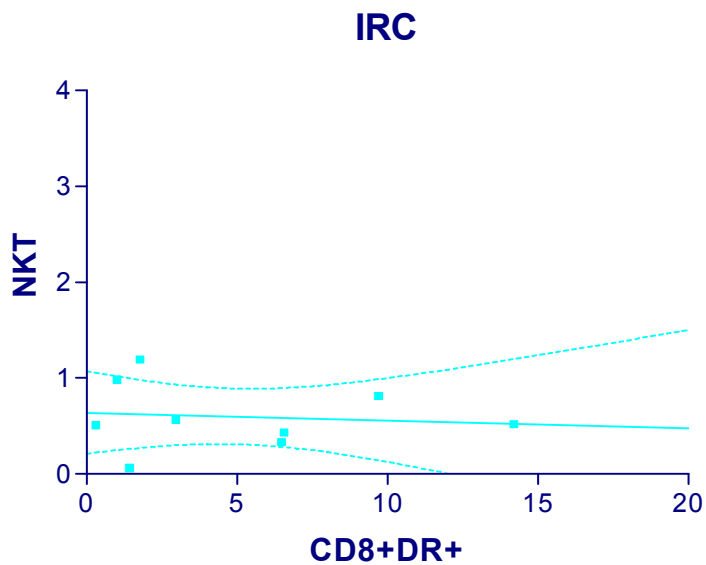


FIGURA 59. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e NKT . Números de pares XY = 9, $r = -0,1093$, $P = 0,7796$ (NS).

4.7 Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺

No estudo das populações de linfócitos T CD8 e CD4 marcados com HLA-DR nos três grupos clínicos, observaram-se correlações positivas em todos os grupos, mas com significância estatística apenas nos grupos HCV e IRC. As Figuras 60, 61 e 62 representam graficamente os valores de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal, em percentual) e de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ (eixo vertical, em percentual) dos grupos NI, HCV e IRC. As linhas tracejadas representam o intervalo de confiança de 95%.

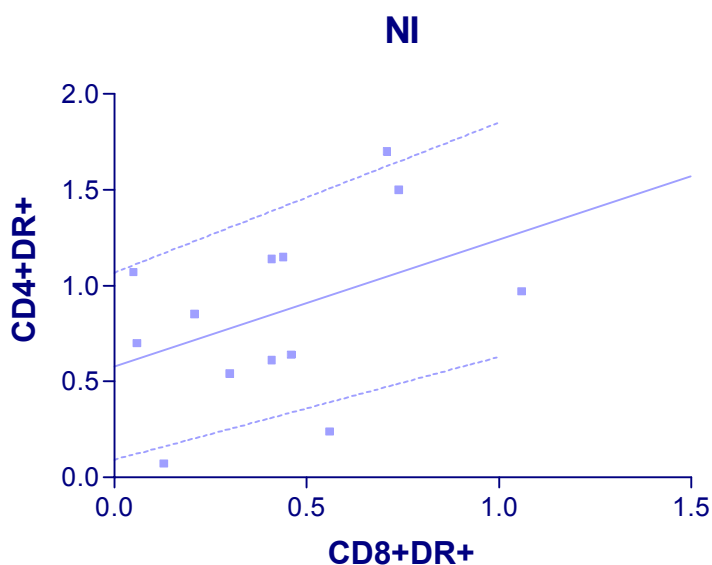


FIGURA 60. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD4^+HLA-DR^+$. Números de pares XY = 13, $r = 0,4166$, $P = 0,1567$ (NS).

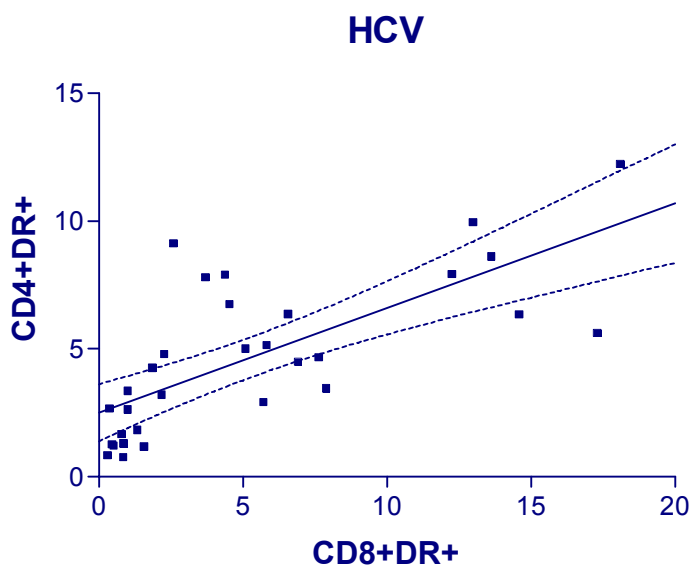


FIGURA 61. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD4^+HLA-DR^+$. Números de pares XY = 31, $r = 0,7221$, $P < 0,0001$.

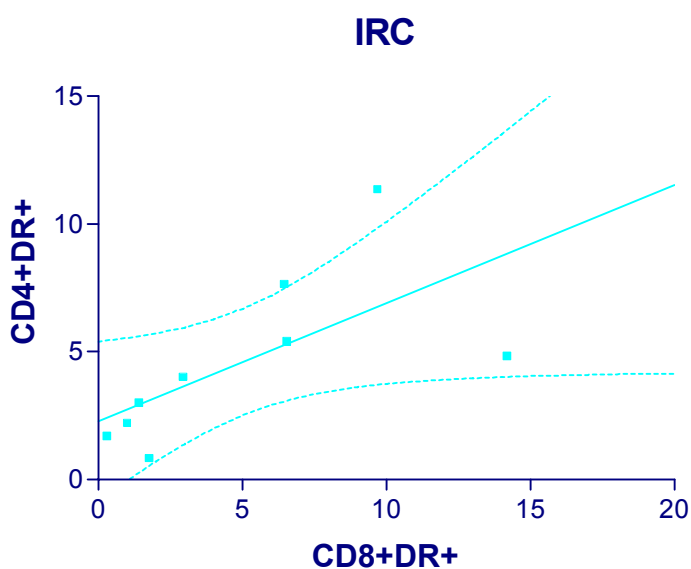


FIGURA 62. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD4^+HLA-DR^+$. Números de pares XY = 9, $r = 0,6603$, $P = 0,05$.

4.8 Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD8⁺CD38⁺

Na correlação de Pearson das populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) com as populações de linfócitos CD8⁺CD38⁺ (eixo vertical) (Figuras 63, 64 e 65), expressas em percentual, observou-se ausência de correlação estatisticamente significativa no grupo controle não-infectado ($r = 0,1501$, $p = 0,6245$) e nos dois grupos de pacientes cronicamente infectados pelo HCV: $r = 0,1775$ e $p = 0,3571$ para o grupo HCV; $r = 0,03860$ e $p = 0,9215$ para o grupo IRC.

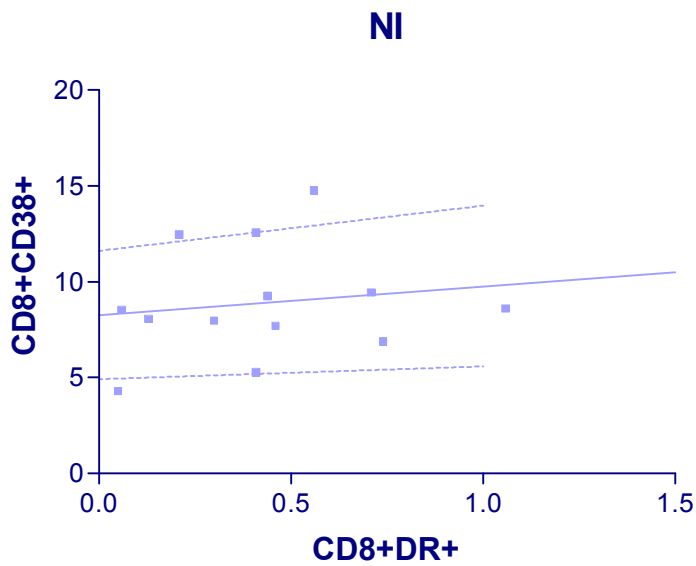


FIGURA 63. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD38^+$. Números de pares XY = 13, $r = 0,1501$, $P = 0,6245$ (NS).

