

Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa

**ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DE LEUCÓCITOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM OU SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

**FACULDADE DE MEDICINA
BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

KÁTIA VALÉRIA BASTOS DIAS BARBOSA

**ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DE LEUCÓCITOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM OU SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

**FACULDADE DE MEDICINA
BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS**

2008

Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa

**ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DE LEUCÓCITOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM OU SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina, área de concentração em Gastroenterologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientadora: Prof^a Dra. Rosângela Teixeira¹

Co-orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho²

¹ Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

² Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – CPqRR / FIOCRUZ

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
2008**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

- **Reitor:** Prof^o Ronaldo Tadêu Pena
- **Vice-Reitor:** Prof^a Heloisa Maria Murgel Starling
- **Pró-Reitor da Pós-Graduação:** Prof^o Jaime Arturo Ramirez
- **Pró-Reitor de Pesquisa:** Prof^o Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

- **Diretor:** Prof^o Francisco José Penna
- **Vice-Diretor:** Prof^o Tarcizo Afonso Nunes
- **Coordenador do Centro de Pós-Graduação:** Prof^o Carlos Faria Santos Amaral
- **Sub-coordenador do Centro de Pós-graduação:** Prof^o João Lúcio dos Santos Jr.

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

- **Chefe:** Prof^o Dirceu Bartolomeu Greco

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM GASTROENTEROLOGIA

Coordenador: Prof^o Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Colegiado:

- Prof^o Luiz Gonzaga Vaz Coelho (Coordenador)
- Prof^a Cláudia Alves Couto
- Prof^a Luciana Dias Moretzsohn
- Prof^a Teresa Cristina de Abreu Ferrari
- Luiz Fernando Veloso (Representante Discente)

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
2008**

Kátia Valéria Bastos Dias Barbosa

**ASPECTOS FENOTÍPICOS CELULARES DE LEUCÓCITOS
CIRCULANTES EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA
COM OU SEM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

PRESIDENTE DA BANCA:

PROF. DR. _____

BANCA EXAMINADORA

PROF. DR. _____

PROF. DR. _____

PROF. DR. _____

PROF. DR. _____

PROF. DR. _____

APROVADA EM: ____/____/____

**Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte – MG
2008**

*D*edico este trabalho ao João Claudio
pelo apoio e companheirismo

A minha família, meus pais e minhas
irmãs, pelo amor e carinho

*A*os meus mestres e orientadores, res-
ponsáveis pelo meu crescimento pessoal
e acadêmico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer sempre presente em meu caminho, nas minhas principais escolhas.

A meu pai por todo zêlo e ensinamentos, companhia no silêncio, à minha mãe pelo exemplo de força e determinação, às minhas irmãs Vívian e Karine pela amizade.

Ao João Claudio pela paciência, amor e incentivo nesta difícil etapa. Sua participação foi muito importante na manutenção de minha esperança, serenidade e perseverança.

À Dra. Rosângela Teixeira, pela pessoa humana, por todo apoio e dedicação, transformando os momentos mais difíceis em pequenos problemas. Pelo tempo que, gratuitamente, foi a mim dedicado, responsável pelo meu crescimento acadêmico, científico e pessoal que continuará, a partir de agora, sempre comigo, refletido em cada novo projeto. Obrigada por ser minha orientadora, pois esta foi a razão e o princípio de tudo.

Ao Dr. Olindo Assis Martins Filho por ter acreditado no meu trabalho, tendo aberto para mim, incondicionalmente, as portas do Laboratório de Chagas. E, sobretudo, pelas tardes incansáveis, dedicadas aos ensinamentos de imunologia e de técnica laboratorial para uma iniciante. Agradeço pela sensibilidade, pelo desenvolvimento crítico e científico nesta área complexa do conhecimento, pois sem dúvidas, na ausência do seu incentivo, este projeto não prosperaria.

Ao Dr. Eric Bassetti pelo apoio e pelo seu importante papel na aproximação inicial com meus orientadores.

À Bia pela paciência e disponibilidade ao ensinar-me as técnicas laboratoriais, sendo a pioneira na minha introdução à prática da metodologia de pesquisa. Obrigada pela força e por ter estendido a sua mão nas horas mais essenciais.

À enfermeira Raquel pelo cuidado, carinho e disponibilidade para a coleta das amostras.

À Tiza pelo apoio na execução da leitura dos experimentos que, muitas vezes, esgotavam seu horário.

À Roberta Félix pela disponibilidade espontânea, sempre com muita eficiência.

A todos os estudantes, pós-graduandos, técnicos e pesquisadores do Laboratório de Chagas do René Rachou - FIOCRUZ, em especial ao Rodrigo, Danielle, Renato, Márcio, Renata, Ana Paula, Paula, Jordana, Eliandra e Mariléia pela receptividade, transferência de conhecimentos e amizade.

Aos amigos do ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa da UFMG, sempre tolerantes e auxiliando na inclusão dos pacientes, Mary, Érica, Rodrigo, Osvaldo e Luís Otávio.

À Fundação Hemominas – Hemocentro Regional de Belo Horizonte, pelo sucessivo apoio na execução do projeto, pela colaboração e parceria, sempre favorecendo o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Núcleo de Nefrologia de Belo Horizonte cuja participação foi distinta na aprovação e na disponibilidade para a execução do projeto, em especial ao Dr. João Milton, Dr. José Menezes e a toda equipe de enfermagem.

Ao Centro de Pós-graduação em Medicina da UFMG, área de concentração em Gastroenterologia, pela oportunidade.

Meu sincero e humilde agradecimento aos pacientes do ambulatório de hepatites, do centro de hemodiálise e aos doadores de sangue que se dispuseram a colaborar, voluntariamente, com a pesquisa, no âmbito dos principais atores do projeto.

“A mente de um indivíduo, uma vez desenvolvida por uma idéia nova, nunca recupera suas dimensões originais.”

Oliver W. Holmes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Objetivos:	21
1.1.1. Objetivo Principal:.....	21
1.1.2. Objetivos Específicos:	21
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1. Epidemiologia:	22
2.2. História Natural da Infecção pelo Vírus da Hepatite C:	23
2.3. Aspectos Básicos da Resposta Imune à Infecção Viral:	26
2.4. Resposta Imunológica ao Vírus da Hepatite C:.....	31
2.5. A Hepatite C no Contexto da Insuficiência Renal Crônica:.....	37
2.6. Considerações finais:.....	39
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	41
3.1. Tipo de estudo:.....	41
3.2. Casuística:	41
3.2.1. Cálculo do tamanho amostral:	41
3.2.2. Descrição da casuística:	41
3.2.3. Critérios de inclusão e exclusão:	42
3.2.4. Caracterização da Casuística:	44
3.2.4.1. Características referentes a todos os grupos:	44
3.2.4.2. Características relativas aos grupos com insuficiência renal:	45
3.2.4.3. Características particulares dos grupos com hepatite C crônica:	46
3.3. Métodos:	50
3.3.1. Entrevista clínica, dados laboratoriais e histológicos:.....	50
3.3.2. Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico:	51
3.3.3. Aquisição dos Dados e Análise Estatística:.....	55
3.3.3.1. Análise convencional	56
3.3.3.2. Análise de células T reguladoras:	56
3.3.3.3. Análise do marcador CD56 em subpopulações de células CD3 ⁻ CD16 ⁺ :.....	57
3.3.3.4. Análise de subpopulações de células CD3 ⁻ CD56 ⁺ :.....	58
3.3.3.5. Análise combinada “gated”:.....	59
3.3.3.6. Análise de monócitos pró-inflamatórios:	60
3.3.3.7. Análise semiquantitativa da expressão de FcγR em monócitos:	62
3.3.3.8. Análise semiquantitativa da expressão de FcγRIII em neutrófilos:.....	62
3.3.3.9. Análise da expressão de receptores de quimiocinas:	63

3.3.4. Análise Estatística:	64
3.4. Aspectos Éticos:	65
4. RESULTADOS	66
4.1. Resultados da imunofenotipagem por citometria de fluxo:.....	66
4.1.1. Frequência de populações e subpopulações celulares do sangue periférico em cada grupo: 66	
4.1.1.1. Imunidade inata:.....	66
4.1.1.2. Imunidade adaptativa:	75
4.1.2. Estudo da expressão de marcadores de ativação celular nas populações e subpopulações celulares do sangue periférico em cada grupo:	79
4.1.2.1. Imunidade inata:.....	79
4.1.2.2. Imunidade adaptativa:	80
4.1.3. Estudo da regulação da resposta imune nos leucócitos do sangue periférico:	82
4.1.3.1. Análise de receptores de imunoglobulina em células da Imunidade inata:	82
4.1.3.2. Análise da frequência de células T reguladoras (CD4 ⁺ CD25 ^{High}):.....	85
4.1.3.3. Análise da expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B:	86
4.1.4. Análise da expressão de receptores de quimiocinas em cada grupo:	87
4.1.4.1. Imunidade inata:.....	87
4.1.4.2. Imunidade Adaptativa:	89
4.1.5. Correlações entre as variáveis em estudo (demográficas, laboratoriais, imunofenotipagem):.....	92
4.1.5.1. Correlação entre ALT e Grau de Atividade Histológica:	93
4.1.5.2. Correlação entre variáveis em estudo (demográficas, laboratoriais) e parâmetros fenotípicos de células da imunidade inata:.....	94
4.1.5.3. Correlação entre variáveis em estudo (demográficas e laboratoriais) e parâmetros fenotípicos de células da imunidade adaptativa:	95
4.1.5.4. Correlação entre os parâmetros fenotípicos celulares avaliados no sangue periférico:	98
4.1.5.5. Correlação entre células com expressão de quimiocinas e outros fenótipos celulares estudados:.....	101
5. DISCUSSÃO:	105
6. CONCLUSÕES:	123
7. REFERÊNCIAS.....	128
8. ANEXOS:	140

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de resposta imune durante uma infecção viral.	27
Figura 2 - Subpopulações funcionais de células T.	28
Figura 3 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos T auxiliares do tipo 1	29
Figura 4 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos T auxiliares do tipo 2	30
Figura 5 - Variação dos níveis da ALT nos grupos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.....	47
Figura 6 - Perfil da distribuição dos níveis da ALT nos grupos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.	47
Figura 7 - Quantificação da carga viral do vírus da hepatite C por Reação em Cadeia da Polimerase.	49
Figura 8 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo.	56
Figura 9 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras (CD4+CD25HIGH) por citometria de fluxo.	57
Figura 10 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações de células NK.	58
Figura 11 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações CD3-CD56DIMCD16-/ e CD3-CD56BRIGHTCD16-/ por citometria de fluxo.....	59
Figura 12 - Seqüência de passos utilizados para as análises de subpopulações de células T CD4+ ou CD8+ ativadas (HLA-DR+) por citometria de fluxo.....	60
Figura 13 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de monócitos pro-inflamatórios (CD14+CD16+HLA-DR++) por citometria de fluxo.....	61
Figura 14 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão de receptores Fcγ na população de monócitos por citometria de fluxo.....	62
Figura 15 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor Fcγ (CD16) na população de neutrófilos por citometria de fluxo.	63

Figura 16 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises da expressão de receptores de quimiocinas por citometria de fluxo.....	64
Figura 17 - Percentual de monócitos circulantes no sangue periférico em cada grupo:	67
Figura 18 - Análise da razão entre macrófago-like e monócitos totais (A) e da razão entre monócitos pró-inflamatórios e monócitos totais (B) no sangue periférico:	68
Figura 19 - Análise do percentual de células Natural Killer totais no sangue periférico em cada grupo:	69
Figura 20 - Análise do percentual de células Pré-NK (A), células NK maduras (B) e Células NK ativadas (C) no sangue periférico em cada grupo:.....	70
Figura 21 - Análise do percentual de células NKT totais no sangue periférico em cada grupo:	71
Figura 22 - Análise do percentual de células NKT 1 (A), células NKT 2 (B) e células NKT 3 (C) no sangue periférico em cada grupo:.....	72
Figura 23 - Análise da razão entre as células NK CD3-CD16-CD56dim (A), células NK CD3-CD16-CD56bright (B), células NK CD3-CD16+CD56dim (C), células NK CD3-CD16+CD56bright (D) e células CD56+ totais no sangue periférico em cada grupo:	74
Figura 24 - Análise do percentual de linfócitos T (A) e linfócitos B (B) circulantes em cada grupo:.....	75
Figura 25 - Análise da razão entre linfócitos T e linfócitos B circulante em cada grupo:	76
Figura 26 - Análise do percentual de linfócitos T auxiliares (A) e de linfócitos T citotóxicos (B) no sangue periférico em cada grupo:.....	77
Figura 27 - Análise da razão entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos do sangue periférico por grupo:	77
Figura 28 - Análise do percentual entre linfócitos B convencionais (A) e linfócitos B1 (B) circulantes e linfócitos B totais no sangue periférico em cada grupo:	78
Figura 29 - Análise do percentual de neutrófilos HLA-DR+ no sangue periférico em cada grupo:.....	79
Figura 30 - Análise do percentual de células T auxiliares ativadas na população de linfócitos T auxiliares (A) e do percentual de células T citotóxicas ativadas na população de linfócitos T citotóxicos (B) circulantes por grupo:	80
Figura 31 - Análise da expressão de HLA-DR em linfócitos B do sangue periférico:	81

Figura 32 - Análise da expressão da molécula CD23 em linfócitos B (linfócitos B ativados) do sangue periférico em cada grupo:	82
Figura 33 - Análise da expressão da molécula CD64 (FcγRI) em eosinófilos circulantes por grupos:	83
Figura 34 - Análise da expressão da molécula CD32 (FcγRII) em monócitos do sangue periférico em cada grupo:	84
Figura 35 - Análise da expressão da molécula CD16 (FcγRIII) em neutrófilos circulantes em cada grupo:	85
Figura 36 - Análise do percentual de células T Reguladoras (Células CD4+CD25 ^{High}) no sangue periférico em cada grupo:	86
Figura 37 - Análise da expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B circulantes por grupo:	86
Figura 38 - Análise da expressão de CXCR4 em monócitos do sangue periférico em cada grupo:	87
Figura 39 - Análise da expressão de CCR3 em monócitos do sangue periférico em cada grupo:	88
Figura 40 - Análise da expressão de CXCR4 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:	89
Figura 41 - Análise da expressão de CXCR3 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:	90
Figura 42 - Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:	91
Figura 43 - Análise da expressão de CCR3 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:	92
Figura 44 - Correlação entre ALT e Atividade Histológica no grupo HepC:	93
Figura 45 - Correlação entre o percentual de monócitos no sangue periférico e carga viral nos grupos HepC e HepC+IRC associados (A) e no grupo HepC (B):	94
Figura 46 - Correlação entre células o percentual de células NKT totais no sangue periférico e o tempo provável de infecção (epidemiológico) no grupo HepC+IRC:	95
Figura 47 - Correlação entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados na população de linfócitos T auxiliares periféricos e ALT no grupo HepC+IRC:	96

Figura 48 - Correlação entre linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos citotóxicos periféricos e ALT no grupo HepC+IRC:	97
Figura 49 - Correlação entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e carga viral no grupo HepC:.....	97
Figura 50 - Correlação entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios na população de monócitos totais e o percentual de linfócitos B do sangue periférico no grupo HepC+IRC: ..	98
Figura 51 - Correlação entre o percentual de linfócitos B e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos do sangue periférico na associação entre os grupos HepC e HepC+IRC (A) no grupo HepC (B):.....	99
Figura 52 - Correlação entre o percentual de células T reguladoras e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados na população de linfócitos T auxiliares periféricos no grupo HepC:.....	100
Figura 53 - Correlação entre o percentual de células T reguladoras do sangue periférico e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos no grupo HepC+IRC:	101
Figura 54 - Análise da correlação entre a expressão de CXCR4 em linfócitos T citotóxicos e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos quando associados os grupos HepC e HepC+IRC (n=36):	102
Figura 55 - Análise da correlação entre o percentual de células CD8+CXCR3+ na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos no grupo HepC:	103
Figura 56 - Análise da correlação entre a expressão de CCR3 em monócitos e o percentual de monócitos pró-inflamatórios na população de monócitos do sangue periférico no grupo HepC:	104
Figura 57 - Síntese do padrão e interseção do perfil fenotípico celular e molecular entre os grupos portadores de hepatite C crônica sem (HepC) e com doença renal associada (HepC+IRC), controle renais crônicos (IRC) e controles sadios (NI):	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados epidemiológicos referentes aos grupos em estudo	45
Tabela 2 - Etiologia da doença de base nos grupos com insuficiência renal crônica.....	45
Tabela 3 - Dados epidemiológicos dos grupos com insuficiência renal crônica.....	46
Tabela 4 - Epidemiologia provável da infecção pelo vírus da hepatite C	46
Tabela 5 - Dados epidemiológicos, laboratoriais e de biologia molecular dos grupos com hepatite C crônica	48
Tabela 6 - Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C por grupo	48
Tabela 7 - Achados à histologia hepática nos grupos com hepatite C crônica.....	50
Tabela 8 - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares e moléculas de superfície.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AASLD – Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

ALT – Alanino aminotransferase

Anti-HCV – Anticorpos contra o vírus da hepatite C

APC – Células apresentadoras de antígenos

EASL – Associação Européia para o estudo do Fígado

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – Enzima imunoensaio para detecção de anticorpos