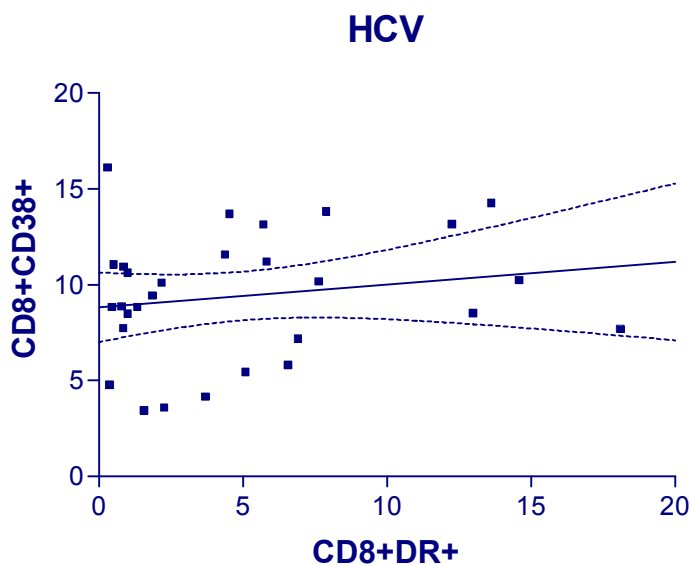


FIGURA 64. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD38^+$. Números de pares XY = 29, $r = 0,1775$, $P = 0,3571$ (NS).

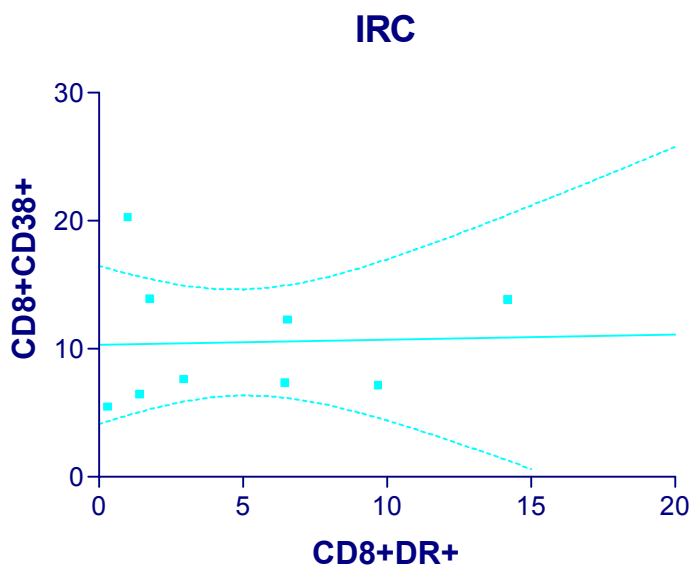


FIGURA 65. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD38^+$. Números de pares XY = 9, $r = 0,03860$, $P = 0,9215$ (NS).

4.9 *Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD8⁺CD28⁻*

Seguindo no estudo de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ (eixo horizontal) e correlacionando com a população de linfócitos T CD8⁺CD28⁻ (eixo vertical) (Figuras 66, 67 e 68), ou seja, uma população de linfócitos T CD8⁺ que não expressa marcador de ativação celular na membrana, através da correlação de Pearson, não se observou correlação entre essas populações de linfócitos T nos grupos NI e IRC; contudo, houve uma correlação positiva no grupo HCV ($r= 0,6587$; $p<0,0001$; IC 95%= 0,3969 a 0,8214).

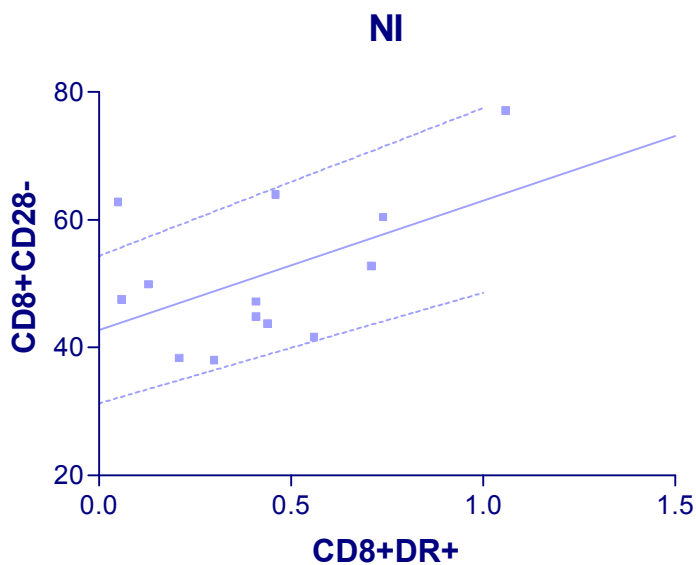


FIGURA 66. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 13, r = 0,5102, P= 0,0748 (NS).

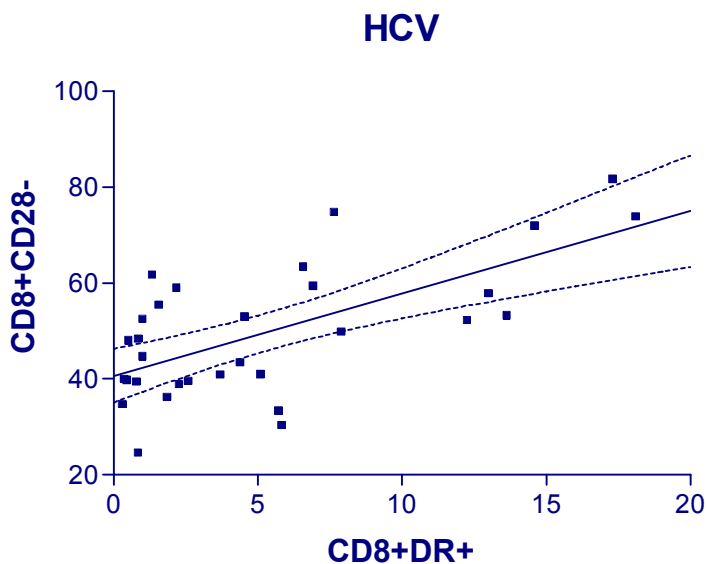


FIGURA 67. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 31, r = 0,6587, P<0,0001 .

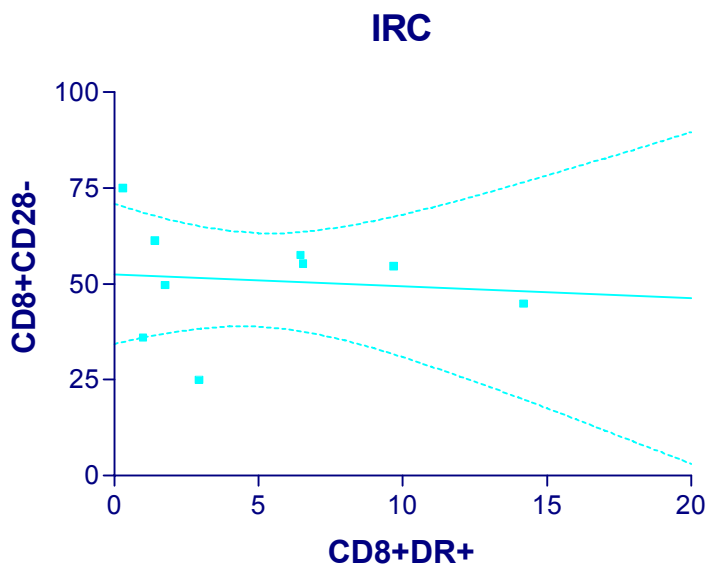


FIGURA 68. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD28⁻. Números de pares XY = 9, r = -0,1009, P= 0,7963 (NS).

4.10 *Linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ versus linfócitos T CD8⁺CD62L⁺*

No estudo da correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺CD62L⁺, observou-se correlação negativa no grupo HCV ($r=-0,6430$; $p<0,0001$), podendo-se sugerir que, quanto maior for a população de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺, menor será a de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ (FIG. 70). Nos grupos NI e IRC, a despeito de uma correlação positiva entre as populações de linfócitos T CD8⁺, não houve diferença estatística (Figuras 69 e 71, respectivamente).

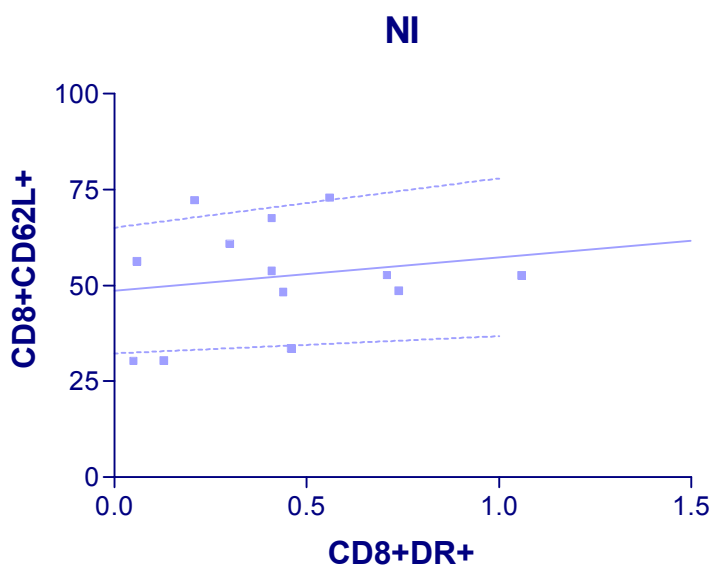


FIGURA 69. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD62L^+$. Números de pares XY = 13, $r = 0,1753$, $P = 0,5667$ (NS).