Fc – Fração cristalizável de imunoglobulinas

FcRs – Receptores para fração cristalizável de imunoglobulinas

FcγRI – Receptor Fc para imunoglobulina G do tipo I (CD64)

FcγRII – Receptor Fc para imunoglobulina G do tipo II (CD32)

FcγRIII – Receptor Fc para imunoglobulina G do tipo III (CD16)

FSC – Distribuição puntual de tamanho

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HCV-RNA – Ácido ribonucléico do vírus da hepatite C

HDV – Vírus da hepatite D

HepC – Portadores de hepatite C

HepC+IRC – Portadores de hepatite C e insuficiência renal crônica

HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida humana

HLA – Antígeno leucocitário humano

HTLV – Vírus T-linfotrópico humano

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IMF – Intensidade média de fluorescência

IRC – Portadores de insuficiência renal crônica

LB – Linfócitos B

LSN – Limite superior da normalidade
LTa – Linfócitos T auxiliares
LTc- Linfócitos T citotóxicos
MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade
MØ - Monócitos
NI – Não infectado
NK – Células natural killer
NKT – Linfócitos T natural killer
NUPAD – Núcleo de Pesquisas em Apoio Diagnóstico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Tampão fosfato salínico
PCR – Reação de polimerização em cadeia
SSC – Distribuição puntual de granulocidade
TCR –Receptor de células T
TGF- β - Fator transformador do crescimento Beta
Treg – células T reguladoras

RESUMO

FUNDAMENTOS e OBJETIVOS: O comportamento da resposta imunológica na infecção crônica pelo vírus da hepatite C, particularmente em portadores de insuficiência renal crônica, carece de elucidação. Visa-se o estudo do perfil fenotípico de leucócitos circulantes neste contexto. **MÉTODOS:** Foram estudados quatro grupos: G1- 15 doadores de sangue; G2- 19 portadores de insuficiência renal crônica, não infectados pelo vírus C; G3- 20 portadores de hepatite C crônica, com função renal normal e G4- 16 portadores crônicos do vírus C, com insuficiência renal crônica avançada em hemodiálise. A infecção crônica foi confirmada pela positividade sérica do HCV-RNA qualitativo. Foram realizados ensaios de imunofenotipagem “ex-vivo” dos leucócitos periféricos, marcados por anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, seguindo-se a análise de imunofluorescência por citometria de fluxo (FACS-can-BD®), utilizando-se o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados. **RESULTADOS:** Maior frequência de linfócitos T auxiliares e citotóxicos ativados e células NK e NKT mostraram-se peculiares à infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Aumento da expressão de receptores de quimiocinas do tipo Th1 em células CD4⁺, correlação inversa entre linfócitos T citotóxicos ativados e carga viral, correlação positiva entre CD8⁺CXCR3⁺ e CD8⁺DR⁺⁺ e entre células T reguladoras e células CD4⁺HLA-DR⁺ foram características do grupo com hepatite C crônica e função renal normal. Demonstrou-se significativa participação da imunidade inata, via ativação de monócitos, e retração no compartimento de linfócitos B, decorrente da redução de linfócitos B1, paralela à diminuição de linfócitos B ativados, particularidades relacionadas à presença de insuficiência renal crônica e que se preservam na vigência de infecção crônica pelo vírus C. Percentual elevado de células NK com maior potencial citolítico (CD56^{DIM}) e menor produção de IFN-γ (CD56^{BRIGHT}), redução da expressão de receptores de quimiocinas em CD4⁺ e CD8⁺, correlação inversa entre linfócitos auxiliares e citotóxicos ativados com níveis de ALT e correlação inversa entre células CD4⁺CD25^{HIGH} e CD8⁺HLA-DR⁺ foram inerentes ao grupo de portadores de insuficiência renal crônica com hepatite C crônica. **CONCLUSÕES:** Os resultados demonstraram perfis distintos de resposta imune entre os portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica avançada em hemodiálise.

Palavras-chave: Hepatite C Crônica. Insuficiência Renal Crônica. Imunologia. Imunofenotipagem. Leucócitos periféricos.

ABSTRACT

BACKGROUND AND AIMS: Chronic hepatitis C (CHC) and end-stage renal disease (ESRD) are common and potentially serious medical problems throughout the world. The immune system plays a key role in the natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. However, the knowledge of immunological aspects of HCV infection in ESRD patients is still limited. Hence, we sought to investigate the profile of the immune response focusing on major phenotypic features of peripheral blood lymphocytes. **Patients and Methods:** Four groups were investigated: G1 - 15 blood donors (BD); G2- 19 patients with ESRD without HCV infection (ESRD); G3- 20 patients with and normal renal function (CHC); G4- 16 patients with CHC and ESRD in hemodialysis (CHC+ESRD). CHC was confirmed by HCV-RNA-PCR, high ALT levels and/or liver-biopsy. HIV, HBV, alcoholism, autoimmune liver-diseases, use of immunosuppressive drugs and transplanted patients were exclusion criteria. EDTA-peripheral blood white cells were labeled with fluorochrome-conjugated specific monoclonal antibodies following immunofluorescence analysis by flow cytometry. **RESULTS:** Although no changes in the mean frequency of circulating T-cells, higher proportion of activated CD4+HLA-DR+ as well as CD8+HLA-DR+ T-cells was observed in CHC and CHC+ESRD as compared with BD. In addition, higher frequency of NKT-cell appeared as the hallmark of HCV infection, despite the presence of renal disease. On the other hand, the monocytic/macrophagic and B-cell compartment were the most affected by renal disease. Lower percentage of CD19+B-Lymphocytes parallel with significant decrease in the CD19+CD5+B1-subset and activated CD19+CD23+B-cells besides higher frequency of monocytes, both pro-inflammatory and macrophage-like, was observed in ESRD and HCH+ESRD as compared to BD. **CONCLUSIONS:** These findings suggest that despite the activation of T-cell subsets is the most affected by the HCV infection, the presence of ESRD is associated with significant impairment of the B-cell compartment and activation of innate immunity, via monocyte activation. It might be implicated in the natural history of CHC in ESRD patients.

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune parece desempenhar um papel crítico na história natural da hepatite C. No entanto, os conhecimentos sobre aspectos imunológicos envolvidos na progressão da inflamação tecidual hepática e, conseqüentemente, na evolução da doença, particularmente em portadores de insuficiência renal crônica (IRC), são limitados. Assim, investigações que visam a maior compreensão da patogenia da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), os determinantes do clareamento viral e os diversos aspectos da resposta imune associados à história natural da infecção constituem prioridade atual definidas pela conferência da AASLD (Associação Americana para o Estudo das Doenças do Fígado), em 2005 (VIERLING et al., 2005). Além disso, o melhor entendimento da imunologia nessa infecção é essencial para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e, não obstante, de uma vacina eficaz contra o HCV (FREEMANN et al., 2001; WRIGHT & DARLING, 2004).

Os portadores de insuficiência renal crônica em hemodiálise constituem um subgrupo de alta prevalência da infecção crônica pelo HCV, cerca de dez vezes maior do que a da população geral, em razão dos maiores riscos de infecção nosocomial, entre outros fatores de risco que lhe são peculiares. A hepatite C consiste na principal hepatopatia crônica nesta população específica e representa importante fator de risco para diminuição da sobrevida de pacientes e enxertos após o transplante renal. (MEYERS et al., 2003). Subentende-se que maior conhecimento sobre a patogenia da infecção pelo HCV nesses indivíduos é essencial.

Pondera-se que, através de uma melhor compreensão dos padrões de resposta imune, explicações possam ser encontradas no sentido de definir a diversidade e esclarecer as incertezas na evolução natural da infecção crônica pelo HCV, haja vista que, individualmente, as formas de apresentação da doença são amplamente variadas, desde lesões hepáticas mínimas até a cirrose estabelecida. As razões que definem a natureza e a gravidade na progressão da doença carecem de maior elucidação. Sobretudo, refletindo sobre as freqüentes manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV, quase na sua totalidade relacionadas a fenômenos de auto-imunidade (GUMBER et al., 1995; CACOUB et al., 1999), mostra-se notória a participação do sistema imunológico na patogenia da doença.

A imunofenotipagem em sangue periférico tem contribuído, recentemente, para a maior compreensão dos aspectos patogênicos e evolutivos de diversas doenças infecciosas, incluindo a hepatite C crônica. A identificação de perfis imunofenotípicos tem sido correlacionada à inflamação e à gravidade da injúria tecidual hepática, assim como à resposta terapêutica (APO-LINARIO et al., 2002; PERNOLLET et al., 2002; CALVINO et al. 2007). Entender a orquestração do sistema imune, delimitando perfis específicos de resposta, supõe-se ser importante para definir estratégias particularizadas de intervenção, otimizando a abordagem clínica e terapêutica e, conseqüentemente, reduzindo custos. O presente estudo foi conduzido visando a investigação dos padrões de resposta imune em portadores de infecção crônica pelo HCV com e sem insuficiência renal crônica associada, assunto complexo, controverso e que demanda mais conhecimentos, utilizando a técnica de imunofenotipagem de células do sangue periférico por citometria de fluxo.

1.1. OBJETIVOS:

1.1.1. Objetivo Principal:

Caracterizar de forma descritiva-analítica o perfil fenotípico de leucócitos do sangue periférico em portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica.

1.1.2. Objetivos Específicos:

Para alcançar o objetivo principal, foram propostos os seguintes objetivos específicos, analisando-se, de forma comparativa, os grupos portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica:

- A) Caracterizar a frequência de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico envolvidos na resposta imune inata e adaptativa;
- B) Analisar a expressão de marcadores de ativação em leucócitos do sangue periférico;
- C) Analisar a expressão de marcadores de regulação da resposta imune em leucócitos do sangue periférico;
- D) Estudar a expressão de receptores de quimiocinas por monócitos e linfócitos T;
- E) Estabelecer correlações entre os parâmetros fenotípicos de leucócitos do sangue periférico com variáveis demográficas, laboratoriais e histológicas de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica associada.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EPIDEMIOLOGIA:

A hepatite C representa, atualmente, um grande problema de saúde pública, com repercussão mundial. A prevalência global da hepatite C crônica é estimada em aproximadamente 3% (variando entre 0.1 a 5% em diferentes países): há cerca de 150 milhões de portadores crônicos do HCV dispersados pelo mundo, dos quais acredita-se que quatro milhões estejam nos Estados Unidos e cinco milhões distribuídos na Europa ocidental. Em países industrializados, o HCV é responsável por 20% dos casos de hepatite aguda, 70% dos casos de hepatite crônica, 40% dos quadros de cirrose em estágio terminal, 60% dos casos de carcinoma hepatocelular e 30% das indicações de transplantes de fígado (EASL INTERNACIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS C, 1999).

No Brasil, estima-se que a prevalência de portadores deste agente viral possa variar entre 1,5 e 2% (SILVA, 1999), percentual semelhante ao observado na Índia, China, Cuba e Etiópia. Em inquérito nacional realizado, envolvendo, em maioria absoluta, pré-doadores de sangue e abrangendo as cinco regiões do país, a prevalência de doadores com anti-HCV positivo foi de 1,23% (RELATÓRIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA, 2002). Infere-se que a prevalência da viremia pelo HCV esteja ao redor de 1% na população geral. Vale ressaltar que a população de pré-doadores de sangue é composta por população supostamente sadia, não representando, portanto, o perfil dos pacientes portadores de hepatite C. Uma pesquisa de base populacional, cuja amostra incluiu indivíduos residentes no município de São Paulo, com idade entre dois e setenta anos, a prevalência geral do HCV foi de 1,42%, sendo que, no grupo de indivíduos com mais de trinta anos de idade, este percentual atingiu 3,8% (FOCACCIA et al., 1998). Existem dados da OMS (Organização Mundial de Saúde) sugerindo que a prevalência da hepatite C no Brasil encontre-se entre 2,7% e 4,9% (PYBUS et al., 2001). Estes números, embora estimados, estariam mais próximos daqueles do último estudo citado.

A insuficiência hepática terminal relacionada ao HCV é a principal doença de base em pacientes referidos para transplante hepático, respondendo por metade ou mais dos transplantes em muitos centros. As hepatites crônicas, principalmente a hepatite C, têm sido um desafio

científico mundial e um sério problema de saúde pública (STRADER et al., 2004). A hepatite crônica C é, atualmente, a principal causa de morte por hepatopatia avançada nos Estados Unidos e os portadores crônicos do HCV representam quatro vezes a população acometida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (KIM, 2002). Estima-se que o número anual de mortes causadas pelo HCV, por cirrose e hepatocarcinoma, poderá superar o número de mortes causadas pelo HIV (EASL INTERNACIONAL CONSENSUS CONFERENCE ON HEPATITIS C, 1999).

2.2. HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C:

O curso natural da infecção pelo HCV é lento e progressivo na maioria dos casos. Estudos prospectivos demonstraram que 60 a 85% daqueles infectados pelo HCV evoluem para cronificação da infecção, sendo que, aproximadamente, 15 a 20% dos indivíduos infectados pelo HCV recuperam-se espontaneamente e 25% apresentam um curso assintomático e com as aminotransferases persistentemente normais (VILLANO et al., 1999). Uma parte dos pacientes com evidência bioquímica de hepatite crônica evolui com atividade necroinflamatória leve ou moderada e fibrose hepática mínima, de prognóstico incerto e pouco conhecido. Entretanto, 20% dos pacientes com hepatite crônica pelo HCV desenvolvem cirrose e suas complicações após 10 a 20 anos de infecção (ALTER & SEEF, 2000).

A hepatite C crônica progride por meio da deposição de fibrose no parênquima hepático. No entanto, a doença não apresenta evolução uniforme em todos os portadores crônicos. Enquanto alguns indivíduos desenvolvem cirrose e carcinoma hepatocelular em 20 a 30 anos, outros permanecem com hepatite leve e mínima fibrose por mais de 50 anos. Vários co-fatores estão envolvidos na progressão da doença para a cirrose estabelecida. Dentre os principais fatores, possivelmente implicados na evolução da doença hepática associada à agressão pelo HCV, destacam-se: (a) idade do paciente à época da infecção - em geral, os pacientes que adquirem a doença em idade mais avançada (maior que 40 anos) apresentam evolução mais rápida para cirrose; (b) Tempo de doença maior que 20 anos; (c) sexo masculino; (d) alcoolismo; (e) esteatose hepática; (f) ferro hepático; (g) imunossupressão; (h) hemodiálise; (i) co-infecção com o vírus HIV ou com o vírus da hepatite B (HBV). (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, AASLD, 2002).

As incertezas em relação ao curso clínico da hepatite C, a longo prazo, devem-se, em parte, à impossibilidade de precisar a data de início da doença na maioria dos casos (fase aguda assintomática), à necessidade de biópsia hepática para demonstrar progressão da fibrose e à lenta evolução da doença desde a hepatite aguda até a cirrose ou carcinoma hepatocelular, dificultando, portanto, os estudos de seguimento. Além disso, há coexistência de muitos fatores de confusão associados e o tratamento modifica o curso natural da doença. Atualmente, não seria ético observar a progressão da fibrose em estudos prospectivos em pacientes sem intervenção terapêutica, visto que há tratamento anti-viral aprovado para a hepatite C (SEEFF, 2000).

O desenho do estudo sobre história natural da doença deve ser considerado na interpretação da análise. Nos estudos retrospectivos observa-se maior taxa de progressão para cirrose. Estudos com intervalo de exposição ao HCV entre nove e 30 anos demonstraram progressão para cirrose variável de 6,8% a 55%. (KIYOSAWA et al., 1990; GORDON et al., 1993; TONG et al., 1995; NIEDERAU et al., 1998). Tal resultado deve-se, provavelmente, a vício de amostragem, normalmente selecionada a partir de casos com doença avançada em centros terciários. Por sua vez, quando o desenho do estudo é prospectivo, foi encontrado, num período de acompanhamento de 7,6 a 16 anos, percentual de 7,0 a 15,6% de desenvolvimento de cirrose. A crítica, neste caso, é o tempo de seguimento, porventura insuficiente (DI BISCEGLIE et al., 1991; TREMOLADA et al., 1992; KORETZ et al., 1993). Portanto, o desenho retroprospectivo pode ser o modelo, atualmente, mais apropriado para o estudo natural da doença. Neste tipo de estudo, encontrou-se, com um tempo de seguimento variável entre 17-50 anos, um percentual de desenvolvimento de cirrose entre 0,3 a 15% (DATZ C et al., 1999; KENNY-WALSH et al., 2001; SEEFF et al., 2001). Em uma metanálise (FREEMANN et al., 2001) que abrangeu 57 trabalhos publicados nos últimos anos envolvendo a história natural da hepatite C, os autores encontraram percentual de progressão para cirrose, em 20 anos de observação, aproximadamente de 22-24% nos grupos com pacientes selecionados em centros hospitalares terciários e em casos pós-transfusionais e, distintamente, de 4-7% nos grupos selecionados a partir de doadores de sangue e na comunidade. Estes dados sugerem a presença de um vício de seleção e/ou aferição, parcialmente explicado pela presença de pacientes mais graves em centros terciários, da maior probabilidade de comorbidades e idade avançada nos casos de transfusão de sangue, assim como menor prevalência de doenças associadas e de indivíduos mais jovens na comunidade e entre os doadores de sangue.

A progressão da fibrose hepática parece ser influenciada por inúmeras variáveis, a saber: a) definidos: idade no momento do contágio, duração da infecção, sexo masculino, consumo de álcool > 50g /dia, co-infecção com HIV e CD4 < 200 cel/mm³, fibrose na biópsia inicial; b) prováveis: esteatose, índice de massa corporal, ferro hepático, co-infecção com HBV, imunossupressão (renais crônicos em hemodiálise, transplantados, HIV) e níveis de ALT (alanino aminotransferase) - necrose e inflamação (POYNARD et al., 1997; MARCELLIN et al., 2002). A evolução da fibrose no tecido hepático determina, em última análise, o prognóstico. A fibrogênese é um processo dinâmico complexo, que é mediado por fenômenos necroinflamatórios e pela ativação de células estreladas e do qual participam citocinas, enzimas e fatores de crescimento. (MARCELLIN et al., 2002).

Corroboram, ademais, com o envolvimento direto do sistema imune na expressão da doença, as variadas manifestações extra-hepáticas da infecção pelo HCV, estando, quase na sua totalidade, relacionadas a fenômenos de auto-imunidade. Merecem destaque as tireoidopatias, o diabetes melito, a crioglobulinemia, a glomerulopatia membrano-proliferativa, a síndrome de Sjögren, dentre outras entidades clínicas, definidas ou provavelmente associadas à infecção pelo HCV (GUMBER et al., 1995; CACOUB et al., 1999).

Postula-se, em concordância com o exposto anteriormente, que o sistema imune deva influenciar, sobremaneira, a história natural da doença. Por conseguinte, pretende-se estudar o perfil imunofenotípico dos portadores de hepatite C crônica e, de forma particular, realizar a comparação com um grupo de pacientes com insuficiência renal crônica, com a finalidade de se obter, possivelmente, um melhor entendimento da participação do sistema imune na intrincada fisiopatogenia da doença. A seguir, menciona-se um relato conciso sobre alguns aspectos mais relevantes da resposta imunológica, com fim elucidativo, sem o intuito de esgotar o tema.

2.3. ASPECTOS BÁSICOS DA RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO VIRAL:

Os vírus, que estruturalmente são aglomerados de proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (vírus envelopados), são parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando de uma célula hospedeira para a síntese de proteínas, metabolismo energético e fonte de lipídeos. A ligação à célula hospedeira faz-se por receptores específicos e, após a entrada do vírus na célula hospedeira permissiva, há a liberação e duplicação dos ácidos nucleicos e produção de proteínas virais.

Após a infecção, diversos mecanismos da resposta imune são desencadeados com o intuito de controlar a infecção (FIG.1). 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 estimulação de substâncias com ação anti-viral direta. 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), 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, importante tanto para a ativação de outras células NK, macrófagos apresentadores de antígeno, linfócitos B (LB), bem como de elementos da imunidade adaptativa como os linfócitos T (LT). À medida que a infecção viral progride, respostas imunes específicas são ativadas, com o aparecimento de linfócitos T auxiliares (LTa-CD4+) e anticorpos secretados por linfócitos B e a expansão de clones de células T citotóxicas (LTc -CD8+). 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 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.

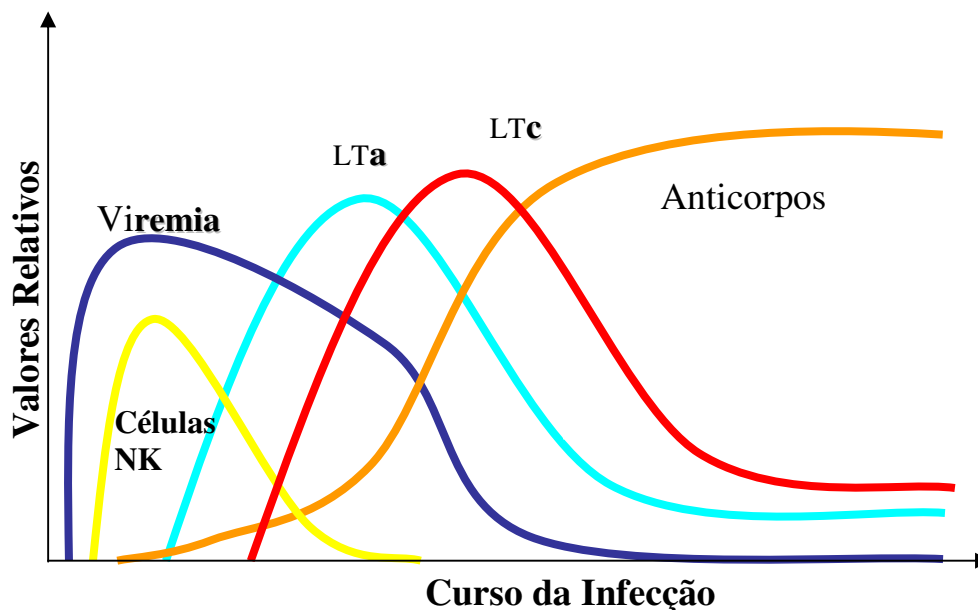


Figura 1 - Esquema de resposta imune durante uma infecção viral. Linfócitos T auxiliares (LTa) e citotóxicos (LTc); NK = *Natural Killer*. Retirado, com permissão, de MARTINS FILHO et al. (2005).

Os linfócitos T exibem uma grande variedade de funções na resposta imune à infecção viral (FIG. 2). 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: $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$. 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 (Complexo Maior de Histocompatibilidade) 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. Duas subpopulações principais de LTa podem ser identificadas em função do padrão de citocinas que elas secretam: LTa1 e LTa2.

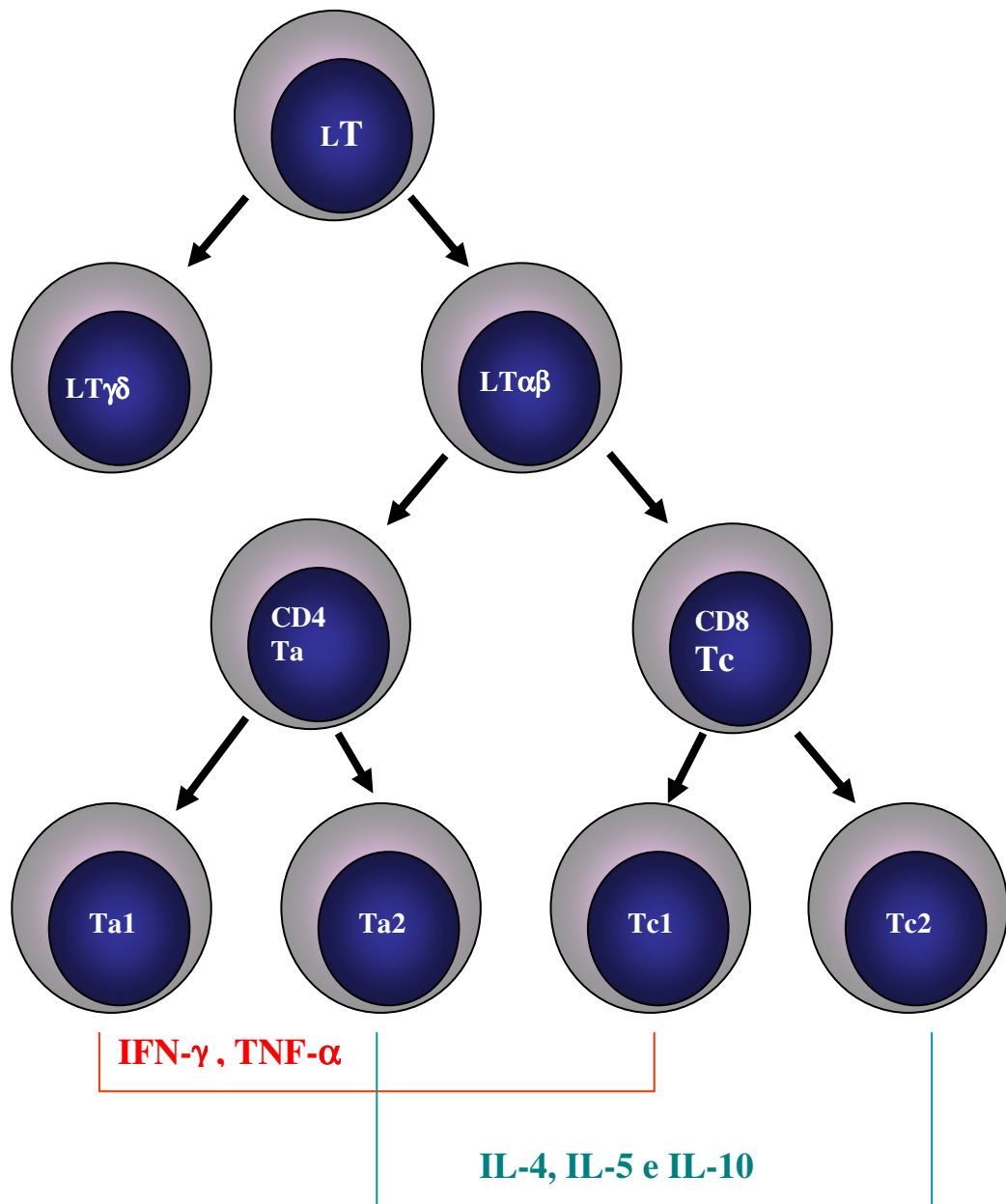


Figura 2 - Subpopulações funcionais de células T.
 Subpopulações funcionais de células T expressam o receptor de determinantes anti-
 gênicos das células T (TCR) $\gamma\delta$ ou $\alpha\beta$. Os Linfócitos T (LT) $\alpha\beta$ são subdivididos
 em populações CD4+ e CD8+, que reconhecem, respectivamente, 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 baseado no perfil das citocinas que secretam. Retirado, com permissão, de
 MARTINS FILHO et al. (2005)

Os LTc CD8⁺, capazes de interagir com moléculas de MHC de classe I, presentes em todas as células nucleadas do corpo humano, são o principal sistema de vigilância contra os vírus. É uma resposta eficiente e seletiva na maioria das infecções virais, focalizando o local de replicação viral e destruindo a célula infectada. Esse tipo de linfócito T também pode apresentar funções distintas durante a resposta imune, sendo subdivididos em duas populações: LTc1 e LTc2 (FIG 2).

De um modo geral, os linfócitos T do tipo 1 (LTa1) secretam principalmente citocinas, IFN-gama e TNF-alpha, ativadoras de mecanismos da imunidade celular, como a fagocitose e a citotoxicidade (FIG 3). 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 4).

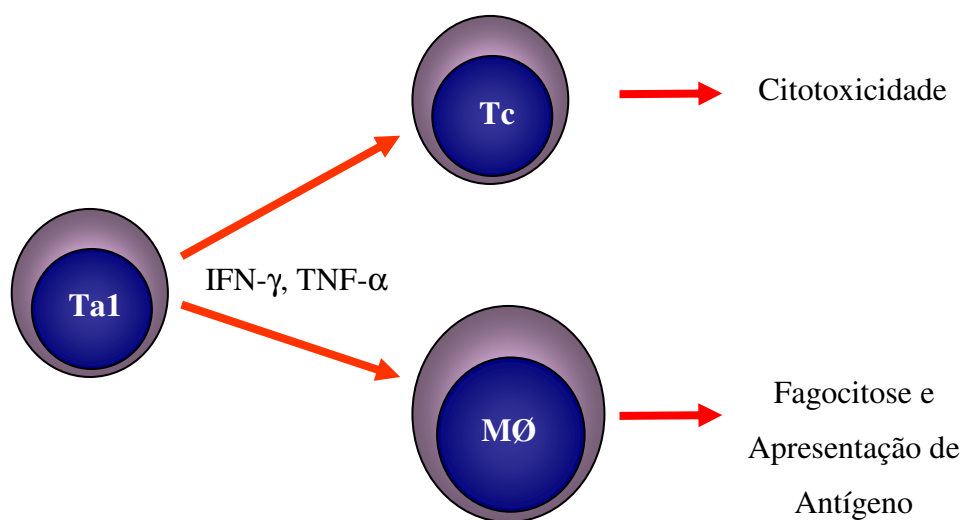


Figura 3 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos T auxiliares do tipo 1
Linfócitos T auxiliares o tipo 1 (Ta1) secretam citocinas ativadoras de mecanismos efetores da imunidade celular, incluindo a citotoxicidade de Linfócitos T citotóxicos (LTc) e a internalização e apresentação de antígeno por células fagocíticas (MØ). Retirado, com permissão, de MARTINS FILHO et al. (2005).

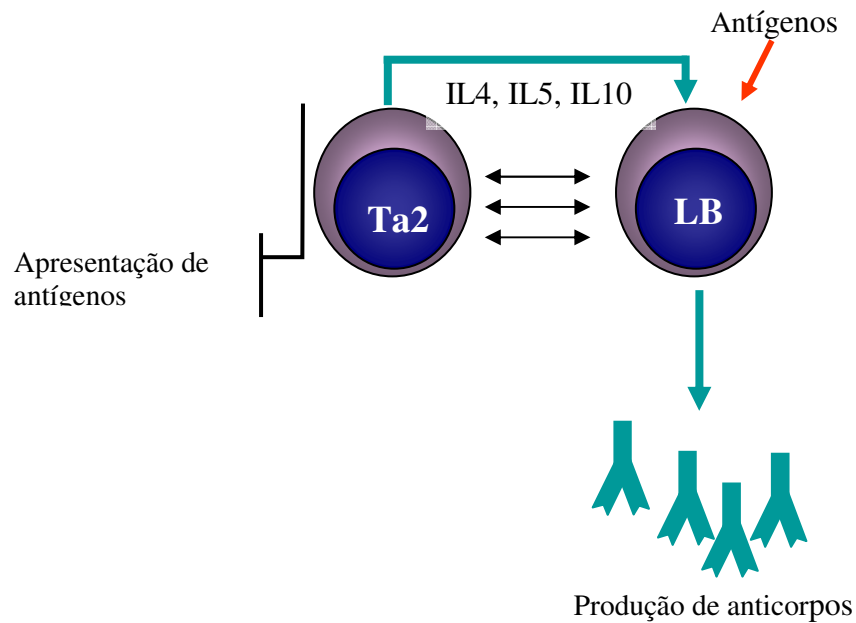


Figura 4 - Aspectos gerais das funções dos linfócitos T auxiliares do tipo 2. As células T auxiliares do tipo 2 (Ta2) são estimuladas pelas células apresentadoras de antígenos, produzem citocinas que favorecem a ativação de linfócitos B (LB) para a produção de anticorpos. As células B interagem com os LTa através de moléculas co-estimuladoras presentes na superfície celular fornecendo sinais adicionais fundamentais para a ativação celular. Retirado, com permissão, de MARTINS FILHO et al. (2005).

Cabe salientar que certos vírus podem apresentar estratégias para interferir no seu reconhecimento pelo sistema imune. A mutação de proteínas virais imunogenicamente dominantes representa uma das principais estratégias de evasão que, além de dificultar o desenvolvimento de vacinas e de proteção duradoura contra novas infecções, favorecem a persistência de infecções crônicas. Não bastassem as mutações virais e a formação de quasi-espécies, os vírus podem interferir na ativação do complemento, na produção de anticorpos, na síntese de IFN-alfa e beta, inibir o transporte de moléculas MHC classe I para a membrana da célula infectada e, ainda, codificar proteínas com homologia estrutural com receptores de superfície celular e/ou citocinas e seus receptores.

A revisão da resposta imune a agentes virais, previamente descrita, foi embasada em ABBAS et al. (2000) e segundo MARTINS FILHO et al. (2005). A seguir, serão abordados alguns aspectos relevantes da resposta imune desencadeada pela infecção humana pelo HCV, enfatizando o papel controverso dos mecanismos de imunidade celular e humoral. Ressalta-se a importância da investigação científica acerca dos elementos imunológicos ainda não elucidados, inerentes à infecção pelo HCV, na luz do conhecimento da complexidade do sistema imune. Além disso, enfatiza-se a importância da compreensão de suas interações no contexto do balanço entre padrões da resposta imune inflamatória e moduladora não como mecanismos polares, isolados e independentes, mas sim como uma resultante do predomínio de um ou outro tipo de resposta imune num padrão misto.

2.4. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO VÍRUS DA HEPATITE C:

A ausência de uma resposta T-linfocítica eficaz e a elevada capacidade de o vírus HCV realizar mutações parecem promover um elevado índice de cronificação da infecção. A heterogeneidade genética do HCV tem importante implicação diagnóstica e clínica, o que, possivelmente, explica, ainda, as dificuldades no desenvolvimento da vacina contra o vírus e os percentuais de falha terapêutica. O HCV replica preferencialmente nos hepatócitos, porém não é um vírus, a princípio, diretamente citopático, concorrendo para a persistência da infecção (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, AASLD, 2002).

O sistema imune do hospedeiro parece desempenhar importante papel na limitação da replicação do HCV e da lesão tecidual observada na doença hepática relacionada à infecção pelo vírus (CHENEY et al., 2000). Entretanto, estudos sobre a imunopatologia da infecção crônica pelo HCV têm mostrado que a resposta imune celular, em particular, o perfil das citocinas produzidas durante a infecção, parece estar envolvida com a lesão hepatocelular, podendo ser um fator importante relacionado com a cronificação da doença e a resistência ao tratamento antiviral (CACCIARELLI et al., 1996; EDWARDS-SMITH et al., 1999). 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. 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 po-

de ser útil para explicar porque a maioria dos indivíduos infectados desenvolvem hepatite crônica, enquanto outros apresentam evidência mínima de inflamação e alguns poucos conseguem erradicar a infecção.