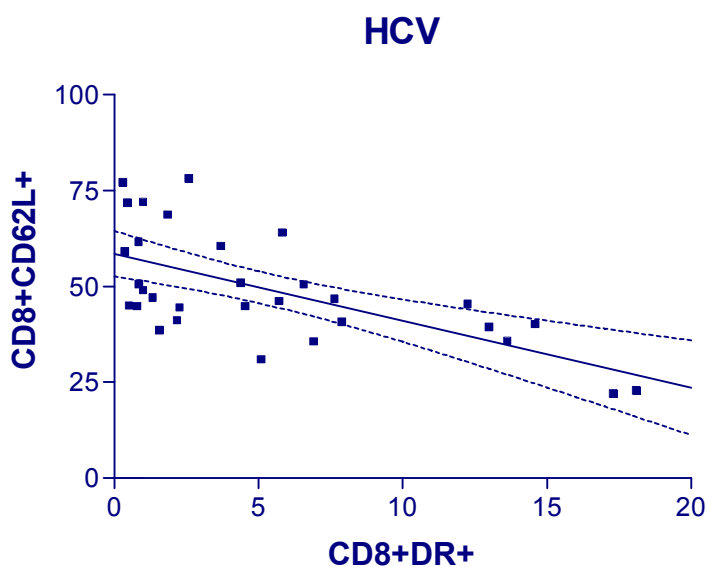


FIGURA 70. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD62L^+$. Números de pares XY = 31, $r = -0,6430$, $P < 0,0001$.

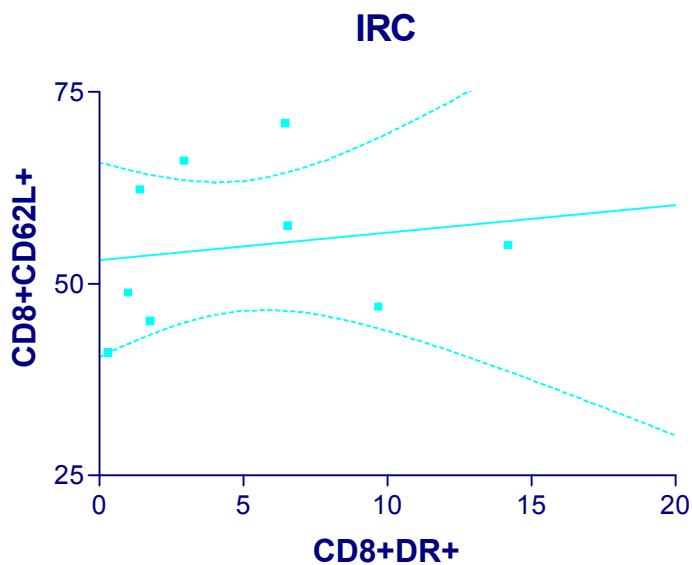


FIGURA 71. Correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD62L^+$. Números de pares XY = 9, $r = 0,1651$, $P = 0,6713$ (NS).

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Na hepatite C, o sistema imune do hospedeiro desempenha um papel duplo, participando tanto da limitação da replicação do HCV, como do estabelecimento da lesão tecidual, conforme sugerido por Cheney *et al.* (2000). Assim, na infecção crônica pelo HCV, a resposta imune celular está implicada na lesão hepatocelular, além de ser fator determinante para a cronificação da doença e a resistência ao tratamento antiviral (Cacciarelli *et al.*, 1996; Edwards-Smith *et al.*, 1999).

Nesta investigação, puderam-se comprovar diferenças significativas na resposta imune à infecção crônica pelo HCV, ao se compararem pacientes portadores de hepatite C crônica com indivíduos sadios e não infectados. Também se demonstrou que há diferentes respostas imunes entre pacientes portadores de vírus C com função renal preservada, comparados àqueles portadores de hepatite C e insuficiência renal crônica em hemodiálise, sugerindo que o comportamento imune distinto desses pacientes pode ter influência na evolução clínica mais favorável da hepatite C, conforme tem sido sugerido na atualidade, como o menor dano hepático e os níveis de transaminases (Huraib *et al.*, 1999; Sterling *et al.*, 1999), além de melhor resposta terapêutica ao interferon alfa recombinante (Casanovas-Taltavull *et al.*, 2001; Fabrizi *et al.*, 2003).

A função da imunidade inata na hepatite C não é, ainda, completamente, conhecida, a despeito do conhecimento de que as células NK e NKT participam da resposta imune na infecção pelo vírus da hepatite C (Freemann *et al.*, 2001). Assim, tem-se reconhecido que as células NK são as células imunológicas predominantes no fígado na ausência de infecção (Doherty e O'Farrelly, 2000) e constituem a primeira linha de defesa contra vírus. Nesta investigação, na avaliação da imunidade inata através do estudo da população de linfócitos NK, não se encontraram diferenças nos três grupos (NI, HCV e IRC) em relação às populações médias de linfócitos NK no sangue periférico. Como não observamos, nos pacientes infectados pelo HCV, uma maior população de células NK, pode-se supor que este seja um dos possíveis fatores para explicar a evolução dos pacientes para a doença crônica. Essa hipótese é fundamentada na afirmação de Ahmad e colaboradores (2004), de que a ativação das células NK exerce um papel essencial no recrutamento de células T e na eliminação dos hepatócitos infectados.

Nesta pesquisa, tampouco se observou diferença significativa entre as populações de células NKT, que usualmente funcionam como 'ponte' entre a imunidade inata e a adquirida, a despeito de os dois grupos infectados, os portadores de hepatite C e aqueles com hepatite C e IRC, terem apresentado uma população média de células NKT igual a 0,6%, duas vezes maior do que a observada no grupo controle (0,3%), provavelmente devido a amostra pequena de pacientes avaliados. Essas células, apesar de serem encontradas em pequeno número no sangue periférico, têm sido relatadas como abundantes no fígado (Exley *et al.*, 2004).

No estudo do fenótipo de leucócitos responsáveis pela imunidade adaptativa (linfócitos T e B), não observamos diferenças significantes nas populações dessas células entre os controles e os pacientes infectados pelo HCV. Os grupos estudados apresentaram percentuais de linfócitos T totais próximos a 68%, com LT CD4⁺ de 43 a 44% e LT CD8⁺ de 22 a 24%. Resultado semelhante foi observado nas populações de linfócitos B, que variaram de 11 até 14%, e de linfócitos B1, com médias populacionais de 1,5% nos controles e de 2,3 e 3,3% nos grupos HCV e IRC, respectivamente. Entre os LB, na fração de linfócitos B1, observamos uma maior subpopulação celular (15%) nos grupos HCV e IRC que no grupo controle (9%), contudo, sem significância estatística. Resultado semelhante foi relatado por Duesberg *et al.* (2001). Os autores compararam 29 pacientes com hepatite C crônica a 20 controles sadios e não observaram diferenças entre as populações de NK, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B. Da mesma forma, a relação CD4/CD8, próxima de 2:1, encontrada nesta pesquisa, é semelhante à descrita na literatura (Kurz *et al.*, 1986).

No estudo das populações de monócitos HLA-DR⁺⁺ (ativados), observamos populações semelhantes nos grupos controle, HCV e IRC, com variações entre 62 a 68% dos monócitos. Entretanto, ao se empregar o CD38 como marcador de ativação celular de monócitos, pôde-se observar que os pacientes portadores de IRC apresentaram valores significativamente menores do que os encontrados nos grupos controle e infectados crônicos com o vírus C, sendo que esses últimos não diferiram entre si. Essa menor população de monócitos

CD38⁺ do grupo IRC foi a única diferença observada entre os dois grupos infectados pelo vírus da hepatite C. Ainda, no estudo da resposta inata, não se comprovou diferença nas populações de eosinófilos ativados (CD38⁺) dos três grupos. A população de neutrófilos CD38⁺ do grupo controle foi estatisticamente maior que nos grupos cronicamente infectados, mas não entre aqueles pacientes com hepatite C com ou sem IRC.