Na infecção pelo HCV, há evidências que suportam o conceito de que o padrão de resposta com predominância de citocinas do tipo 1 se correlaciona com a erradicação da infecção aguda. Por outro lado, indivíduos que apresentam resposta predominante do tipo 2 tendem a apresentar persistência da infecção (CHENEY et al., 2000). Mesmo em indivíduos com 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). 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. A quantidade de IL-10 produzida pode, potencialmente, influenciar a evolução da doença, uma vez que a IL-10 parece ser capaz de interferir na resposta imune antiviral do indivíduo (WAAL MALEFYT et al., 1998). Foi observado 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 este desvio para uma resposta do tipo 2, poderia comprometer a resposta imune do hospedeiro, resultando, pois, na cronificação da infecção 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 INF- 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 infecções, aguda e crônica, apresentam níveis plasmáticos de TNF- α elevados quando comparados com indivíduos não infectados (TILG et al., 1992; NELSON et al., 1997). 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). Tem sido demonstrado que a expressão do gene do TGF- β 1, medida pela concentração intra-hepática de RNA mensageiro (mRNA – *messenger RNA*) da citocina, apresenta-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. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores mostrou que os níveis plasmáticos de TGF- β 1 eram significativamente maiores em pacientes com hepatite crônica ativa do que em pacientes com hepatite crônica ou cirrose e em indivíduos normais (SHIRAI et al., 1994).

Os fatores que determinam o desenvolvimento de uma infecção crônica pelo HCV ainda não estão bem esclarecidos. Recentemente, a evolução das infecções causadas pelos vírus HBV e HIV foi relacionada com o polimorfismo dos antígenos leucocitários humanos (HLA). Entretanto, permanece incerto o papel do polimorfismo dos HLA nas lesões pela infecção crônica pelo HCV (KUZUSHITA et al., 1998).

Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺) são cruciais na orquestração da imunidade celular contra patógenos intracelulares. Estas células reconhecem os peptídeos virais antigênicos ligados às moléculas de histocompatibilidade (HLA) classe II na membrana das células infectadas. Os LTa também desempenham papel fundamental na ativação dos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), responsáveis pela eliminação das células infectadas por vírus e, em conjunto, produzem citocinas que podem inibir a replicação viral. A resposta eficiente dos LTa aos diferentes antígenos virais, incluindo os do core, está associada a uma evolução benigna da infecção pelo HCV (LASARTE et al., 1998).

A defesa imunológica celular do hospedeiro, incluindo os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, está ativada em pacientes com infecção pelo HCV (NAVEAU, 1999). A patogenia da hepatite pelo HCV parece estar relacionada a esta resposta imune. A intensidade da resposta dos linfócitos T na fase inicial da infecção pode ser crítica na evolução da doença. A resposta inicial à infecção pelo HCV é uma defesa imune não-específica, produção de IFN alfa e beta, seguida por ativação de macrófagos, atividades celulares citotóxicas, tais como das células NK e NKT (Linfócitos T *natural killer*), com produção de INF-gama, fase esta que, em conjunto com a participação de linfócitos Treg CD4⁺CD25^{HIGH}, parece ser crucial no desfecho da resposta imune e, por esta razão, tem sido o objeto de vários estudos. Subseqüentemente, a resposta imune específica (adaptativa) consiste de uma resposta de LTa, de caráter mais bem definido.

Os LTa reconhecem antígenos virais ligados a moléculas de MHC da classe II na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC) e diferenciam-se em dois subtipos, LTa1 e LTa2. Linfócitos Ta1, por sua vez, são responsáveis pela indução de citotóxicos CD8⁺ específicos, enquanto linfócitos Ta2 induzem a proliferação de linfócitos B específicos e a produção de anticorpos anti-HCV (PAPATHEODORIDIS, 1999).

O papel da resposta imune humoral na evolução da infecção crônica pelo HCV não está claramente definido (FREEMANN et al., 2001). De acordo com BASSETT et al. (1999), o esclarecimento da infecção pelo HCV pode ocorrer na ausência do desenvolvimento de quaisquer anticorpos contra proteínas do envelope. Em conformidade com este estudo, realizado em chimpanzés, a presença de anticorpos parece não se correlacionar com proteção. No entanto, o emprego recente de culturas de tecido hepático possibilitou a identificação de anticorpos que bloqueiam a entrada do HCV nos hepatócitos, através da neutralização da endocitose do vírus *in vitro* (LOGVINOFF et al., 2004).

Como observado, o papel da imunidade adquirida no curso da evolução da infecção pelo vírus C é objeto da abordagem de diversos estudos, sendo, neste aspecto, mais bem elucidado. No entanto, a natureza da imunidade protetora, incluindo o papel da resposta imune inata após exposição ao HCV, permanece indefinida. Pouco é conhecido sobre o papel da imunidade inata na hepatite C. Células NK e NKT podem ter papel significativo na resposta imune em relação a patógenos hepatotrópicos, tais como o HCV (FREEMANN et al., 2001). Em contraste com outras infecções por flavivírus e pelo próprio HBV, a maioria dos indivíduos adultos com infecção primária pelo HCV desenvolve infecção persistente. Postula-se que outros mecanismos de defesa imunológica, ainda não bem esclarecidos, possam estar envolvidos na resposta imune à infecção pelo HCV. De acordo com ISAGULIANTS et al. (2003), o hospedeiro responde precocemente à replicação viral por meio da resposta imune inata através da produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação de células NK e NKT. A potência da resposta inata parece ser determinada por constantes genéticas predeterminadas e por variáveis adquiridas. Numa abordagem atual, a pesquisa de células T reguladoras (BAECHER-ALLAN et al., 2001; DIECKMANN et al., 2001; JONULEIT et al., 2001), de subpopulações de células NK com expressão diferencial das moléculas CD56 e CD16/FcγRIII (ROBERTSON & RITZ, 1990; GADDY et al., 1997; COOPER et al., 2001), de células NK T (GODFREY et al., 2000; LOZA et al., 2002) e de monócitos pró-inflamatórios (BELGE et al., 2002) poderia

trazer informações importantes que contribuam para o entendimento da infecção crônica pelo HCV. Para dar suporte a esta pesquisa, populações previamente descritas serão reavaliadas, como as células T CD3⁺, células B e células NK (subpopulações); subpopulações de células T (T CD4⁺ e T CD8⁺), B (células B convencionais e células B1), bem como a ativação de subpopulações de células T, através da detecção da molécula HLA-DR.

Associa-se à busca de um entendimento mais abrangente dos mecanismos de clareamento viral, a recente descoberta de que o HCV apresenta um amplo tropismo celular. O HCV pode ser encontrado não exclusivamente nos hepatócitos, mas, também, em células do sistema imune (células B, monócitos, macrófagos, células dendríticas), epitélio e em áreas imunologicamente privilegiadas, como o sistema nervoso central (ISAGULIANTS, 2003).

Receptores para a fração cristalizável (Fc) das imunoglobulinas (Ig) são responsáveis pela cooperação entre as fases celular e humoral do sistema imune (REVETCH et al., 1986). A detecção de diferentes tipos de receptores, dependendo do estado de diferenciação e do tipo celular em que se expressam, pode ser de grande importância na avaliação da resposta à infecção crônica pelo HCV, uma vez que alterações em seu nível de expressão estão associadas a enfermidades imunomoduladas. Como exposto anteriormente, a hepatite C pode se apresentar clinicamente através de manifestações extra-hepáticas de natureza auto-imune. (GUMBER et al., 1995; CACOUB et al., 1999). A distribuição seletiva desses receptores e sua diversidade permite mediar diferentes respostas que vão desde funções efetoras como a fagocitose, secreção de citocinas, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e desgranulação de células, até sinais imunomoduladores como a regulação da proliferação e secreção de anticorpos por linfócitos B (WALLACE et al., 1994). Presume-se que a análise da expressão destes receptores em tipos celulares diversos possa contribuir para o esclarecimento da sua implicância na patogenia da doença.

Em macrófagos, muitas funções acessórias e efetoras são mediadas através dos receptores para fração cristalizável de Ig (FcRs). Constitutivamente expressos em monócitos humanos, receptores FcγR de baixa e alta afinidade exercem funções efetoras, incluindo ADCC e fagocitose. A subpopulação de monócitos que expressam FcγRIII (CD16) ganhou atenção considerável uma vez que está aumentada em várias condições patológicas, especialmente infecções. Os monócitos CD14⁺CD16⁺ são considerados mais ativados e maduros, sendo denomi-

nados macrófagos-like. Estas células produzem constitutivamente citocinas pró-inflamatórias e *in vitro* secretam pouco ou níveis indetectáveis de IL-10 após estimulação por LPS. Monócitos CD16⁺, por sua vez, expressam elevados níveis de HLA-DR comparados com monócitos CD16⁻ (ZIEGLER et al., 1996; SKRZECYŃSKA et al., 2002) podendo assim ser distinguidos em monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻HLA-DR⁺), e monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺). A avaliação de secreção de citocinas demonstrou que a população minoritária de monócitos pró-inflamatórios é a principal produtora de TNF- α no sangue (BELGE et al., 2002). Baseado nestas informações, o presente estudo propõe avaliar a expressão de receptores para IgG, bem como quantificar a população de monócitos clássicos e proinflamatórios presentes no sangue periférico de pacientes cronicamente infectados 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 (BANNER et al., 1997). 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 selectinas ou adressinas, e pelos receptores de quimiocinas, substâncias quimiotáticas importantes no recrutamento celular para o foco inflamatório. Estas duas categorias de moléculas são importantes no direcionamento e no processo seletivo da migração celular para os tecidos afetados pelo agente infeccioso (ABBAS e cols, 2000). Por conseguinte, busca-se uma avaliação mais completa da resposta imune celular, abrangendo o estudo da expressão diferencial de receptores de quimiocinas em populações celulares (células CD4⁺ e CD8⁺) do sangue periférico com potencial de migração para o foco inflamatório no compartimento hepático.

Espera-se que esta análise ampla dos componentes do sistema imune, no contexto da infecção pelo HCV, identifique aspectos relevantes e elucidativos para uma melhor compreensão da patogenia da doença, visando-se uma abordagem pontual e global desses complexos mecanismos imunológicos.

2.5. A HEPATITE C NO CONTEXTO DA INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA:

Os pacientes com infecção crônica pelo HCV e portadores de doença renal crônica avançada, em hemodiálise, representam um grupo particular de pacientes cujo interesse em um melhor entendimento da patogenia da doença é colocado como uma das prioridades no desenvolvimento de protocolos para estudos (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, AASLD, 2002).

Os pacientes portadores de IRC apresentam, em geral, perda progressiva e irreversível da função renal de filtração glomerular e alterações na produção e excreção de hormônios renais. A deficiência da filtração glomerular leva à uremia, um quadro complexo de sinais e sintomas secundário às anormalidades fisiológicas e bioquímicas, como o acúmulo de uréia e creatinina no organismo. Juntamente com outras toxinas urêmicas, como as proteínas e os hormônios, esse quadro pode resultar em diminuição dos mecanismos imunes de defesa humoral e celular (MEYERS et al, 2003).

A produção de eritropoietina, importante hormônio estimulador da produção de hemácias pelos rins, está diminuída na insuficiência renal. Como consequência, surge a anemia, uma das complicações de maior impacto na qualidade de vida dos pacientes com insuficiência renal, atingindo cerca de 90% dos pacientes. O tratamento, à base de eritropoietina recombinante humana, não é eficaz em todos os casos. Por esta razão, os pacientes com IRC são frequentemente submetidos a transfusões de sangue, aumentando significativamente o risco de aquisição dos vírus hepatotrópicos - HCV, HBV e HDV (vírus da hepatite delta), dentre outros - e do HIV (HERRINE, 1999). Os pacientes submetidos à hemodiálise apresentam alto risco de adquirir o vírus C em razão das múltiplas transfusões de sangue, do tempo prolongado a que são submetidos ao procedimento e ao transplante renal (POORDAD et al., 2004).

A infecção crônica pelo HCV entre os pacientes portadores de IRC pode resultar em significativa morbidade e mortalidade. A insuficiência hepática secundária à hepatite crônica pelo HCV é uma das principais causas de morte em transplantados renais. Além disso, tem-se descrito que a infecção pelo HCV pode resultar em glomerulonefrite e síndrome nefrótica (CARITHERS, 1999).

Embora a história natural da infecção pelo HCV nesta população não seja bem conhecida, estima-se que 50 a 65% dos pacientes positivos apresentam níveis normais de ALT. Entretanto, a disfunção hepática atribuída ao vírus C pode levar à morte 8 a 28% dos pacientes transplantados renais. Por esta razão, os esforços mundiais têm se concentrado no estabelecimento de protocolos e normas de controle da infecção e abordagem terapêutica da hepatite aguda e crônica neste grupo de pacientes (NAKAYAMA et al, 2000).

Os estudos recentes têm enfatizado a significativa morbidade e mortalidade atribuídas à infecção pelo HCV em pacientes transplantados renais e em uso de imunossupressores. Por esta razão, esforços internacionais estão sendo concentrados no estabelecimento de critérios, indicações e contra-indicações ao transplante de órgãos em portadores crônicos do HCV, na alocação de órgãos de doadores positivos ou negativos para o vírus C para recipientes positivos ou negativos para este vírus, na adequação do uso de imunossupressores para os pacientes portadores de hepatite C crônica e, por fim, nas conseqüências do transplante renal na evolução da hepatite C crônica. Estes fatos exemplificam a complexidade da abordagem destes pacientes (POORDAD et al., 2004).

Conjectura-se que a resposta imune à infecção pelo HCV possa apresentar particularidades intrínsecas neste subgrupo de portadores renais crônicos, reflexão esta que motiva e justifica a inclusão deste grupo distinto no presente estudo. A imunopatogenia, com referência ao perfil da resposta imune, carece de maior elucidação. Enquanto estudos mais recentes demonstram que a resposta imune celular está relativamente preservada na IRC, parece haver uma deficiência da resposta imune humoral na doença renal avançada, visto que já foi demonstrado que a sorologia pelo ELISA anti-HCV pode não ser confiável em pacientes em diálise. (MEYERS et al, 2003). Um estudo multicêntrico, realizado na Alemanha, envolvendo 43 unidades de hemodiálise, demonstrou que 21,6% dos pacientes virêmicos, detectados por PCR (Reação de Polimerização em Cadeia), apresentaram a pesquisa de anticorpos anti-HCV negativa pelo ELISA de 3ª geração (HINRICHSSEN et al., 2002). Em outro estudo, desenvolvido em Porto Alegre-RS, esse mesmo achado foi observado em 2,3% dos renais crônicos. (DOTTA et al., 2003). Postula-se que o estudo da expressão de receptores de Ig na interface da resposta imune celular e humoral bem como, de subpopulações de linfócitos B, possa identificar alguma alteração na resposta imune que potencialmente auxilie na explicação dessas evidências.

2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Ignorado por muitos anos, o fígado, atualmente, é reconhecido como um órgão de atividade imune complexa, que tem um papel crucial em algumas das mais importantes patologias experimentadas pelo ser humano, abrangendo septicemia, doença metastática e, não obstante, infecções hepatotrópicas. Mesmo em seu estado sadio, o fígado está constantemente envolvido em uma rede de intrincados desafios imunológicos para os quais está surpreendentemente bem equipado, incluindo uma ampla carga de antígenos provenientes da dieta e microorganismos comensais que devem ser imunotolerados, ao lado de patógenos, toxinas, células tumorais para as quais tem de desempenhar rápida e efetiva resposta (BOWEN et al., 2005). Os componentes locais, celulares e moleculares, da imunidade inata e adaptativa combinam com elementos do sistema imune circulante para prover o fígado com o seu particular e poderoso sistema imune regional. O órgão é dominado pelos componentes da resposta imune inata que rapidamente respondem a agentes infecciosos externos e a células infectadas e com mutações (DOHERTY & FARRELLY, 2000).

De forma peculiar, o fígado possui atuação preponderante na regulação da inflamação sistêmica, bem como da resposta imune local, sendo ponte na interação entre patógeno e hospedeiro. (VIERLING et al., 2005) O desequilíbrio da resposta imunológica parece ser fator decisivo na evolução da infecção e nas consequências estruturais resultantes da injúria experimentada.

Concluindo, conforme as prioridades para futuras pesquisas definidas pela conferência da AASLD 2005 (VIERLING et al., 2005), há necessidade de implementar estudos cujos objetivos estejam voltados para um maior entendimento da patogenia da infecção pelo HCV, particularmente para uma melhor caracterização dos aspectos virológicos, imunológicos e outros fatores ligados ao hospedeiro que determinam o curso e o desfecho da infecção pelo HCV. Tais estudos poderiam, possivelmente, identificar os aspectos mais críticos em relação aos determinantes do clearance viral e os elementos necessários para o desenvolvimento de imunidade. Um melhor entendimento destas correlações imunológicas poderia também favorecer o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e, não obstante, de uma vacina eficaz contra o HCV (FREEMANN et al., 2001). Por outro lado, a maior compreensão do papel da resposta imune inata e o estudo de novas sub-populações celulares, como as células T re-

guladoras, as subpopulações de células NK e de monócitos circulantes, assim como o estudo da resposta imune humoral, apresentam-se como uma abordagem recente que poderia esclarecer fenômenos intrínsecos da fase crônica da infecção, fornecendo subsídios que poderiam explicar, em parte, alguns aspectos patogênicos ainda pouco esclarecidos da infecção crônica pelo HCV.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. TIPO DE ESTUDO:

Trata-se de um estudo descritivo, analítico, transversal, realizado entre janeiro de 2005 a março de 2007, envolvendo a Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Belo Horizonte, como instituição principal, e as instituições secundárias: Centro de Pesquisas René-Rachou – FIOCRUZ, Fundação Hemominas - Hemocentro de Belo Horizonte e a Unidade de Hemodiálise - Núcleo de Nefrologia de Belo Horizonte.