As moléculas de ativação celular HLA-DR e CD38 e de co-estimulação CD28 também foram estudadas em populações de linfócitos T (imunidade adaptativa). Não houve diferença na expressão de CD38 e CD28 nas populações de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺, assim como em suas frações, nos grupos de pacientes avaliados. Observou-se que os grupos de pacientes com hepatite C crônica apresentam maiores populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ do *gate* de linfócitos, além das respectivas frações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺, entre os linfócitos T CD4⁺, e de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺, entre os linfócitos T CD8⁺, quando comparadas aos valores do grupo controle NI.

Rocco e colaboradores (1996) também observaram maior expressão do HLA-DR em populações de linfócitos de pacientes com hepatite C crônica, a despeito do estágio da lesão hepática. Conforme sugerido por Tsai *et al.* (1997), que observaram que de 40 a 80% das células CD4⁺ presentes no infiltrado inflamatório hepático expressam marcadores de ativação, a persistência viral pode estar associada ao fato de que apenas um por cento dessas células é específica para antígenos do HCV.

Na presente investigação, de 8 a 11% dos linfócitos T CD4⁺ em sangue periférico dos pacientes com hepatite C crônica estavam ativados, contrapondo-se à média de 2% de ativação encontrada no grupo controle. Esses resultados reforçam a hipótese de que a ativação dos linfócitos T CD4⁺ é ineficiente para o controle da infecção. A fração de linfócitos T CD8⁺ ativados representou, em média, 25% dos linfócitos T CD8⁺ nos grupos HCV e IRC, cerca de 10 vezes superior ao grupo NI. Esse fato pode sugerir que a citotoxicidade mediada pelas células T desempenha função importante na gênese da lesão hepatocelular, conforme foi também sugerido por Ballardini *et al.* (1995), que demonstraram significativa correlação entre o número de células CD8⁺ e os níveis séricos de alaninaminotransferases.

A ativação de linfócitos T envolve uma complexa interação com as células apresentadoras de antígenos (APC). Um segundo sinal co-estimulador é necessário para a completa ativação dessas células (Lenschow *et al.*, 1996). A participação da molécula CD28 é fundamental como evento co-estimulador (Linsley *et al.*, 1990). Os resultados demonstraram que a fração de linfócitos T CD4⁺ que não expressa a molécula co-estimuladora CD28 foi superior nos grupos HCV e IRC comparados aos indivíduos não infectados. Maki *et al.* (2004) sugerem que a baixa expressão de CD28 em linfócitos tem relação com o estado imunossupressor, o que poderia predispor os portadores crônicos do vírus C ao carcinoma hepatocelular. Em situações em que os eventos de co-estimulação via CD28/B7 são bloqueados, observam-se fenômenos de anergia

celular. Não observamos diferenças, entre os grupos avaliados, na população de linfócitos T $CD8^+CD28^-$, que são células T regulatórias (Treg) maduras, em sangue periférico, responsáveis pela imunotolerância a antígenos do hospedeiro, que se desenvolvem como consequência da ativação de células T maduras sob certas circunstâncias, como a presença de TGF- β , exposição antigênica sub-ótima e/ou co-estimulação (Baecher-Allan *et al.*, 2004).

O processo inflamatório na hepatite C crônica envolve mecanismos imunológicos, como a adesão de linfócitos ao endotélio vascular hepático, o extravasamento celular ou diapedese e a adesão celular aos hepatócitos. Estudos têm demonstrado que o processo de migração celular para o foco inflamatório envolve uma série de interações celulares mediada, em parte, por moléculas de adesão, como as L-selectinas, importantes no recrutamento celular para o foco inflamatório.

Os estudos do papel da expressão diferencial de moléculas de adesão em populações celulares com potencial de migração para o foco inflamatório no compartimento hepático ainda são escassos. Banner e colaboradores (1997) demonstraram, em portadores de hepatite C crônica, um aumento na expressão de moléculas de adesão pelas células do estroma portal. Na investigação da expressão de moléculas de adesão (CD18 e CD62L) em células da imunidade inata, notamos que a expressão de CD18 em eosinófilos, monócitos e em neutrófilos nos grupos HCV e IRC foi menor do que a observada no grupo controle, assim como a de neutrófilos CD62L. Não houve diferenças na expressão do CD62L em populações de eosinófilos. No grupo

IRC, a fração de monócitos CD62L foi inferior à do grupo controle, mas não diferiu do grupo HCV, que, por sua vez, não apresentou diferença em relação ao grupo controle. O grupo IRC teve menor expressão do marcador de ativação de monócitos (CD38⁺) e da L-selectina. Esse fato sugere que a migração dessas células para o foco inflamatório pode não ser contínua, o que ocorre, possivelmente, pelo clareamento viral durante o processo de hemodiálise. Essas moléculas também foram estudadas em populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, com diferenças significantes entre as intensidades de fluorescência de CD18, sendo menores nos pacientes infectados comparados aos controles negativos, mas não nas populações de linfócitos com marcador CD62L.

No estudo da correlação de Pearson entre as populações de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e as subpopulações de linfócitos circulantes, notou-se correlação negativa em relação aos linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ no grupo HCV, ($r=-0,3795$; $p=0,039$), fato não observado nos demais grupos. Esse fato sugere que, a despeito da ativação, havia diminuição da adesão dos leucócitos ao endotélio vascular e do recrutamento dos linfócitos T CD4⁺ para o foco inflamatório, fatores que podem auxiliar na persistência da infecção viral.

Na análise de correlação da população de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ com as subpopulações de linfócitos circulantes, é importante salientar a associação positiva com CD4⁺HLA-DR⁺ observada no grupo IRC ($r=0,6603$; $p=0,05$) e no grupo HCV ($r=0,7221$; $p<0,0001$). Isso pode significar a ativação dessas populações celulares no curso da infecção crônica pelo HCV. Além disso, no grupo HCV pôde-se observar maior número de associações estatisticamente

significantes. A associação positiva observada entre $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+NK$ ($r=0,4945$; $p=0,0055$) pode ser compatível com maior dano tissular nesses indivíduos. Já a associação positiva entre $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD28^-$ ($r=0,6587$; $p<0,0001$) e negativa entre $CD8^+HLA-DR^+$ e $CD8^+CD62L^+$ ($r=-0,6430$; $p<0,0001$), fatos não observados no grupo IRC, sugere que, no grupo HCV, a despeito de estarem ativadas, as células T $CD8^+$ apresentavam anergia celular e menor adesão celular. Esses achados podem ter implicações na menor resposta terapêutica ao interferon recombinante.

Para a finalidade didática, a Figura 72 ilustra as principais diferenças encontradas nesta investigação, entre os grupos HCV e IRC, comparados com controles negativos. Novas investigações, a partir dessas diferenças, deverão contribuir para a maior compreensão dos mecanismos imunes associados à infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Os benefícios desses conhecimentos serão irrefutáveis para os pacientes e constituem um dos principais desafios da hepatologia na próxima década.