3.2. CASUÍSTICA:

3.2.1. Cálculo do tamanho amostral:

O cálculo do número (n) de pacientes estimado por grupo foi baseado em estudos previamente realizados sobre imunofenotipagem e resposta imune em pacientes cronicamente infectados pelo HCV (Caccicarelli et al, 1996, Lechmann et al, 1996). Observa-se que, na literatura, os estudos conduzidos, envolvendo imunologia e hepatite C crônica, apresentam n semelhante ou ainda mais reduzido. A seleção de participantes que preenchem os critérios de inclusão e exclusão e os custos provenientes deste tipo de metodologia aplicada são fatores limitantes a serem considerados.

3.2.2. Descrição da casuística:

O estudo compreendeu quatro grupos de indivíduos, totalizando 70 participantes, incluídos consecutivamente, de acordo com a seguinte distribuição:

1. Controle: 15 doadores voluntários de sangue, provenientes da Fundação Hemominas-Hemocentro Regional de Belo Horizonte (grupo = NI);
2. Controle: 19 portadores de IRC, sem infecção crônica pelo HCV, provenientes do centro de hemodiálise-Núcleo de Nefrologia de Belo Horizonte, MG (grupo = IRC);

3. Pacientes: 20 portadores de infecção crônica pelo HCV, com função renal normal, provenientes do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG (grupo = HepC);
4. Pacientes: 16 portadores de infecção crônica pelo HCV e de insuficiência renal crônica em hemodiálise, provenientes do Ambulatório de Hepatites Virais do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFMG (grupo = HepC+IRC).

3.2.3. Critérios de inclusão e exclusão:

São critérios de inclusão comuns a todos os grupos: idade entre 18 e 65 anos (exceção ao grupo 1–NI = idade entre 18 e 60 anos), indivíduos de ambos os sexos.

São critérios de exclusão pertencentes a todos os grupos: ingestão etílica maior que 20 g/dia e não concordância em participar do estudo.

A - Participantes do grupo 1 (NI):

São doadores aptos, sob os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- sorologia negativa para HCV (ELISA 3ª Geração), HBV, HIV, HTLV I/II, sífilis e chagas;

Critérios de exclusão:

- critérios comuns a todos os grupos, acima descritos.

B - Participantes do grupo 2 (IRC):

São portadores de insuficiência renal crônica terminal em terapia renal substitutiva (hemodiálise), sob os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- presença de alanina aminotransferase normal (ALT);
- sorologia negativa para o HCV (anti-HCV ELISA 3ª geração);
- HCV-RNA qualitativo por PCR negativo;

Critérios de exclusão:

- portadores de hepatite B (HBsAg positivo e/ou anti-HBc IgM e/ou IgG positivos), HIV positivo, gestação, portadores de doenças auto-imunes, uso de imunossupressores, transplantados;

C - Participantes do grupo 3 (Hep C):

São portadores de hepatite C crônica, virgens de tratamento, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, seguindo os critérios relacionados:

Critérios de inclusão:

- infecção crônica pelo HCV confirmada por sorologia (ELISA 3ª geração) positiva e detecção do HCV-RNA por PCR qualitativo no sangue periférico.

Critérios de exclusão:

- Cirrose hepática descompensada, doença hepática auto-imune (Anti-músculo liso e/ou anti-LKM1 e/ou anti-mitocôndria e/ou anticorpo anti-núcleo positivos), hepatite B (HBsAg e/ou anti-HBc IgM e/ou IgG positivos), HIV positivo, insuficiência renal, gestação, doenças auto-imunes, uso de imunossupressores, transplantados;

D - Participantes do grupo 4 (HepC+IRC):

São portadores de insuficiência renal crônica terminal em hemodiálise e hepatite C crônica associada, virgens de tratamento, atendidos no Ambulatório de Hepatites do Instituto Alfa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, sob os seguintes critérios:

Critérios de inclusão:

- infecção crônica pelo HCV confirmada por sorologia (ELISA 3ª geração) positiva e detecção do HCV-RNA por PCR qualitativo no sangue periférico;
- insuficiência renal crônica avançada, sob terapia substitutiva renal (hemodiálise).

Critérios de exclusão:

- pacientes com cirrose hepática descompensada, portadores de doença hepática auto-imune (anti-músculo liso e/ou anti-LKM1 e/ou anti-mitocôndria e/ou anticorpo anti-núcleo positivos), portadores de hepatite B (HbsAg e/ou anti-HBc IgM e/ou IgG positivos), HIV positivo, gestação, doenças auto-imunes, uso de imunossupressores; transplantados.

3.2.4. Caracterização da Casuística:

Abordou-se o perfil epidemiológico da amostra, registrando-se os dados relevantes para cada grupo. Com exceção das variáveis idade e sexo (comuns a todos os grupos), de forma específica, foram considerados os seguintes dados epidemiológicos:

- Nos grupos com IRC (IRC e HepC+IRC): tempo de diagnóstico da IRC, causa da IRC, tempo de hemodiálise, número de transfusões sanguíneas e data aproximada do início das transfusões;
- Nos grupos com infecção crônica pelo HCV (HepC e HepC+IRC): fatores de risco para hepatite C (epidemiologia provável), tempo provável de infecção (epidemiológico) e do diagnóstico da doença.

Adicionalmente, nos grupos com infecção crônica pelo HCV (HepC e HepC+IRC), foram avaliados os dados laboratoriais (bioquímicos, sorológicos, biologia molecular) e histológicos pertinentes, conforme descrito em métodos.

3.2.4.1. Características referentes a todos os grupos:

A amostra, envolvida no protocolo de pesquisa, compreendeu um total de 70 indivíduos, cujos dados epidemiológicos, idade e sexo, estão sumarizados na TAB.1. No grupo NI, constituído por 15 doadores, 8 (56,3%) eram do sexo masculino e 7 (43,7%) eram do sexo feminino. A idade variou entre 19 e 50 anos, com média de 31,4 anos. Em relação ao grupo IRC, dos 19 controles incluídos, 10 (52,6%) e 9 (47,4%) eram homens e mulheres, respectivamente. A idade média foi 50,3 anos e a amplitude variou entre 36 e 62 anos. O grupo HepC foi constituído por 11 (55,0%) pacientes do sexo masculino e 9 (45,0%) do sexo feminino, sendo a idade média de 52,9 anos, com valor mínimo de 33 anos e máximo de 65 anos e, no grupo HepC+IRC foram incluídos 16 pacientes, sendo 10 (62,5%) homens e 6 (37,5%) mulheres. A idade média foi de 41,4 anos, com variação entre 24 e 63 anos. A idade média, apenas do grupo NI, foi estatisticamente menor ($p>0,05$).

A variável raça (cor da pele) não foi considerada pela dificuldade de caracterização e pouca relevância neste estudo. Ressalta-se que a ingestão etílica abusiva, conforme descrito previamente, compreende um dos critérios de exclusão do estudo.

Tabela 1 - Dados epidemiológicos referentes aos grupos em estudo

Grupos	n	Sexo		Idade [#] Mediana Variação
		M	F	
		n (%)	n (%)	
NI	15	08 (56,3)	07 (43,7)	31,4 (19-50)*
IRC	19	10 (52,6)	09 (47,4)	50,3 (36-62)
HepC	20	11 (55,0)	09 (45,0)	52,9 (33-65)
HepC+IRC	16	10 (62,5)	06 (37,5)	41,4 (24-63)

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; M=masculino; F=feminino; [#] mediana e variação (em anos); * p< 0,05 – ANOVA.

3.2.4.2. Características relativas aos grupos com insuficiência renal:

Os dois grupos constituídos por portadores de IRC em hemodiálise estão desta forma configurados quanto à etiologia da doença renal crônica (TAB.2):

Tabela 2 - Etiologia da doença de base nos grupos com insuficiência renal crônica

Doença de Base	Grupo IRC ¹		Grupo HepC+IRC ²	
	n	%	n	%
Hipertensão arterial	14	73,7	8	50,0
Doença renal policística	3	15,7	3	18,7
Pielonefrite crônica	1	5,3	4	25,0
Hipertensão arterial e diabetes melito	1	5,3	1	6,3
Total	19	100	16	100

¹ Insuficiência renal crônica; ² Hepatite C crônica e Insuficiência renal crônica

A TAB.3 descreve os dados sobre o período de tempo da evolução da IRC, a partir do diagnóstico, e do tempo de permanência em hemodiálise até a data da inclusão no estudo. Relata,

também, o tempo de início das hemotransfusões, a partir da primeira, e o número prévio, aproximado, de transfusões sanguíneas.

Tabela 3 - Dados epidemiológicos dos grupos com insuficiência renal crônica

Grupos	n	Tempo [#] diagnóstico da IRC ⁺	Tempo [#] em hemodiálise	Tempo [#] início transfusões	Número de transfusões Prévias [§]
IRC	19	4,0*	4,0*	3,0*	2
HepC+IRC	16	14,0	11,5	10,0	5

IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica;
[#] mediana e variação (em anos); ⁺insuficiência renal crônica; [§]média; *p < 0,05 – Mann-Whitney

3.2.4.3. Características particulares dos grupos com hepatite C crônica:

Em relação aos grupos que envolvem portadores da infecção pelo HCV, HepC e HepC+IRC, estão descritos, a seguir, os principais dados epidemiológicos, laboratoriais e histológicos. A TAB.4 apresenta a epidemiologia provável, demonstrando os principais fatores de risco para aquisição da infecção pelo VHC.

Tabela 4 - Epidemiologia provável da infecção pelo vírus da hepatite C

Epidemiologia	Grupo HepC ¹		Grupo HepC+IRC ²	
	n	%	n	%
Transfusão sanguínea	4	20,0	9	56,3
Uso de drogas	6	30,0	0	0
Acidente biológico	1	5,0	0	0
Sexual	1	5,0	0	0
Cirurgia de grande porte	2	10,0	0	0
Desconhecida	2	10,0	0	0
Cirurgia e transfusão	3	15,0	4	25,0
Nosocomial	1	5,0	3	18,7
Total	20	100,0	16	100,0

¹ Insuficiência renal crônica; ² Hepatite C crônica e Insuficiência renal crônica

O grupo HepC apresenta um tempo médio de diagnóstico da hepatite C crônica de 3,9 anos (variação entre 1 a 12 anos), sendo o tempo médio provável de infecção, com base nos dados

epidemiológicos, de 23,7 anos (1 a 40 anos). O grupo HepC+IRC apresenta um tempo médio de diagnóstico da hepatite C crônica de 5,1 anos (variando entre 1 a 13 anos), com tempo médio de infecção, a partir da epidemiologia provável, de 13 anos (1 a 40 anos). (TAB.5)

Considerando os dados laboratoriais, o perfil da ALT, em ambos os grupos, foi analisado de forma quantitativa (contínua) (FIG.5) e de forma categorizada (ordinal) (FIG.6), descrita na forma de número de vezes o limite superior da normalidade (LSN).

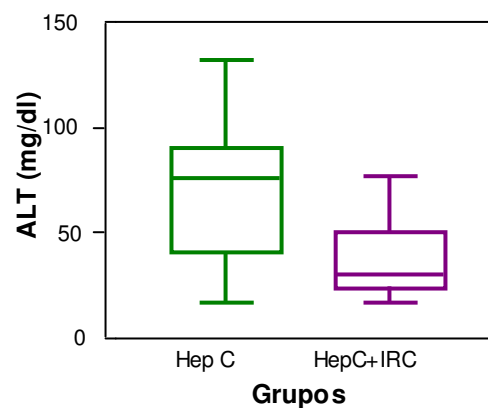


Figura 5 - Variação dos níveis da ALT nos grupos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C

Variação dos níveis da ALT nos grupos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C crônica + insuficiência renal crônica; Teste de Mann-Whitney - $p=0,000$.

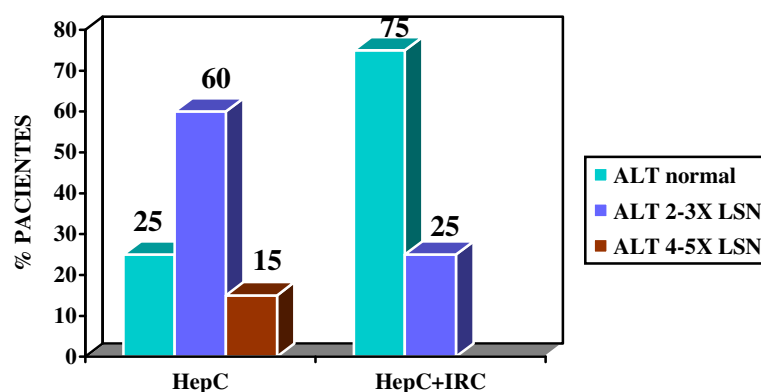


Figura 6 - Perfil da distribuição dos níveis da ALT nos grupos com infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

Hep C = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica + insuficiência renal crônica; ALT= alanino aminotransferase; LSN = Limite Superior da Normalidade.

No grupo HepC foi encontrado um valor médio da ALT de $73,5 \pm 33,4$ mg/dL (variação entre 17,0 a 132,0 mg/dl), sendo que em 15 (75%) dos pacientes o nível da ALT se encontrava acima de 2 vezes o LSN. O grupo HepC+IRC apresentou um nível médio da ALT de $38,3 \pm 21,1$ mg/dL (variação entre 17,0 a 77,0 mg/dl), sendo que em 12 (75%) dos pacientes o nível da ALT estava normal ($p=0,000$). (TAB.5) (FIG.6)

Tabela 5 - Dados epidemiológicos, laboratoriais e de biologia molecular dos grupos com hepatite C crônica

Grupos	n	Tempo [#] infecção (anos)	ALT ^{#+}	Carga Viral ^{#§}	Genótipo n (%)		
					1	2	3
HepC ¹	20	26,5 (1-40)	76,0 (17-132)	461,7 (49-880)	13	1	3
HepC+IRC ²	16	10,0 (1-40)*	30,5 (17-77)*	182,5 (23-490)*	6	2	2

[#] mediana e variação; ⁺ ALT= alanino aminotransferase (mg/dl); [§] x 1000; ¹ Hepatite C crônica; ² Insuficiência renal crônica e Hepatite C crônica. A carga viral e genótipo: no grupo HepC–n=17 e no grupo HepC+IRC–n=10; * $p < 0,05$ – Mann-Whitney

Quanto aos dados de biologia molecular, a quantificação da carga viral revelou mediana de 461722 UI/ml (variação de 49300 a 882000 UI/ml) avaliada em um total de 15 pacientes do grupo HepC e mediana de 182514 UI/ml (variação de 23000 a 490722 UI/ml) em um total de 10 pacientes do grupo HepC+IRC ($p < 0,05$ - Mann-Whitney) (TAB. 5) (FIG.7). Na TAB.6 encontra-se a distribuição dos genótipos verificados em cada grupo.

Tabela 6 - Distribuição dos genótipos do vírus da hepatite C por grupo

Genótipo	Grupo HepC ¹		Grupo HepC+IRC ²	
	n	%	n	%
1	13	76,5	6	70,4
2	1	5,9	2	11,1
3	3	17,6	2	18,5
Total	17	100,0	10	100,0

¹ Insuficiência renal crônica; ² Hepatite C crônica e Insuficiência renal crônica

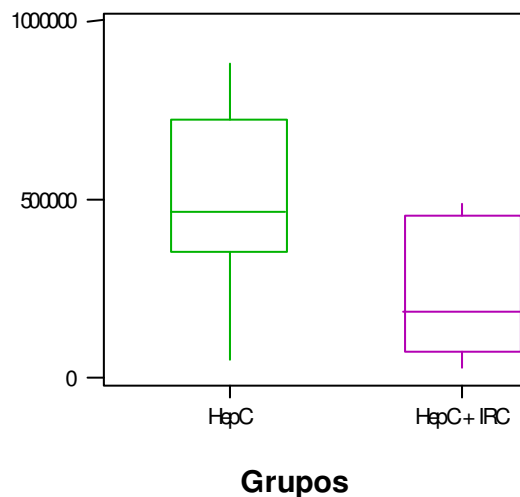


Figura 7 - Quantificação da carga viral do vírus da hepatite C por Reação em Cadeia da Polimerase.
□ HepC = hepatite C crônica; □ HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Teste de Mann-Whitney – $p=0,011$.

Em relação à histologia hepática, de acordo com o escore METAVIR (BEDOSSA, P., POYNARD T, 1996), os dados estão apresentados na TAB.7. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com referência ao grau de atividade histológica e estágio de fibrose ($p=0,298$ e $p=0,127$, respectivamente–*Qui-quadrado*). No entanto, enquanto o valor médio do grau de atividade histológica foi de 1 em ambos os grupos, os pacientes do grupo HepC apresentaram um valor médio de fibrose de 3, comparado ao valor de 1 no grupo HepC+IRC.

Tabela 7 - Achados à histologia hepática nos grupos com hepatite C crônica

Histologia [#]	Grupo HepC ¹		Grupo HepC+IRC ²	
	n	%	n	%
Grau de atividade				
0	0	0	1	8,3
1	12	60,0	8	66,7
2	6	30,0	2	16,7
3	2	10,	1	8,3
Total	20	100,0	12	100,0
Estágio de fibrose				
0	3	15,0	3	25,0
1	5	25,0	5	41,6
2	3	15,0	2	16,7
3	5	25,0	0	0
4	4	20,0	2	16,7
Total	20	100,0	12	100,0

¹ Insuficiência renal crônica; ² Hepatite C crônica e Insuficiência renal crônica; [#] Escore METAVIR.

3.3. MÉTODOS:

3.3.1. Entrevista clínica, dados laboratoriais e histológicos:

Foi realizada entrevista clínica pelo pesquisador, diretamente, com cada um dos participantes que concordaram com o estudo, previamente à coleta da amostra de sangue. Foram obtidos, a partir desta entrevista, além da verificação do preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão, os dados demográficos e epidemiológicos, de acordo com o grupo de interesse e conforme detalhado anteriormente.

Os participantes que concordaram com o estudo, após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento, foram submetidos à entrevista clínica, seguida de exame físico e coleta de 5 mL de sangue total em veia periférica, em um tubo contendo EDTA como anticoagulante, amostra a partir da qual o protocolo foi desenvolvido. A coleta de sangue do grupo NI foi feita por venopunção única, em conjunto com a amostra destinada aos demais exames necessários para o Hemominas. Para o grupo 2 - IRC - a coleta foi realizada imediatamente antes da conexão do paciente à máquina e antes da heparinização do circuito. Em relação aos grupos 3

e 4, a coleta foi realizada após a consulta habitual do paciente no Ambulatório de Hepatites Virais, por profissional treinado.

Foram obtidos, também, a partir do prontuário, nas instituições/ serviços de origem, os dados laboratoriais (bioquímicos, sorológicos, biologia molecular) e histológicos pertinentes. Em relação, especificamente, aos grupos HepC e HepC+IRC, ressalva-se que foram pesquisados os seguintes dados de Biologia Molecular: PCR-RNA qualitativo (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems, limite de detecção 50 UI/ml) e o PCR-RNA quantitativo (AMPLICOR[®], Roche Molecular Systems, limites de detecção 600 UI/ml a 850000 UI/ml). A genotipagem foi realizada para o HCV e a genotipagem realizada por seqüenciamento direto de um segmento da região 5' UTR, conforme previamente descrito (SIMMONDS, et al. 1993).

Todos os exames de biologia molecular de detecção, quantificação e genotipagem foram realizados no Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Esses dados foram coletados somente dos pacientes que realizaram a pesquisa por motivo de protocolo para avaliação da indicação de tratamento.

A avaliação histológica, quando realizada e por motivos inerentes ao acompanhamento do paciente no ambulatório, foi baseada na classificação METAVIR (BEDOSSA, P., POYNARD T, 1996) e avaliada pelo Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG.

3.3.2. Imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico:

Os ensaios de imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram realizados segundo o protocolo proposto pelo fabricante, modificado por MARTINS-FILHO (2000), conforme descrito a seguir:

Em tubos de poliestireno 22x75mm foram adicionados 10µl da diluição constituída pelo anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse marcado com fluorocromo, diluído em PBS (0,015M pH 7,4), nas concentrações descritas (TAB.8). Para cada análise foram utilizados 50µl de sangue periférico total coletado a vácuo em tubos de

5ml contendo EDTA como anticoagulante. Após a etapa de homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à etapa de lise dos eritrócitos, utilizando 2ml de solução de lise comercial (FACS™ Lysing Solution - Becton Dickinson) diluída 10 vezes em água destilada. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram incubadas, novamente, por 10 minutos à temperatura ambiente e, então, submetidas à centrifugação (7 min- 1300 rpm- 18° C). O sobrenadante foi descartado por inversão e as amostras foram lavadas com 2ml de PBS (0,015M pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação supracitadas. Em seguida, foram adicionados 200µl da solução de PBS (0,015M pH 7,4) em cada tubo, sendo, imediatamente, realizada a leitura dos parâmetros fenotípicos das células presentes em cada tubo por imunofluorescência, com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACSscan - Becton Dickinson), utilizando-se o programa CELLQuest™ para aquisição e análise dos dados, empregando diferentes estratégias de análises, conforme descrito nos próximos itens.

O protocolo para a marcação dos receptores de quimiocinas foi desenvolvido de forma semelhante, exceção ao tubo contendo o anticorpo anti-CCR2. Este anticorpo foi incubado por 30 minutos, ao abrigo da luz, com uma amostra de 50µl de sangue periférico. Após, foi acrescentado 2ml de PBS (0,015M pH 7,4), sendo as amostras submetidas à centrifugação nas mesmas condições anteriormente descritas. A seguir, foi aspirado o sobrenadante, acrescentado ao tubo AVIDINA, diluída em uma concentração de 1:100 com PBS e, novamente, as amostras foram reincubadas por 30 minutos. Consecutivamente, o protocolo foi seguido, a partir da etapa de lise dos eritrócitos.

Tabela 8 - Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares e moléculas de superfície

Anticorpos	Diluição em PBS*	Fluorocromo	Clone	Células Alvo
Anti-IgG	1:2	FITC ¹	G1CL	-
Anti-CD3	1:2	FITC ²	UCHT1	Linfócitos T
Anti-CD4	1:5, 1:5	FITC ² , PE ³	RPA-T4,S3.5	Linfócitos T
Anti-CD5	1:2	FITC ³	L17F12	Linfócitos B1
Anti-CD8	1:2, 1:70	FITC ² , TC ³	RPA-T8, 3B5	Linfócitos T
Anti-CD14	1:9	TC ⁴	TüK4	Monócitos
Anti-CD16	1:4	TC ³	3G8	Células NK, Monócitos
Anti-CD19	1:2, 1:5	FITC ² , PE ³	4G7, SJ25-C1	Linfócitos B
Anti-CD23	1:2	PE ²	M-L233	Linfócitos B
Anti-CD25	1:2	PE ³	3G10	Linfócitos T
Anti-CD32	1:2	FITC ²	FLI8.26	Linfócitos B e Monócitos
Anti-CD56	1:2	PE ²	B159	Células NK
Anti-CD64	1:5	FITC ²	10.1	Monócitos
Anti-HLA-DR	1:2	PE ⁴	Tü36	Linfócitos T e B, Monócitos
Anti-CCR2 [#]	1:5	FITC ⁵	48607	Linfócitos T, Eosinófilos e Monócitos
Anti-CCR3	1:5	FITC ⁵	61828.111	Linfócitos T, Eosinófilos, Monócitos e Células NK
Anti-CCR5	1:5	FITC ⁵	45531	Linfócitos T, Eosinófilos, Monócitos e Células NK
Anti-CXCR3	1:5	FITC ⁵	49801	Linfócito T Ativado
Anti-CXCR4	1:5	FITC ⁵	1265	Linfócitos T

*(0,015M pH 7,4); Fabricante: ¹ Sigma; ² BD Pharmigen; ³ Caltag; ⁴ Serotec; ⁵ R&D Systems;

Uso de Avidina (Biotina), FITC, diluição de 1:100, como adjuvante para CCR2

Para cumprir os objetivos específicos propostos, anteriormente descritos, foram traçados os seguintes tópicos de investigação, visando a ordenação da metodologia de pesquisa:

A) Caracterização da frequência de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico envolvidos na resposta imune inata e adaptativa:

A.1. Imunidade inata:

A.1.1. Frequência da população e subpopulações de monócitos:

- monócitos totais, monócitos macrófago-like e monócitos pró-inflamatórios.

A.1.2. Populações e subpopulações de células *Natural Killer* (NK):

- NK total, pré-NK, NK madura e NK ativada
- NKT total, NKT1, NKT2 e NKT3
- subpopulações de células CD3⁻CD16⁻ e células CD3⁻CD16⁺

A.2. Imunidade adaptativa:

A.2.1. Populações de linfócitos:

- linfócitos T, linfócitos B e razão T/B

A.2.2. Subpopulações de linfócitos T:

- CD4⁺, CD8⁺ e razão CD4⁺/CD8⁺

A.2.3. Subpopulações de linfócitos B

- linfócitos B convencionais e linfócitos B1

B) Análise da expressão de marcadores de ativação em leucócitos do sangue periférico:

B.1. Imunidade inata:

- Expressão de CD23 em neutrófilos, eosinófilos e monócitos
- Expressão de HLA-DR em neutrófilos e eosinófilos

B.2. Imunidade adaptativa:

- Expressão de HLA-DR em Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺
- Expressão de HLA-DR em Linfócitos B
- Expressão de CD23 em Linfócitos B

C) Análise da expressão de marcadores de regulação da resposta imune em leucócitos:

C.1. Receptores de Imunoglobulina em células da imunidade inata:

- CD64 (FcγRI) em monócitos, neutrófilos e eosinófilos
- CD32 (FcγRII) em monócitos, neutrófilos e eosinófilos
- CD16 (FcγRIII) em monócitos e neutrófilos

C.2. Frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺):

- linfócitos CD4⁺CD25^{HIGH}

C.3. Expressão de CD32 por Linfócitos B:

- CD32 (Fc γ RII) em células CD19⁺

D) Estudo da expressão de receptores de quimiocinas por monócitos e linfócitos T:

D. Receptores de quimiocinas em monócitos e linfócitos T:

- Receptores de quimiocinas do Tipo 0 (CCR2, CXCR4)
- Receptores de quimiocinas do Tipo 1 (CXCR3, CCR5)
- Receptores de quimiocinas do Tipo 2 (CCR3)

E) Avaliação das correlações entre os parâmetros fenotípicos de leucócitos do sangue periférico com variáveis demográficas, laboratoriais e histológicas de pacientes portadores de hepatite C crônica com e sem insuficiência renal crônica associada:

E. Correlações entre as variáveis em estudo e os parâmetros fenotípicos:

- Dados demográficos, bioquímicos, biologia molecular e histológicos.

3.3.3. Aquisição dos Dados e Análise Estatística:

Os dados obtidos através da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico foram analisados através de diversas estratégias, dependendo do fenótipo celular rastreado. Assim, empregando-se os recursos múltiplos do programa CELLQuestTM, foram adotadas diferentes estratégias para análise fenotípica, baseadas em propostas disponíveis na literatura vigente, denominadas: análise convencional (SATHLER-AVELAR, 2003); análise de células T reguladoras (BAECHER-ALLAN et al., 2001); análise do marcador CD56 em subpopulações de células CD3-CD16+ (GADDY et al., 1997), análise de subpopulações de células CD3-CD56+ (COOPER et al., 2001); análise combinada “gated” (SATHLER-AVELAR, 2003); análise de monócitos pró-inflamatórios (BELGE et al., 2002); análise semiquantitativa da expressão de Fc γ R em monócitos (MARTINS-FILHO, 2000); análise semiquantitativa da expressão de Fc γ RIII em neutrófilos (SILVA, 1999 modificado por MARTINS-FILHO, 2000) e análise da expressão de receptores de quimiocinas (MARTINS, 2004).

Ressalta-se que esta análise foi feita em caráter cego, desconhecendo, o pesquisador, as características do paciente avaliado. Cada análise foi reavaliada por um segundo pesquisador (orientador) e as discordâncias criticamente reavaliadas. Segue abaixo a descrição:

3.3.3.1. Análise convencional

A análise convencional foi realizada segundo proposto por SATHLER-AVELAR (2003). A FIG.8 ilustra a seqüência de passos para a análise convencional. Este tipo de análise consiste na seleção da população celular de interesse baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.8A). Após a seleção da região de interesse (R1), o percentual de subpopulações celulares fluorescentes, dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição puntual de fluorescência, incluindo as modalidades *FL1 versus FL2*, *FL2 versus FL3* ou *FL1 versus FL3* (FIG. 8B).

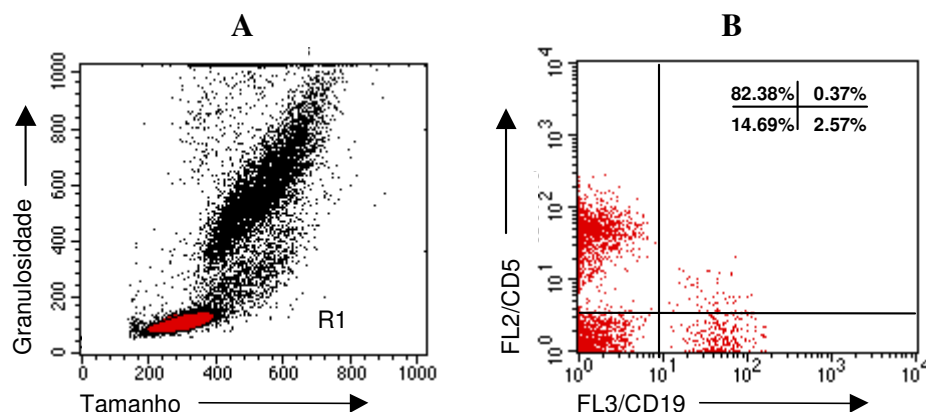


Figura 8 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de populações celulares por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar o percentual das populações ou subpopulações celulares específicas, confinadas em R1.

3.3.3.2. Análise de células T reguladoras:

A análise de células T reguladoras foi realizada segundo método proposto por BAECHER-ALLAN et al. (2001). A FIG.9 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise de células T reguladoras com fenótipo $CD4^+CD25^{HIGH}$. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.9A), gráficos de FL1/CD4 *versus* FL2/CD25 foram construídos, permitindo identificar a segregação da população $CD4^+$ em 3 subpopulações: $CD4^+CD25^-$ (R2), $CD4^+CD25^{LOW}$ (R3) e $CD4^+CD25^{HIGH}$ (R4). A fração celular confinada em R4, representa o valor percentual de células T reguladoras na população de linfócitos totais (FIG. 9B).

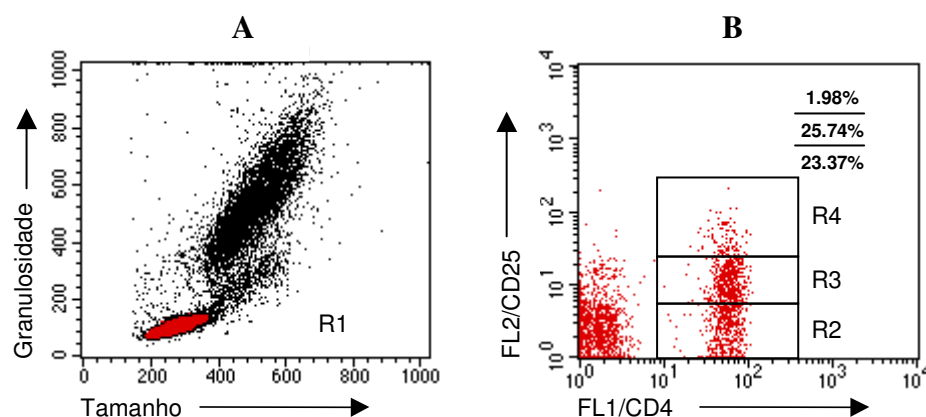


Figura 9 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD4 *versus* FL2/CD25 utilizado para quantificar o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$), confinadas em R4.

3.3.3.3. Análise do marcador CD56 em subpopulações de células $CD3^-CD16^+$:

A análise de subpopulações de células $CD3^-CD16^+$ foi realizada segundo proposto por GADDY et al. (1997). A FIG.10 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise das subpopulações de células pré-NK ($CD3^-CD16^+CD56^-$) e células NK maduras ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulidade (SSC) (FIG.10A), foram construídos gráficos de FL1/CD3 *versus* FL3/CD16, onde uma nova região R2 foi delimitada, confinando a população $CD3^-CD16^+$ (FIG. 10B). Posteriormente, gráficos de FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 foram empregados, onde uma nova região (R3) foi construída (FIG. 10C), confinando a população $CD3^-CD56^+$. Em seguida, após a combinação das regiões R1, R2 e R3 através das fórmulas “ $G2=R2+R3$ e $G3=R1$ and $G2$ ” onde “+” representa o somatório de células confinadas nas regiões R1 e R2 e “and” designa a intersecção dos eventos presentes simultaneamente em $G2$ e R1. Em seguida gráficos de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56, contendo as células confinadas em $G3$ (FIG. 10D), foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações $CD3^-CD16^+CD56^-$ e $CD3^-CD16^+CD56^+$.