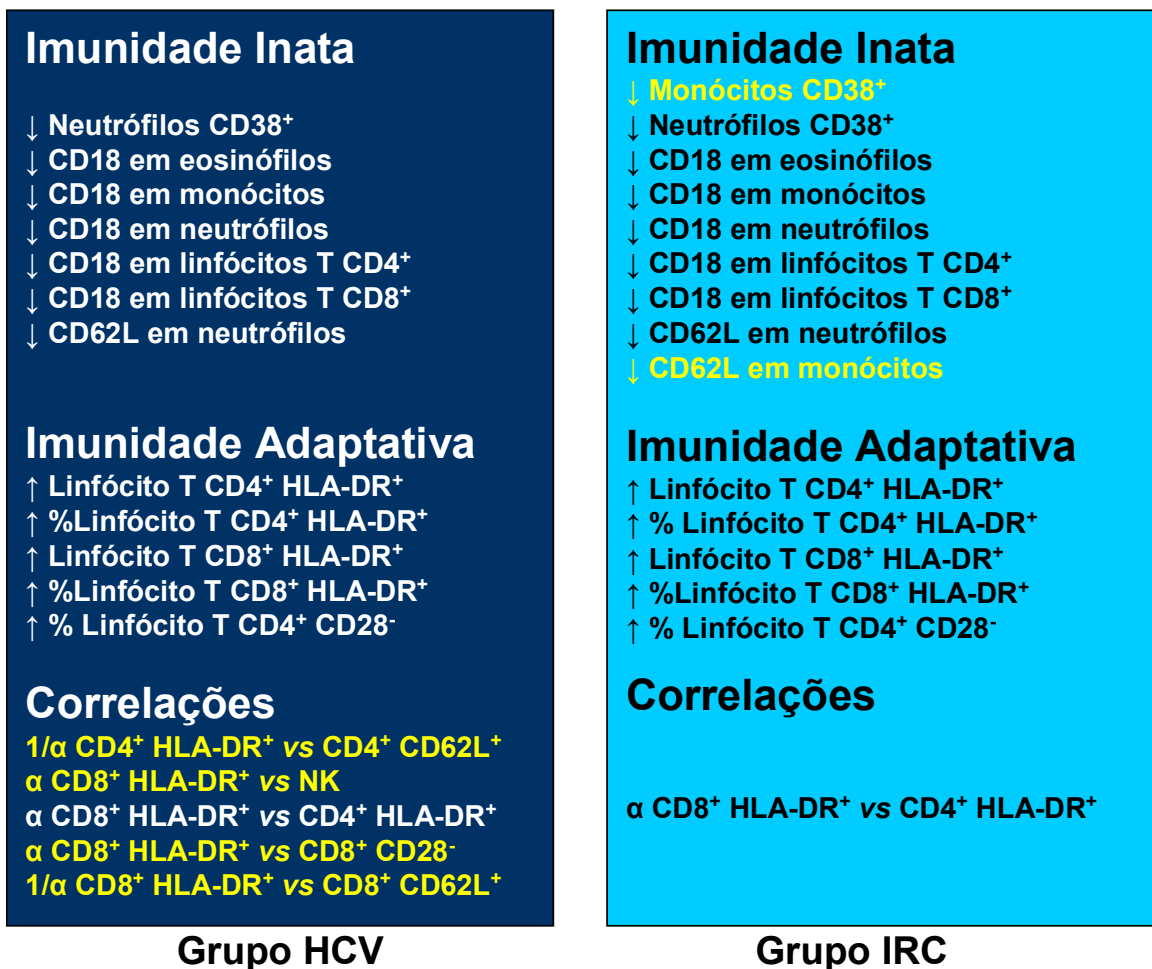


FIGURA 72. Resumo dos parâmetros imunológicos que apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos HCV e IRC em relação ao grupo NI e das correlações significativas das freqüências de linfócitos T ativados (CD4⁺HLA-DR⁺ e CD8⁺HLA-DR⁺) com aspectos fenotípicos dos linfócitos circulantes nos grupos HCV e IRC. Diferenças seletivas de um dado grupo clínico encontram-se destacadas em amarelo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A análise dos aspectos fenotípicos da imunidade inata e adaptativa de portadores de hepatite C crônica revelou diferenças significativas em relação a indivíduos não infectados. Essas diferenças são consistentes com os mecanismos imunopatogênicos descritos e em investigação, desencadeados pela infecção pelo HCV.

A despeito de não terem sido observadas, nesta investigação, diferenças na frequência de populações e subpopulações majoritárias de leucócitos circulantes entre os grupos clínicos avaliados, a análise de marcadores fenotípicos envolvidos em eventos de ativação, co-estimulação e migração celular permitiu identificar claramente um perfil imunofenotípico de caráter inflamatório misto na infecção crônica pelo vírus C, com envolvimento simultâneo de células da imunidade inata e adaptativa, independentemente do comprometimento renal.

Pacientes com hepatite C crônica, independentemente do comprometimento renal, apresentam menor expressão de CD62L em neutrófilos e maiores frequências paralelas de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados (HLA-DR⁺) e de linfócitos T CD4⁺CD28⁻, quando comparados aos controles não infectados. A menor expressão de CD18 por células da imunidade inata e adaptativa sugere a possível migração de células CD18⁺ para focos inflamatórios teciduais.

Um maior número de correlações entre a frequência de linfócitos T ativados ($CD4^+HLA-DR^+$ e $CD8^+HLA-DR^+$) com aspectos fenotípicos dos leucócitos circulantes, observado em indivíduos portadores de hepatite C sem comprometimento renal, poderá contribuir para explicar o maior comprometimento hepático observado nesses pacientes, quando comparados àqueles portadores de hepatite C e insuficiência renal crônica em hemodiálise. A correlação direta entre a frequência de células $CD8^+HLA-DR^+$ e linfócitos NK é compatível com maior gravidade da lesão hepática nesses indivíduos. A associação inversa entre a frequência de células $HLA-DR^+$ e a expressão de $CD62L^+$ por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ pode ser indicadora fenotípica de ativação persistente e contínua.

Consistentes com uma atividade inflamatória imunomodulada, alguns aspectos fenotípicos seletivos observados em pacientes portadores de hepatite C e insuficiência renal crônica, como a menor fração de monócitos $CD38^+$ e $CD62L^+$, sugerem a possível participação dessas células apresentadoras de antígeno em eventos imunomodulares.

PROPOSIÇÕES

PROPOSIÇÕES

Em razão da grande complexidade da hepatite C crônica e da conhecida variabilidade evolutiva entre os indivíduos infectados, atribuída a diversos fatores virais e do hospedeiro, investigações posteriores deverão correlacionar as populações de leucócitos descritas neste estudo em subgrupos de pacientes com características clínicas e laboratoriais semelhantes.

Outro aspecto importante a ser investigado é a relação entre a resposta imune e a resposta virológica ao tratamento da hepatite C crônica, com base no conhecimento atual de que os medicamentos utilizados, interferon peguilado e ribavirina, possuem ação imunomoduladora.

Conforme vem sendo amplamente discutido na literatura médica, a progressão da fibrose hepática está associada a fatores do hospedeiro, e não a fatores virais. Portanto, outros fatores do hospedeiro, como a idade e o perfil de resposta imune em resposta à infecção viral, nas fases aguda e crônica da infecção, requerem mais investigações.

As manifestações extra-hepáticas e os fenômenos auto-imunes, freqüentes nos portadores de hepatite C crônica, têm sido atribuídos às respostas imunes do hospedeiro à infecção pelo vírus C. Dessa forma, investigações que visam ao maior conhecimento da resposta imune em portadores dessas manifestações

poderão contribuir para a melhor compreensão do papel da resposta imune na sua patogênese.

Os mecanismos imunes responsáveis pelo clareamento viral espontâneo na hepatite C aguda, que ocorre em até 30% dos pacientes, também carecem de maiores conhecimentos.

Maiores conhecimentos a respeito dos mecanismos imunes associados ao desenvolvimento do carcinoma hepatocelular em portadores de cirrose hepática pelo vírus C poderão contribuir para identificar possíveis padrões imunológicos responsáveis pelo seu aparecimento, o que certamente irá beneficiar um número substancial de pacientes que sucumbem a essa complicação.

Aspectos da infecção crônica pelo HCV no paciente imunossuprimido pós-transplante hepático também devem ser esclarecidos, para um melhor entendimento da história natural da doença, após a recidiva viral.

ABSTRACT

ABSTRACT

The natural history of chronic hepatitis C (CHC) ranges from minimal damage to cirrhosis. In addition, HCV infection remains common in patients with end stage renal disease (ESRD) on hemodialysis, with more indolent course. Virus and host factors involved in the pathogenesis of CHC are under investigation. In this study, we sought to evaluate the role of the immune system through the analysis of peripheral blood leukocyte subsets, the expression of activation and co-stimulation molecules, the potential migratory and the correlation among populations of T lymphocytes in patients with CHC. For the analysis, peripheral leukocyte subsets were measured by flow cytometry prior treatment. Three groups were formed: HCV group, n=32, ESRD patients with CHC (IRC, n=9), and non infected controls (NI, n=14). The results showed that the level of HLA DR-positive CD4 and CD8-T cells and the fraction of CD28-negative CD4-T cell were significantly higher in HCV and IRC groups as compared with NI group. The expression of CD18 on eosinophils, monocytes, neutrophils, CD4 and CD8 T-cells and CD62L on neutrophils, was significantly lower in HCV and IRC groups as compared with the NI group, but not in eosinophils and lymphocytes. Despite no differences among the three groups regarding the frequencies of the majority populations of peripheral leukocytes, the analysis of minor cell subsets allowed to identify distinct phenotypic features between HCV and IRC groups, which may contribute to understand their immunopathogenic differences. Lower fraction of CD62L-positive monocytes was observed only in IRC group. A positive correlation among the frequency of CD8⁺HLA-DR⁺ and CD4⁺HLA-DR⁺

T-cells was shown in HCV and IRC groups. In addition, four more correlations in HCV group were found, as the direct correlation between CD8⁺HLA-DR⁺ and NK, giving support to the hypothesis of higher tissue damage observed in CHC patients, together with the inverse correlation among HLA DR-positive and the expression of CD62L⁺ on CD4 and CD8-T cells, a phenotypic sign of continuous and persistent activation, which were not observed in IRC group. In conclusion, our analysis of phenotypic markers involved in activation, co-stimulation and cell migration showed a mixed inflammatory immune profile in chronic hepatitis C, with both innate and adaptive immunity components.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