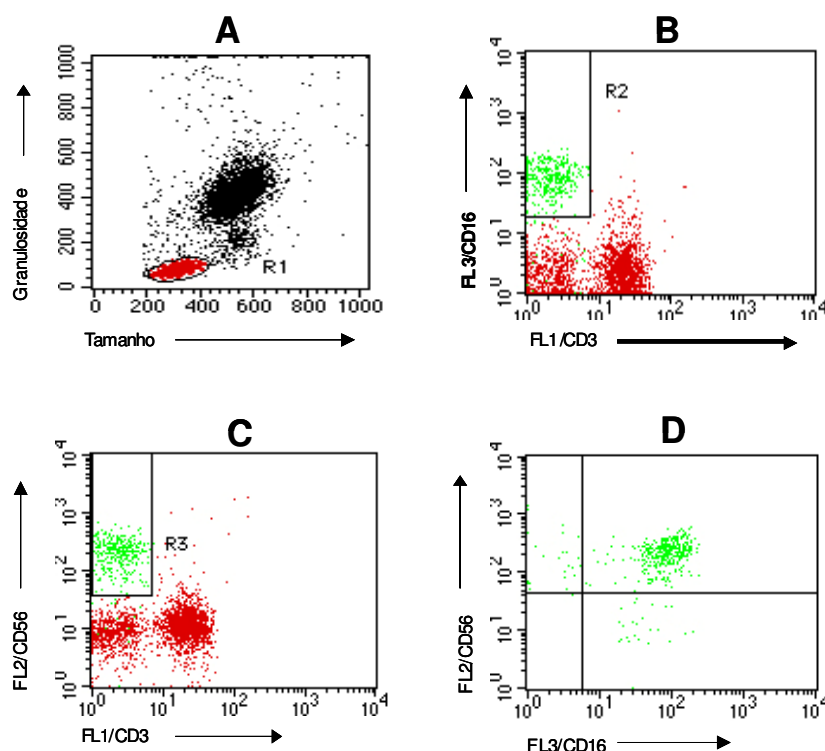


Figura 10 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações de células NK.

Células pré-NK ($CD3^-CD16^+CD56^-$) e NK madura ($CD3^-CD16^+CD56^+$) por citometria de fluxo. (A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL3/CD16 utilizado para selecionar a população celular $CD3^-CD16^+$ (R2). (C) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 *versus* FL2/CD56 utilizado para selecionar a população celular $CD3^-CD56^+$ (R3). (D) Após a combinação das regiões R1, R2 e R3 através das fórmulas “ $G2=R2 + R3$ e $G3= R1$ and $G2$ ” um gráfico de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56 contendo as células confinadas em G3 foi utilizado para quantificar as subpopulações de células NK.

3.3.3.4. Análise de subpopulações de células $CD3^-CD56^+$:

A análise de células $CD3^-CD56^+$ foi realizada segundo protocolo proposto por COOPER et al. (2001). A FIG.11 ilustra a sequência de procedimentos para a análise de células $CD3^-CD56^{DIM}CD16^{-/+}$ e $CD3^-CD56^{BRIGHT}CD16^{-/+}$. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.11A), foram construídos gráficos de FL1/CD3 *versus* FL2/CD56, onde uma região (R2) selecionou a população $CD3^-CD56^+$ (FIG.11B). O próximo passo consistiu na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “ $G2=R1$ and $R2$ ”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida, gráficos de FL3/CD16 *versus* FL2/CD56, contendo as células confina-

das em G2, foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações $CD3^+CD56^{DIM}CD16^{-/+}$ e $CD3^+CD56^{BRIGHT}CD16^{-/+}$ (FIG.11C).

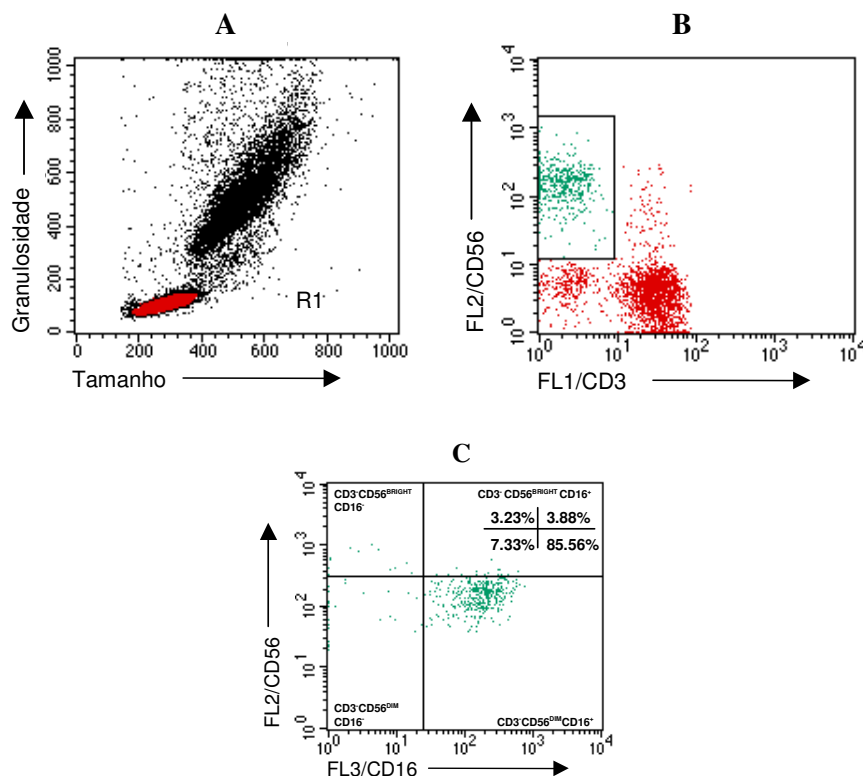


Figura 11 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais das subpopulações $CD3^+CD56^{DIM}CD16^{-/+}$ e $CD3^+CD56^{BRIGHT}CD16^{-/+}$ por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CD3 versus FL2/CD56 (R2) utilizado para selecionar a população celular $CD3^+CD56^+$ - R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um gráfico de FL3/CD16 versus FL2/CD56, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual das subpopulações $CD3^+CD56^{DIM}CD16^{-/+}$ e $CD3^+CD56^{BRIGHT}CD16^{-/+}$.

3.3.3.5. Análise combinada “gated”:

A análise de células $CD4^+$ e $CD8^+$ ativadas ($HLA-DR^+$) foi realizada segundo proposto por SATHLER-AVELAR (2003). A FIG.12 ilustra a sequência de procedimentos para a análise das subpopulações de células T ativadas. Após a seleção da região de interesse, baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC) (FIG.12A), foram construídos histogramas individuais de FL1/CD4 ou FL1/CD8, onde uma nova região R2 foi construída, confinando a população

CD4⁺ ou CD8⁺ (FIG.12B). O próximo passo consiste na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “G2=R1 and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida, histogramas unidimensional de FL2/HLA-DR, contendo as células presentes em G2, foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações CD4⁺HLA-DR⁺/CD4⁺ ou CD8⁺HLA-DR⁺/CD8⁺ (FIG.12C).

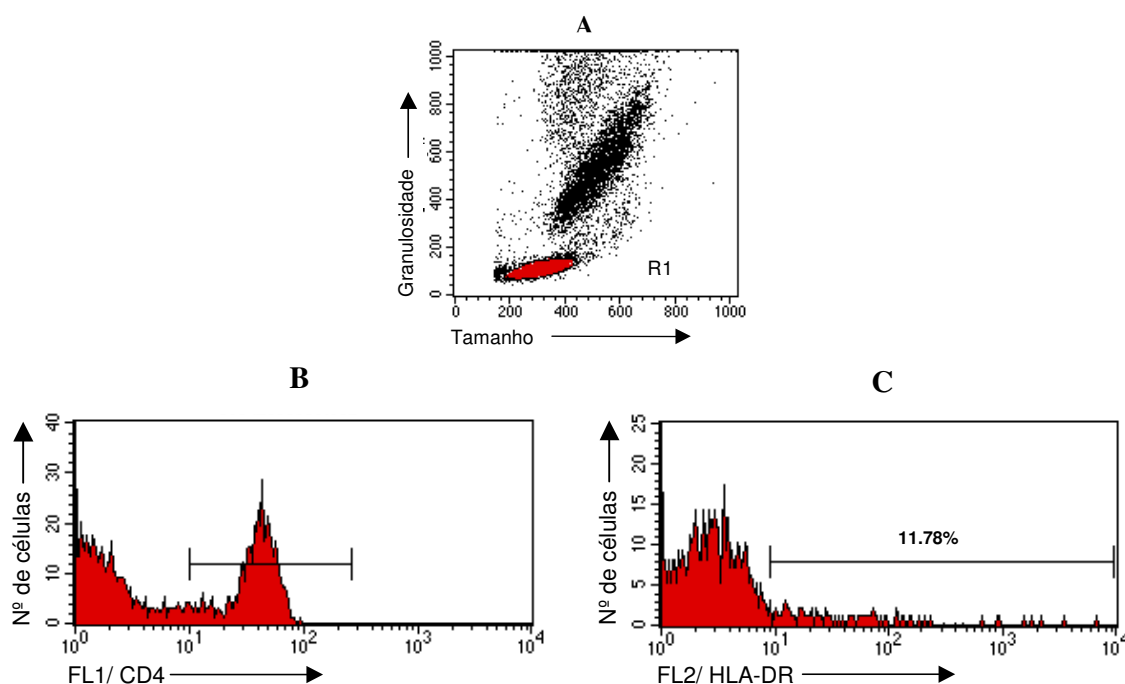


Figura 12 - Sequência de passos utilizados para as análises de subpopulações de células T CD4⁺ ou CD8⁺ ativadas (HLA-DR⁺) por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FSC *versus* SSC utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Histogramas individuais de FL1/CD4 ou FL1/CD8, onde uma nova região R2 será construída, confinando a população CD4⁺ ou CD8⁺. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “G2=R1 and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2, histogramas unidimensional de FL2/HLA-DR, contendo as células presentes em G2, foram utilizados para quantificar os percentuais das subpopulações CD4⁺HLA-DR⁺/CD4⁺ ou CD8⁺HLA-DR⁺/CD8⁺.

3.3.3.6. Análise de monócitos pró-inflamatórios:

A análise de monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺) foi realizada segundo proposto por BELGE et al. (2002). A FIG.13 ilustra a sequência de procedimentos para a análise das subpopulações de monócitos pró-inflamatórios. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de FL3/CD14 *versus* granulocidade (SSC) (FIG.13A), foram construídos

gráficos de FL3/CD14 versus FL1/CD16, onde uma região (R2) foi construída selecionando a população $CD14^+CD16^+$ (FIG.13B). O próximo passo consiste na combinação das regiões R1 e R2 através da fórmula “G2=R1 and R2”, onde “and” designa a interseção dos eventos presentes simultaneamente em R1 e R2. Em seguida, gráficos de FL3/CD14 *versus* FL2/HLA-DR, contendo as células confinadas em G2, foram utilizados para quantificar o percentual de células $CD14^+CD16^+HLA-DR^{++}$ (FIG.13C).

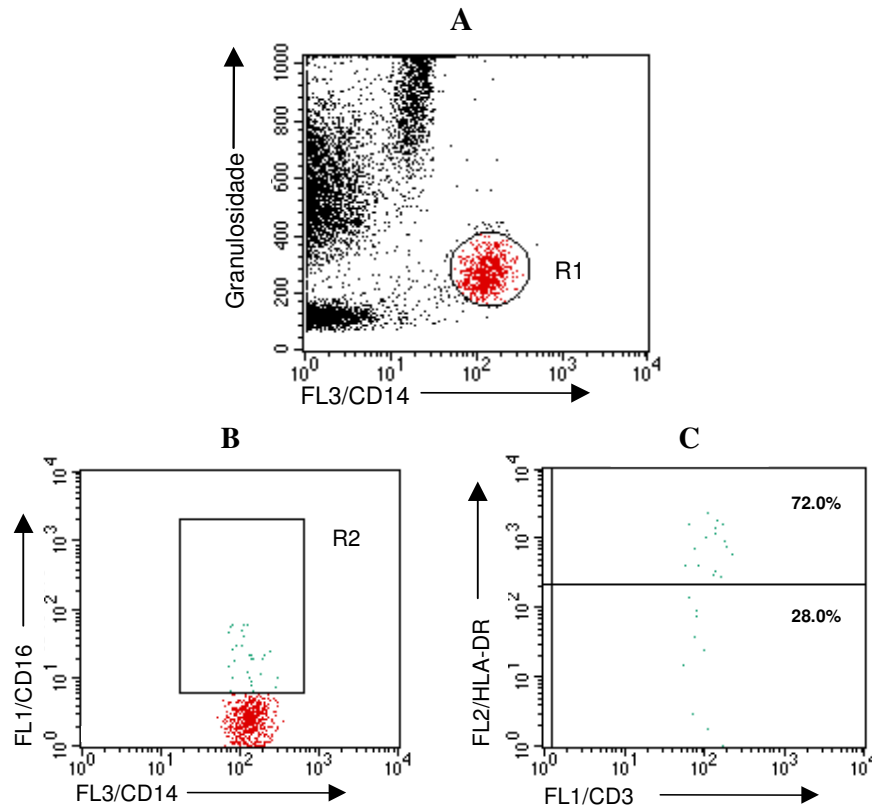


Figura 13 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais de monócitos pro-inflamatórios ($CD14^+CD16^+HLA-DR^{++}$) por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD14 *versus* granulossidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso células $CD14^+$ de granulossidade intermediária, correspondente aos monócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD14 *versus* FL1/CD16 (R2) utilizado para selecionar a população $CD14^+CD16^+$ – R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, um gráfico de FL3/CD14 *versus* FL2/HLA-DR, contendo as células confinadas em G2, foi empregado para quantificar o percentual de monócitos pró-inflamatórios.

3.3.3.7. Análise semiquantitativa da expressão de FcγR em monócitos:

A análise da expressão de FcγR (CD64, CD32 e CD16) na população de monócitos foi realizada através de análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência, segundo proposto por MARTINS-FILHO (2000). A FIG.14 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de FcγR em monócitos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos e imunofenotípicos, realizada através de gráficos de distribuição puntual de FL3/CD14 versus granulocidade (SSC) (FIG.14A), foram construídos histogramas de FL1/CD64, FL1/CD32 ou FL1/CD16 para a identificação da intensidade média de fluorescência para cada FcγR analisado na população de monócitos (FIG.14B).

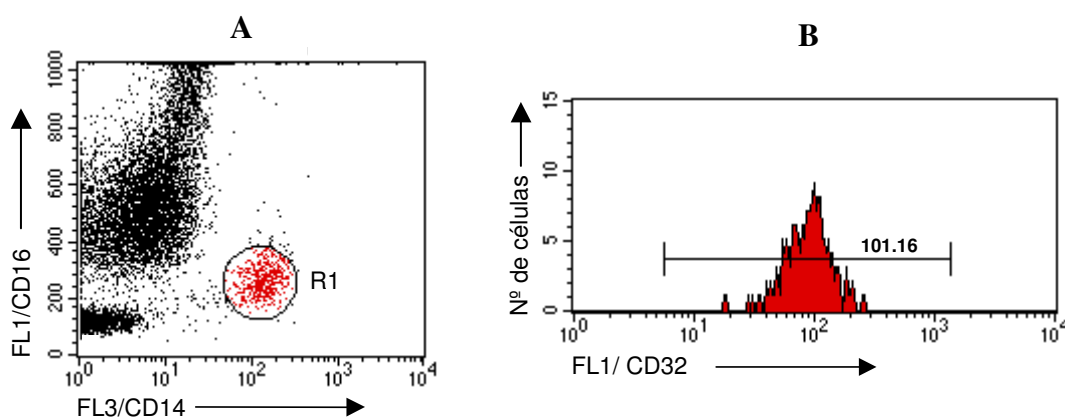


Figura 14 - Seqüência de procedimentos utilizados para a análise da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão de receptores Fcγ na população de monócitos por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual FL3/CD14 *versus* granulocidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso células CD14⁺ de granulocidade intermediária, correspondente aos monócitos – R1. (B) Histograma unidimensional utilizado para quantificar a expressão dos FcγR em monócitos, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal.

3.3.3.8. Análise semiquantitativa da expressão de FcγRIII em neutrófilos:

A análise da expressão de FcγRIII (CD16) na população de neutrófilos foi realizada através de análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência, segundo proposto por SILVA (1999) modificado por MARTINS-FILHO (2000). A FIG.15 ilustra a seqüência de procedimentos para a análise da expressão de FcγRIII em neutrófilos. Após a seleção da região de interesse (R1), baseada em aspectos morfométricos, realizada através de gráficos de

distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.15A), foram construídos histogramas de FL1/CD16, contendo as células confinadas em R1, utilizados para a identificação da intensidade média de fluorescência para o FcγRIII analisado na população de neutrófilos (FIG.15B).

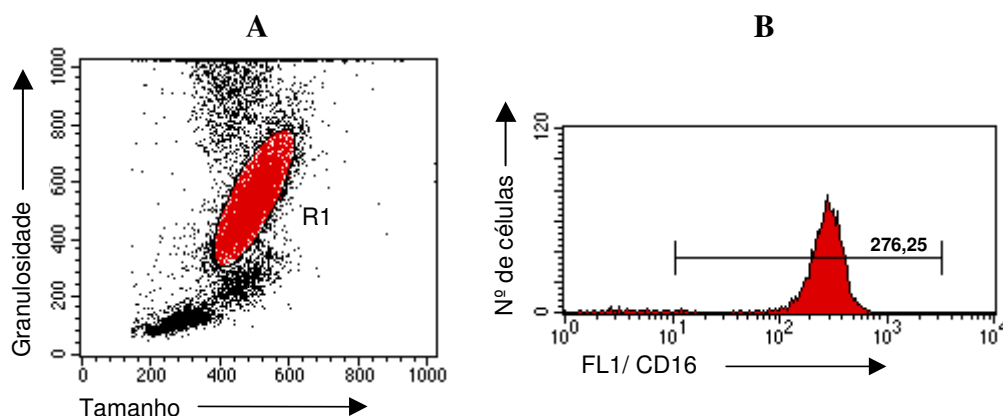


Figura 15 - Sequência de procedimentos utilizados para a análise da intensidade média de fluorescência correspondente à expressão do receptor Fcγ (CD16) na população de neutrófilos por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual tamanho *versus* granulosidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse neutrófilos – R1. (B) Histograma unidimensional utilizado para quantificar a expressão do FcγRIII em neutrófilos, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal.