1. AGRATI, C.; NISII, C.; OLIVA, A. et al. Lymphocyte distribution and intrahepatic compartmentalization during HCV infection: a main role for MHC-unrestricted T cells. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v.50, n.5, p.307-16, 2002.
2. AHMAD, A.; ALVAREZ, F. Role of NK and NKT cells in the immunopathogenesis of HCV-induced hepatitis. **J Leukoc Biol**, New York, v.76, n.4, p.743-759, Oct. 2004
3. ALTER, M. J. The epidemiology of acute and chronic hepatitis C. **Clin Liver Dis**, Philadelphia v.1, n.3, p.559-568, Nov. 1997.
4. ALTER, M. J.; KRUSZON-MORAN, D.; NAINAN, O. V. et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States: 1988 through 1994. **N Engl J Med**, Boston, v.341, n.8, p.556-562, Aug. 1999.
5. ASANZA, C.G.; GARCIA-MONZÓN, C.; CLEMENTE, G. et al. Immunohistochemical evidence of immunopathogenetic mechanisms in chronic hepatitis C recurrence after liver transplantation. **Hepatology**, Saint Louis, v.26, n.3, p.755-763, Sep. 1997.
6. BALLARDINI, G., GROFF, P., PONTISSO, P. et al. Hepatitis C virus (HCV) genotype, tissue HCV antigens, hepatocellular expression of HLA-A, B, C, and intercellular adhesion-1 molecules. Clues to pathogenesis of hepatocellular damage and response to interferon treatment in patients

² Referência bibliográfica conforme NBR-6023 da ABNT, publicada em FRANÇA, J.L. **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. 4.ed. ver. aum. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1998.213p.

- with chronic hepatitis C. **J Clin Invest**, Ann Arbor, n.95, v.5, p.2067-2075, May, 1995.
7. BANNER, B.F.; ALLAN, C.; SAVAS, L. et al. Inflammatory markers in chronic hepatitis C. **Virchows Arch**, New York, n.431, v.3, p.181-187, Sep. 1997.
 8. BAECHER-ALLAN, C.; VIGLIETTA, V.; HAFLER, D.A. Human CD4+CD25+ regulatory T cells. **Semin Immunol**, v.16, n.2, p.89-98, Apr. 2004.
 9. BARROS, M T; ROMÃO Jr, J.E. Resposta Imunológica na Uremia. In: CRUZ, JENNER. **Atualidades em Nefrologia**. São Paulo: Sarvier, 1996. v.4, cap 30, p. 230-240.
 10. BONOMINI, M.; FORSTER, S.; DE RISIO. F. et al.. Effects of selenium supplementation on immune parameters in chronic uraemic patients on haemodialysis. **Nephrol Dial Transplant**, v.10, n.9, p.1654-61, 1995.
 11. BOWEN, D.G.; WALKER, C.M. The origin of quasispecies: cause or consequence of chronic hepatitis C viral infection? **J Hepatol**, v.42, n.3, p.408-417, Mar. 2005.
 12. BUSEK, S.; OLIVEIRA, G. C. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genet Mol Res**, v.2, n.1, p.117-123, Mar. 2003.
 13. CACCIARELLI, T. V.; MARTINEZ, O. M.; GISH, R. G. et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. **Hepatology**, Saint Louis, v.24, n.1, p.6-9, Jul. 1996.
 14. CASANOVAS-TALTAVULL, T.; BALIELLAS, C.; BENASCO, C. et al. Efficacy of interferon for chronic hepatitis C virus-related hepatitis in

- kidney transplant candidates on hemodialysis: results after transplantation. **Am J Gastroenterol**. v.96, n.4, p.1170-1177, Apr. 2001.
15. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for prevention and control of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV-related chronic disease. **Morb Mortal Wkly Rep**, v.47, p.1-39, Sep.1998.
16. CHANG, K.M. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Clin Liver Dis**, v.7, n.1, p.89-105, Feb. 2003.
17. CHENEY, C. P.; CHOPRA, S.; GRAHAM, C. Hepatitis C. **Infect Dis Clin North Am**, v.14, n.3, p.633-667, Sep.2000.
18. CHOO, Q.L.; KUO, G.; WEINER, A.J. et al. Isolation of a cDNA clone derived from bloodborne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v.244, p.359-362, Apr. 1989.
19. CHOO, Q. L.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R. et al. Hepatitis C virus: the major causative agent of viral non-A, non-B hepatitis. **Br Med Bull**, v.46, n.2, p.423-441, Apr.1990.
20. CORRY, D.B.; REINER, S.L.; LINSLEY, P.S. et al. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. **J Immunol**, v.153, n.9, p.4142-4148, Nov. 1994.
21. DAICHO, Y.; KURASHIGE, S.; HASHIMOTO, S. et al. Characteristic cytokine products of Th1 and Th2 cells in hemodialysis patients. **Nephron** v.83, n.3, p.237-245, 1999.

22. DAVIS, G. L.; ALBRIGHT, J. E.; COOK, S. F. et al. Projecting future complications of chronic hepatitis C in the United States. **Liver Transpl**, v.9, n.4, p.331-338, Apr. 2003.
23. DE WAAL MALEFYT, R. Interleukin-10. In: MIRE-SLUIJS, A. R. & THORPE, R. **Cytokines**. San Diego: Academic Press, p.151-67, 1998.
24. DIEPOLDER, H. M.; ZACHOVAL, R.; HOFFMANN, R. M. et al. The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis clinical. **J Mol Med**, v.74, n.10, p.583-588, Oct. 1996.
25. D'INTINI, V.; BORDONI, V.; FORTUNATO, A. et al. Longitudinal study of apoptosis in chronic uremic patients. **Semin Dial**, Baltimore v.16, n.6, p. 467-73, Nov./Dec. 2003
26. DOHERTY, D.G.; O'FARRELLY, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. **Immunol Rev.**, v.174, p.5-20, Apr. 2000.
27. DUESBERG, U.; SCHNEIDERS, A.M.; FLIEGER, D. et al. Natural cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) is not impaired in patients suffering from chronic hepatitis C. **J Hepatol**. v.35, n.5, p650-657, Nov. 2001.
28. EDWARDS-SMITH, C. J.; JONSSON, J. R.; PURDIE, D. M. et al. Interleukin-10 promoter polymorphism predicts initial response of chronic hepatitis C to interferon alfa. **Hepatology**, Saint Louis, v.30, n.2, p.526-530, Aug. 1999.
29. ESTEBAN, J. I.; LOPEZ-TALAVERA, J. C.; GENESCA, J. et al. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. **Ann Intern Med**, v.115, n.6, p.443-449, Sep. 1991.

30. EXLEY, M.A.; KOZIEL, M.J. To be or not to be NKT: natural killer T cells in the liver. **Hepatology**, v.40, n.5, p.1033-1040, Nov. 2004.
31. FABRIZI, F.; DULAI, G.; DIXIT, V. et al. Meta-analysis: interferon for the treatment of chronic hepatitis C in dialysis patients. **Aliment Pharmacol Ther.** v.18, n.11-12, p.1071-1081 Dec. 2003.
32. FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H. et al. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. **N Engl J Med**, Boston, v.292, n.15, p.767-770, Apr. 1975.
33. FORNS, X.; PURCELL, R. H.; BUKH, J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. **Trends Microbiol**, v.7, n.10, p.402-410, Oct. 1999.
34. FREEMANN, A. J.; MARINOS, G.; FFRENCH, R. A. et al. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. **Immunol Cell Biol**, v.79, n.6, p.515-536, Dec. 2001.
35. FUKUDA, R.; ISHIMURA, N.; ISHIHARA, S. et al. Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. **Liver**, v.16, n.6, p.390-399, Dec. 1996.
36. GERLACH, T.J.; DIEPOLDER, H.M.; JUNG, M-A. et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T-cell response in acute hepatitis C. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.117, n.4, p.933-941, Oct. 1999.
37. GIACCHINO, F.; ALLOATTI, S.; QUARELLO, F.; et al. The immunological state in chronic renal insufficiency. **Int J Artif Organs**, Milano, v.5, n.4, p. 237-42, July 1982.

38. GLUCK, T.; SEELIG, R.; DETTE, S. et al. Parameters predicting response to alpha-interferon treatment in chronic hepatitis C. **Hepatogastroenterology**, n.44, v.14, p.484-491, Mar-Apr. 1997.
39. GRETCH, D. R. Use and interpretation of HCV diagnostic tests in the clinical setting. **Clin Liver Dis**, v.1, n.3, p. 543–557, Nov. 1997.
40. GRÜNER, N.H.; GERLACH, T.J.; JUNG, M-A. et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cell with viral clearance in acute hepatitis C. **J Inf Disease**, v.181, n. 5, p.1528-1536, May 2000.
41. GUADAGNINO, V.; STROFFOLINI, T.; RAPICETTA, M. et al. Prevalence, risk factors, and genotype distribution of hepatitis C virus infection in the general population: a community-based survey in southern Italy. **Hepatology**, Saint Louis, v.26, n.4, p.1006-1011, Oct. 1997.
42. HARUNA, Y.; MIYAMOTO, T.; YASUNAMI, R. et al. Human leukocyte antigen DRB1 1302 protects against bile duct damage and portal lymphocyte infiltration in patients with chronic hepatitis C. **J Hepatol**, Copenhagen, v.32, n.5, p.837-842, May 2000.
43. HINO, K.; SAINOKAMI, S.; SHIMODA, K. et al. Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. **Dig Dis Sci**, New York, v.39, p.19-27, Jan. 1994.
44. HOUGHTON, M. Hepatitis C viruses. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., et al. (Ed.) **Fields Virology**, 3. Ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.1, cap. 32, p.1035-1058.

45. HURAIB, S. ; TANIMU, D.; ROMEH, S.A. et al. Interferon-alpha in chronic hepatitis C infection in dialysis patients. **Am J Kidney Dis**, v.34, n.1, p.55-60, Jul 1999.
46. ISAGULIANTS, M. G. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. **Curr Pharm Biotechnol**, v.4, n.3, p.169-183, Jun. 2003.
47. ITO, N.; KAWATA, S.; TAMURA, S. et al. Elevated levels of transforming growth factor beta 1 messenger RNA and its polypeptide in human hepatocellular carcinoma. **Cancer Res**, v.51, n.15, p.4080-4083, Aug. 1991.
48. JANEWAY JR, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.197– 216, Apr. 2002.
49. KAUL, H.; GIRNDT, M.; SESTER, U. et al. Initiation of hemodialysis treatment leads to improvement of T-cell activation in patients with end-stage renal disease. **Am J Kidney Dis**, v.35, n.4, p.611-6, Apr. 2000
50. KNODELL, R.G.; CONRAD, M.E.; DIENSTAG, J.L. et al. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. **Gastroenterology**, Philadelphia, n.69, v.6, p.1278-1285, Dec. 1975.
51. KOZIEL, M. J. Cytokines in viral hepatitis. **Semin Liver Dis**, New York, n.19, v.2, p.157-169, 1999.
52. KOZIEL, M. J. Influence of HIV co-infection on hepatitis C immunopathogenesis. **J Hepatol**, Copenhagen, v.44, s.1, p.s14-s18, Feb. 2006.

53. KUO, G.; CHOO, Q.L.; ALTER, H.J. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. **Science**, v.244, n.4902, p.362-364, Apr. 1989.
54. KURZ, P.; KOHLER, H.; MEUER, S. et al. Impaired cellular immune responses in chronic renal failure: evidence for a T cell defect. **Kidney Int**, New York, v.9, p.1209-1214, Jun. 1986.
55. KUZUSHITA, N.; HAYASHI, N.; MORIBE, T. et al. Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. **Hepatology**, Saint Louis, v.27, n.1, p.240-244, Jan. 1998.
56. LARREA, E.; GARCIA, N.; QIAN, C. et al. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. **Hepatology**, Saint Louis, v.23, n.2, p.210-217, Feb. 1996.
57. LASARTE, J-J.; GARCIA-GRANERO, M.; LÓPEZ, A. et al. Cellular immunity to hepatitis C virus core protein and the response to interferon in patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, Saint Louis, v. 28, n.3, p. 815-822, Sept. 1998.
58. LECHMANN, M.; IHLENFELDT, H. G.; BRAUNSCHWEIGER, I. et al. T and B cell responses to different hepatitis C virus antigens in patients with chronic hepatitis C infection and in healthy anti-HCV blood donors without viremia. **Hepatology**, Saint Louis, v.24, n.4, p.790-795, Oct. 1996.
59. LENSCHOW, D.J.; WALUNAS, T.L.; BLUESTONE, J.A. CD28/B7 system of T cell costimulation. **Annu Rev Immunol**, Palo Alto, v.14, p.233-58, 1996.

60. LINSLEY, P.S.; CLARK, E.A.; LEDBETTER, J.A. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.87, n.13, p.5031-5035, Jul. 1990.
61. LOK, A.S; CHIEN, D.; CHOO, Q.L. et al. Antibody response to core, envelope and non structural hepatitis C virus antigens: Comparison of immunocompetent and immunocompromised patients. **Hepatology**, v.18, n.3, p.497-502, Sep. 1993
62. LUBY,S. P.; QAMRUDDIN, K.; SHAH, A. A. et al. The relationship between therapeutic injections and high prevalence of hepatitis C infection in Hafizabad, **Pakistan Epidemiol Infect**, v.119, n.3, p.349-356, Dec. 1997.
63. MALAPONTE, G.; BEVELACQUA, V.; FATUZZO, P. et al. IL-1beta, TNF-alpha and IL-6 release from monocytes in haemodialysis patients in relation to dialytic age. **Nephrol Dial Transplant**, v.17, n.11, p.1964-70, Nov. 2002.
64. MANGIA, A; GENTILE, R; CASCAVILLA, I. et al. HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. **J Hepatol**, Copenhagen, v.30, n.6, p.984-989, Jun. 1999.
65. MAKI, A; MATSUDA, M; ASAKAWA, M. et al. Decreased expression of CD28 coincides with the down-modulation of CD3[zeta] and augmentation of caspase-3 activity in T cells from hepatocellular carcinoma-bearing patients and hepatitis C virus-infected patients. **J Gastroenterol Hepatol**, v.19, n.12, p.1348-1356, Dec. 2004.

66. MEMON, M. I.; MEMON, M. A. Hepatitis C: an epidemiological review. **J Viral Hepatit**, v.9, n.2, p.84-100, Mar. 2002.
67. McOMISH, F.; YAP, P. L.; DOW, B. et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. **J Clin Microbiol**, v.32, n.4, p.884-892, Apr. 1994.
68. NAVEAU, S. ; BALIAN, A. ; DEGOS, F. et al. Prognostic value of the soluble interleukin-2 receptor in chronic hepatitis C treated with interferon-alfa. **J Hepatol**, Copenhagen, v.31, n.4, p.612-617, Oct. 1999.
69. NENG LAI, K. Hepatitis C infection screening in hemodialysis units. **Am J Kidney Dis**, v.38, n.1, p.186-188, Jul. 2001.
70. NELSON, D.R. ; MAROUSIS, C.G. ; OHNO, T. et al. Intrahepatic hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte activity and response to interferon alfa therapy in chronic hepatitis C. **Hepatology**, Saint Louis, v. 28, n.1, p. 225-230, July, 1998.
71. NIH NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. Management of Hepatitis C: 2002. **Hepatology**, Saint Louis, n.36, v.5, 2002.
72. NORRIS, S.; DOHERTY, D.G.; CURRY, M. et al. Selective reduction of natural killer cells and T cells expressing inhibitory receptors for MHC class I in the livers of patients with hepatic malignancy. **Cancer Immunol Immunother**, v.52, n.1, p.53-58, Jan. 2003
73. OKUDA, K. E.; YOKOSUKA, O. Natural history of chronic hepatitis C in patients on hemodialysis: case control study with 4-23 years of follow-up. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 10, n.15, p 2209-2212, Aug. 2004

74. OLIVEIRA, G. C.; CARMO, R. A.; ROCHA, M. O. C. et al. Hepatitis C virus genotypes in hemophiliacs in the state of Minas Gerais, Brazil. **Transfusion**, v.39, n.11-12, p.1194-1199, Nov-Dec. 1999.
75. OSELLA, A. R.; MISCIAGNA, G.; LEONE, A.; DI-LEO, A. et al. Epidemiology of hepatitis C virus infection in an area of Southern Italy. **J Hepatol**, Copenhagen, v.27, n.1, p.30-35, Jul. 1997.
76. OSNA, N.; SILONOVA, G.; VILGERT, N. et al. Chronic hepatitis C: T-helper1/T-helper2 imbalance could cause virus persistence in peripheral blood. **Scand J Clin Lab Invest**, v.57, n.8, p.703-710, Dec. 1997.
77. PAWLOTSKY, J.M. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. **Hepatology**, Saint Louis, v.36, s.1, p:S65-73, Nov. 2002.
78. PAWLOTSKY, J.M.; DAHARI, H.; NEUMANN, A.U. et al., Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v.126, n.3, p.703-714, Mar. 2004.
79. PAWLOTSKY, J.M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends Microbiol**, v.12, n.2, p.96-102, Feb. 2004.
80. PAWLOTSKY, J.M. Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets. **J Hepatol**, Copenhagen, v.44, s.1, p.s10-s13, Feb. 2006.
81. PAPTAEODORIDIS, G.V.; PATCH, D.; DUSHEIKO, G.M. et al. The outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation – is it influenced by the type of immunosuppression? **J Hepatol**, Copenhagen, v.30, n.4, p.731-738, April 1999.
82. PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A. et al. Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v.39, n.1, p.5-19, Jan. 2004.

83. PEREIRA, L. M.; SPINELLI, V.; XIMENES, R. A. et al. Chronic hepatitis C infection: influence of the viral load, genotypes and GBV-C/HGV coinfection on the severity of the disease in a Brazilian population. **J Med Virol**, v.67, n.1, p.27-32, May 2002.
84. PRINCE, A.M.; BROTMAN, B.; GRADY, G.F. et al. Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. **Lancet**, London, v.2, n.7875, p.241-246, Aug. 1974.
85. ROCCO, P.; BICEGLIA, O.; PACELI, M. et al. The peripheral blood lymphocyte subpopulations in chronic anti-HCV-positive liver disease: their significance and correlation with liver function. **Minerva Gastroenterol Dietol**, Torino, v.42, n.2, p.51-55, Jun. 1996.
86. ROULOT, D.; DURAND, H.; COSTE, T. et al. Quantitative analysis of transforming growth factor beta 1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: absence of correlation between high levels and severity of disease. **Hepatology**, Saint Louis, n.21, v.2, p.298-304, 1995.
87. SCHNEIDERS, A. M.; SCHULZ, M.; LEIFELD, L. et al. E2 antibodies mediate antibody dependent cellular cytotoxicity in HCV. **J Hepatol**, Copenhagen, v.32(Suppl.), p.37, 2000.
88. SCOGNAMIGLIO, P.; ACCAPEZZATO, D.; CASCIARO, M. A. et al. Presence of effector CD8⁺ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. **J. Immunol**, Baltimore, v.11, n.162, p.6681-6689, Jun. 1999.

89. SHIRAI, Y.; KAWATA, S.; TAMURA, S. et al. Plasma transforming growth factor-beta 1 in patients with hepatocellular carcinoma. Comparison with chronic liver diseases. **Cancer**, v.73, n.9, p.2275-2279, May 1994.
90. SHOUKRY, N.H.; CAWTHON, A.G.; WALKER, C.M. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. **Annu Rev Microbiol**, v.58, p391–424, Oct. 2004.
91. SIMMONDS, P.; HOLMES, E. C.; CHA, T. A. et al. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. **J GenViro**, v.74, n.11, p.2391-2399, Nov. 1993a.
92. SIMMONDS, P.; McOMISH, F.; YAP, P. L. et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **J GenViro**, v.74, n.4, p.661-668, Apr. 1993b.
93. SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Relatório do Grupo de Estudos. **GED**, São Paulo, v.18: S3, 1999.
94. SOUZA, F. C.; ANDRADE, D. C.; CAMPOS, V. F. et al. Aspectos clínicos da hepatite C crônica: experiência do Ambulatório de Hepatites Virais / Instituto Alfa de Gastroenterologia / Hospital das Clínicas da UFMG. **Rev Med Minas Gerais**, Belo Horizonte, v.14, n.3, p.136-141, 2003.
95. SPECTER, S. *Viral Hepatitis: diagnosis, therapy, and prevention*. Totowa, NJ: Humana Press, 1999.
96. STERLING, R.K.; SANYAL, A.J.; LUKETIC, V.A. et al. Chronic hepatitis C infection in patients with end stage renal disease: characterization of liver

- histology and viral load in patients awaiting renal transplantation. **Am J Gastroenterol**. v.94, n.12, p.3576-3582, Dec 1999.
97. TILG, H.; WILMER, A.; VOGEL, W. et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. **Gastroenterology**, 103:264-74, 1992.
98. TSAI, S. L.; LIAW, Y. F.; CHEN, M. H. et al. Detection of type 2-like T helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity. **Hepatology**, Saint Louis, v.25, n.2, p.449–458, Feb. 1997.
99. TSUSHIMA, H.; KAWATA, S.; TAMURA, S. et al. Reduced plasma transforming growth factor-beta1 levels in patients with chronic hepatitis C after interferon-alpha therapy: association with regression of hepatic fibrosis. **J Hepatol**, Copenhagen, v.30, n.1, p.1-7, Jan. 1999.
100. VAN DER POEL, C.L. Hepatitis C virus: into the fourth generation. **Vox Sang**, Basel, v.67, s.3, p.95-98, 1994.
101. VAN RIEMSDIJK, I.C.; BAAN, C.C.; LOONEN, E.H. et al. Patients on chronic hemodialysis have no intrinsic lymphocyte defect upon stimulation with interleukin-2, interleukin-15 or tumor necrosis factor-alpha. **Blood Purif**, v.21, n.2, p.158-62, 2003.
102. VIDIGAL, P. G.; GERMER, J. J. & ZEIN, N. N. Polymorphisms in the interleukin-10, tumor necrosis factor- α , and transforming growth factor- β 1 genes in chronic hepatitis C patients treated with interferon and ribavirin. **J Hepatol**, Copenhagen, v.36, n.2, p.271-277, Feb. 2002.
103. ZOLA, H. Human leukocyte differentiation antigens as therapeutic targets: the CD molecules and CD antibodies. **Expert Opin Biol Ther**, vol.1, n.3, p.375-383, May 2001.

104. WALDHERR, R.; EBERLEIN-GONSKA, M.; NORONHA, I. L. Citocinas e Rim. In: CRUZ, JENNER. **Atualidades em Nefrologia**. São Paulo: Sarvier. 1992, v .2, p.1-20
105. WASLEY, A.; ALTER, M. J. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. **Semin Liver Dis**, v.20, n.1, p.1-16, 2000.
106. WOITAS, R. P.; LECHMANN, M.; JUNG, G. et al. CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. **J Immunol**, v.159, n.2, p.1012-1018, Jul. 1997.
107. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global surveillance and control of hepatitis C. **J Viral Hepat**, v.6, n.1, p.35-47, Jan. 1999.
108. YATSUHASHI, H.; FUJINO, T.; MATSUMOTO, T. et al. Immunohistochemical analysis of hepatic interferon alpha-beta receptor level: relationship between receptor expression and response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. **J Hepatol**, Copenhagen, v.30, n.6, p.995-1003, Jun. 1999.
109. YEN, T.; KEEFFE, E. B.; AHMED, A. The epidemiology of hepatitis C virus infection. **J Clin Gastroenterol**, v.36, n.1, p.47-53, Jan. 2003.
110. YOUSEFI, S.; VAZIRI, N.D.; CARANDANG, G. Evaluation of the in vitro production of interferon gamma and other lymphokines in uremic patients. **Proc Soc Exp Biol Med**, Malden, v.184, n.2, p.179-85, Feb. 1987.
111. ZEIN, N. N.; RAKELA, J.; KRAWITT, E. L. et al. Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and

response to interferon therapy. **Ann Intern Med**, v.125, n.8, p.634-639,
Oct. 1996.

ANEXOS

ANEXOS

Consentimento para Participação dos Doadores da Fundação Hemominas

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VÍRUS DA HEPATITE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Prezado(a) paciente,

Você foi selecionado(a) para participar de uma pesquisa por ser doador de sangue saudável.

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

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

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

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com Dr. Eric Bassetti Soares pelo telefone (031) 3248-9538. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas, que a aprovou.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

Paciente (_ _ _)

Pesquisador Responsável

Consentimento para Participação dos Pacientes do Hospital das Clínicas

ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR EM INDIVÍDUOS INFECTADOS
PELO VÍRUS DA HEPATITE C

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PESQUISA

Prezado(a) paciente,

Você foi selecionado(a) para participar de uma pesquisa por ser paciente do ambulatório de fígado do Hospital das Clínicas em virtude de uma infecção pelo vírus da hepatite C.

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

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

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

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com Dr. Eric Bassetti Soares pelo telefone (031) 3248-9538. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, que a aprovou.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

Paciente (_ _ _)

Pesquisador Responsável

Publicação

- MARTINS FILHO, O.A.; BASSETTI-SOARES, E.; BARBOSA, K.V.B.D.; ANDRADE, M.C. Resposta imune durante a infecção pelo vírus da hepatite C. In: TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O.A.; OLIVEIRA. (Ed.) **Hepatite C – Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa**, 1. Ed., Belo Horizonte: Coopmed Editora Médica, 2005. cap. 3, p.31-40.

Atividades no período 2001-2005

- 1080 horas-aula para estudantes de graduação dos cursos de medicina e fisioterapia;
- Três projetos de pesquisa multicêntricos internacionais, em andamento;
- Um projeto de pesquisa multicêntrico nacional concluído;
- 20 publicações em anais de congressos, periódicos nacionais e internacionais;
- Três capítulos de livro;
- Nove conferências em eventos regionais;
- 22 participações em congressos e simpósios, como ouvinte, sendo três no exterior e quatro congressos brasileiros, na área de gastroenterologia e hepatologia;
- Coordenação das pesquisas, na Faculdade de Medicina e Fisioterapia do Vale do Aço.