3.3.3.9. Análise da expressão de receptores de quimiocinas:

A análise da expressão de receptores de quimiocinas na população de monócitos e linfócitos do sangue periférico foi realizada através de análise semiquantitativa por intensidade média de fluorescência, segundo proposto por MARTINS (2004). A FIG.16 ilustra a sequência de procedimentos para a análise dos receptores de quimiocinas. Após a seleção da região de interesse, baseada em aspectos morfométricos, obtidos através de gráficos de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (FIG.16A), foram construídos gráficos de distribuição puntual de FL1 *versus* FL2, onde foi construída a região R2, delimitando a população em estudo (FIG.16B). O próximo passo consistiu na construção de histogramas unidimensionais de FL1 *versus* FL2 combinando as regiões R1 e R2 para quantificar a intensidade média de fluorescência do receptor na população celular de interesse (FIG.16C).

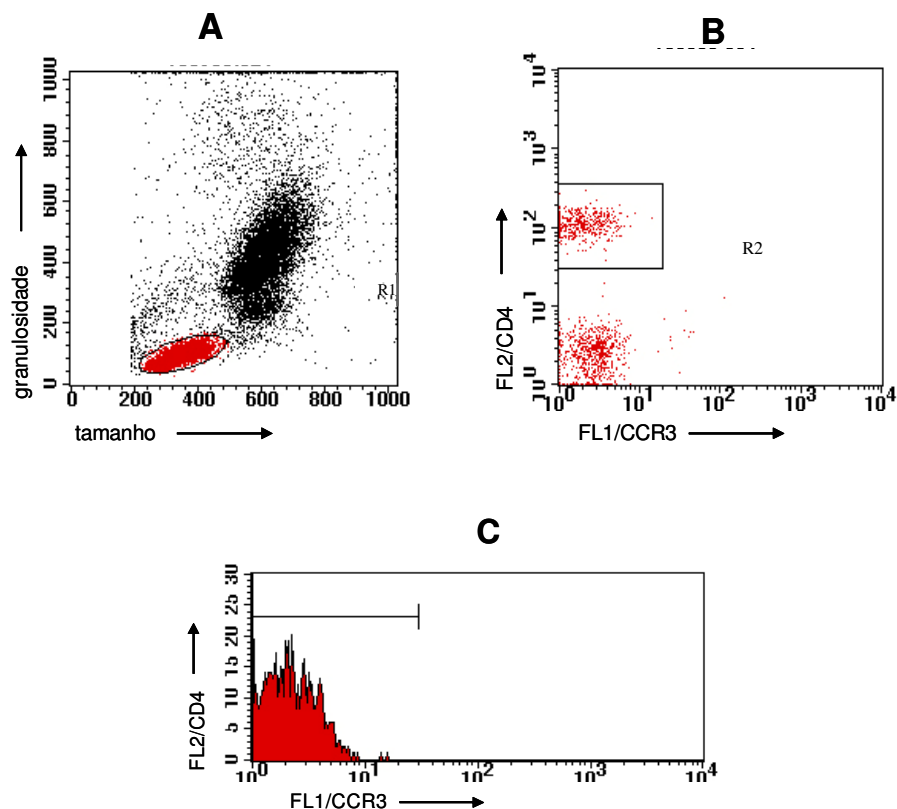


Figura 16 - Sequência de procedimentos utilizados para as análises da expressão de receptores de quimiocinas por citometria de fluxo.

(A) Gráfico de distribuição puntual de tamanho (FSC) *versus* granulidade (SSC) utilizado para a seleção da população de interesse, nesse caso linfócitos pequenos – R1. (B) Gráfico de distribuição puntual FL1/CCR3 *versus* FL2/CD4 (R2) utilizado para selecionar a população de linfócitos expressando o receptor – R2. (C) Após a combinação das regiões R1 e R2, através da fórmula “G2=R1 and R2”, foi construído um histograma unidimensional para quantificar a expressão do receptor, através de alterações na intensidade média de fluorescência da população de distribuição unimodal.

3.3.4. Análise Estatística:

Dados demográficos e bioquímicos foram analisados pelo programa *Minitab for Windows* utilizando-se os testes *Qui-Quadrado*, *t* de Student, exato de Fisher, ANOVA e Mann-Whitney, de acordo com a variável em estudo, preenchimento dos critérios de normalidade e o número de grupos comparados. As análises estatísticas dos dados provenientes da imunofenotipagem de leucócitos periféricos foram realizadas através do programa *GraphPad Software – Prism 3.0*. Para comparação entre grupos foi empregado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunns. Para a realização de correlações foi empregada a

Correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor $p < 0.05$.

3.4. ASPECTOS ÉTICOS:

O presente estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa, respectivamente, da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) e da Fundação Hemominas (CEP) – Hemocentro Belo Horizonte. Foi aprovado também pelo Departamento de Ensino e Pesquisa (DEPE) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi obtido consentimento pós-informação de todos os pacientes e doadores voluntários de sangue envolvidos no estudo.

4. RESULTADOS

Subseqüentemente, estão apresentados os resultados obtidos através das diversas estratégias de análise da imunofenotipagem dos leucócitos do sangue periférico, conforme descrito em métodos. Optou-se pela ilustração através de gráficos, de acordo com fenótipo celular rastreado, com a finalidade de se tornar objetiva e clara a exposição dos dados. Foi adotada a mesma ordenação descrita em objetivos específicos e em métodos, buscando-se tornar mais didática a exposição.

Em cada gráfico está demonstrado o resultado do teste estatístico em questão, destacando-se as diferenças estatisticamente significantes em cada grupo. Para as análises de todas as comparações foi empregado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste de Dunns, visto que os dados analisados não preencheram as suposições exigidas para distribuição normal.

4.1. RESULTADOS DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO:

4.1.1. Frequência de populações e subpopulações celulares do sangue periférico em cada grupo:

4.1.1.1. Imunidade inata:

A) Estudo da frequência da população e subpopulações de monócitos:

O resultado do percentual de monócitos (CD14⁺) no sangue periférico, em cada grupo, está representado na FIG.17. A análise dos resultados mostrou que o grupo HepC+IRC apresenta valor percentual de monócitos (CD14⁺) circulantes significativamente maior em relação aos grupos NI ($p<0,001$), HepC ($p<0,01$) e IRC ($p<0,05$).

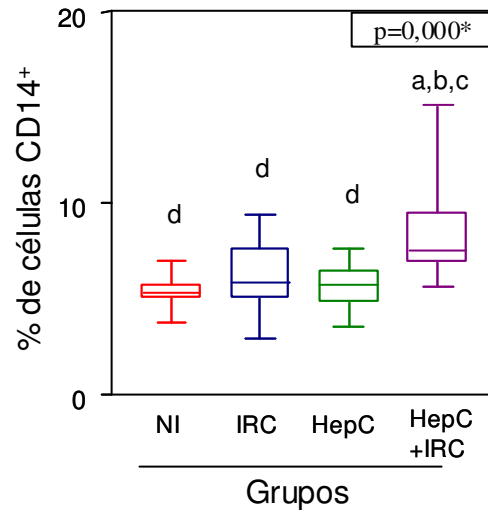


Figura 17 - Percentual de monócitos circulantes no sangue periférico em cada grupo: ■ NI = controle-doadores de sangue; ■ IRC = controle-insuficiência renal crônica; ■ HepC = hepatite C crônica; ■ HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a– em relação a NI; b– em relação a IRC; c- em relação a HepC; d– em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC+IRC – $p<0,001$; HepC x HepC+IRC – $p<0,01$, IRC x HepC+IRC, HepC x HepC+IRC – $p<0,05$.

A FIG.18 mostra, respectivamente, a razão entre monócitos macrófago-like (FIG.18A) e monócitos pró-inflamatórios (FIG.18B) em relação aos monócitos totais encontrada em cada grupo. Com referência à razão de monócitos macrófagos-like ($CD14^+CD16^+$), a análise estatística demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos NI x IRC e NI x HepC+IRC ($p<0,01$), assim como entre os grupo HepC x IRC e HepC x HepC+IRC ($p<0,05$), revelando maior proporção de macrófagos-like nos grupos IRC e HepC+IRC. Em relação à razão de monócitos pró-inflamatórios ($CD14^+CD16^+DR^{++}$), foi demonstrada análoga diferença estatística nos grupos IRC e HepC+IRC em relação a NI ($p<0,001$) e entre HepC+IRC e HepC ($p<0,05$).

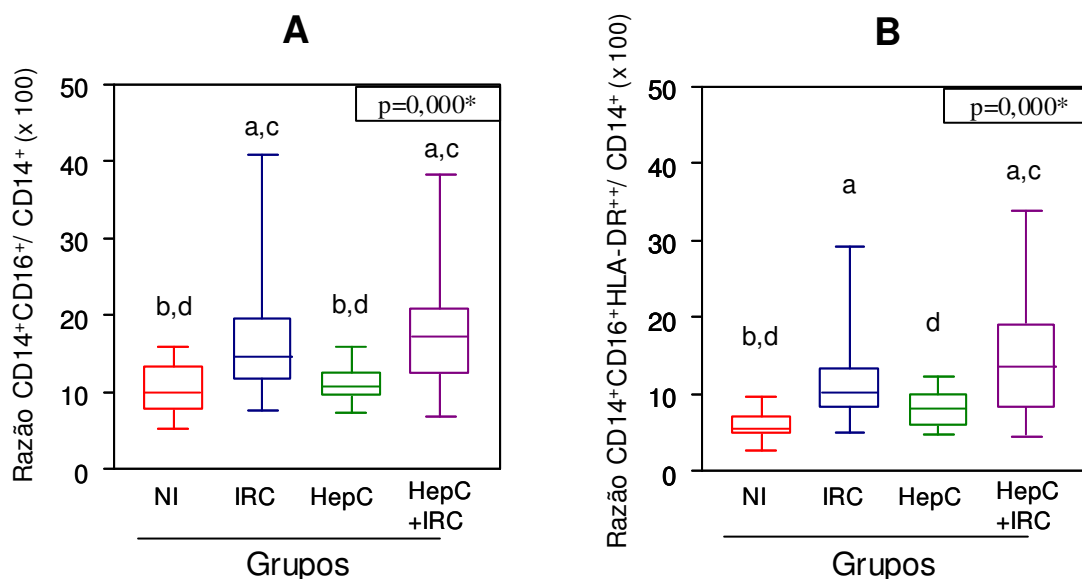


Figura 18 - Análise da razão entre macrófago-like e monócitos totais (A) e da razão entre monócitos pró-inflamatórios e monócitos totais (B) no sangue periférico:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; # MO=Monócitos *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC, NI x HepC+IRC – $p<0,001$; HepC x IRC, HepC x HepC+IRC – $p<0,05$.

B) Estudo da população e subpopulações de células *Natural Killer* (NK):

Conforme observado na FIG.19, não houve diferença significativa em relação à frequência de células NK totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) no sangue periférico entre os grupos em estudo ($p=0,103$). No entanto, a análise estatística das subpopulações de células NK (FIG.20) evidenciou menor frequência de células pré-NK (células $CD3^+CD16^+CD56^-$) no grupo HepC comparado ao grupo NI ($p<0,05$) (FIG.20A). Em relação às células NK maduras ($CD3^+CD16^+CD56^+$), os grupos não apresentaram diferença estatística ($p=0,109$) (FIG.20B). Foi

encontrada maior frequência de células NK ativadas ($CD3^+CD16^+CD56^+$) no grupo HepC+IRC em relação aos grupos NI e IRC ($p<0,05$) (FIG.20C).

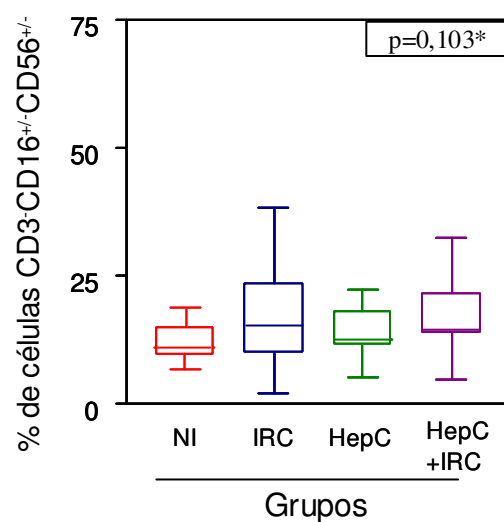


Figura 19 - Análise do percentual de células Natural Killer totais no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; *Kruskal-Wallis.

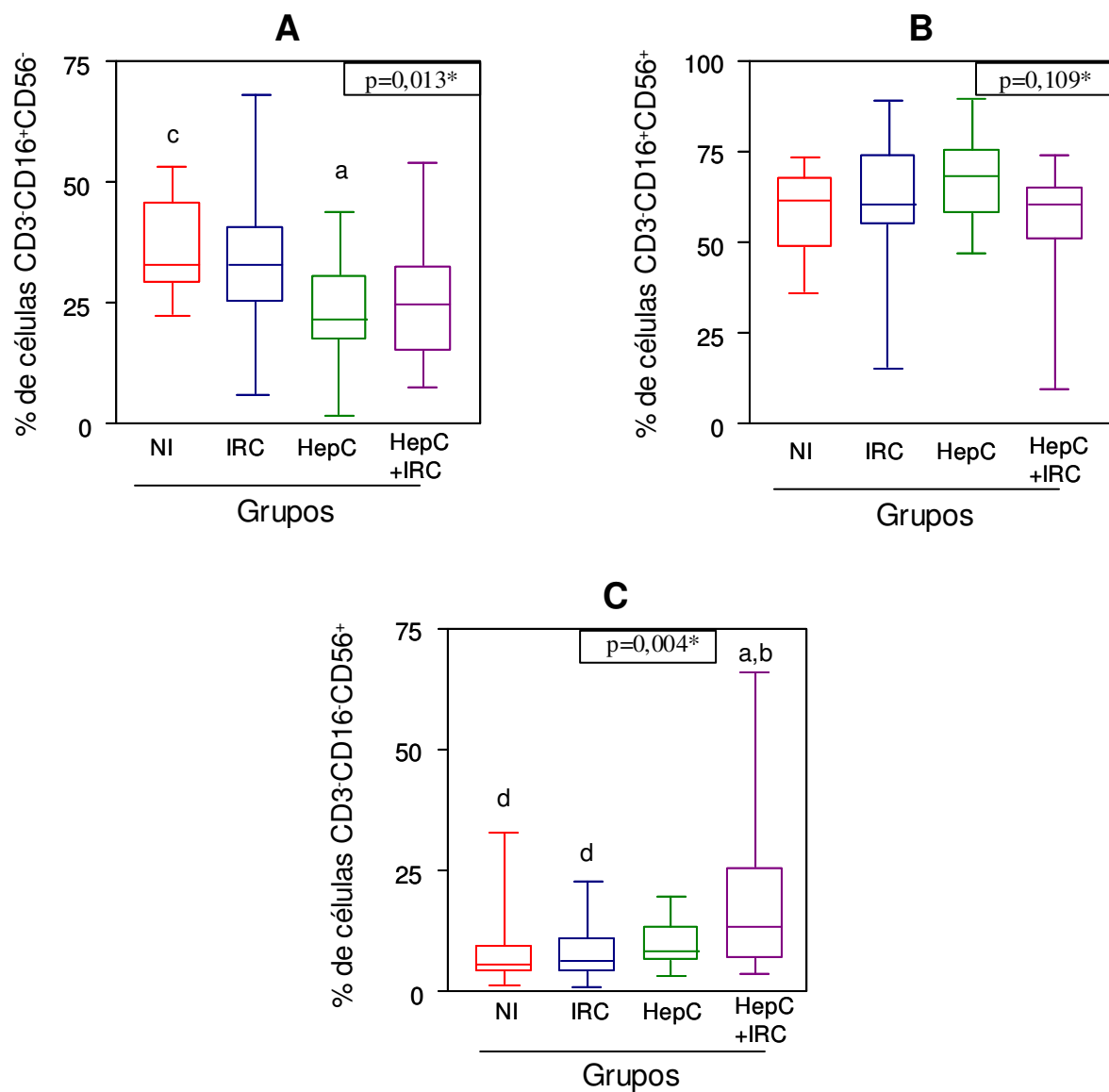


Figura 20 - Análise do percentual de células Pré-NK (A), células NK maduras (B) e Células NK ativadas (C) no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HEP C; d- em relação a HepC+IRC; NK = *Natural Killer*; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HEP C – $p < 0,05$; NI x HepC+IRC, IRC x HepC+IRC – $p < 0,05$.

O percentual das células NKT totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) circulantes mostrou-se semelhante ($p=0,757$) em todos os grupos (FIG.21), assim como a frequência das células NKT1 ($CD3^+CD56^-CD16^+$) ($p=0,162$) e NKT 3 ($CD3^+CD56^+CD16^+$) ($p=0,287$) (FIG.22A e FIG.22C). O resultado da análise estatística de células NKT2 ($CD3^+CD56^+CD16^-$) revelou uma frequência significativamente maior nos grupos HepC e HepC+IRC em relação a IRC ($p<0,05$) (FIG.22B).

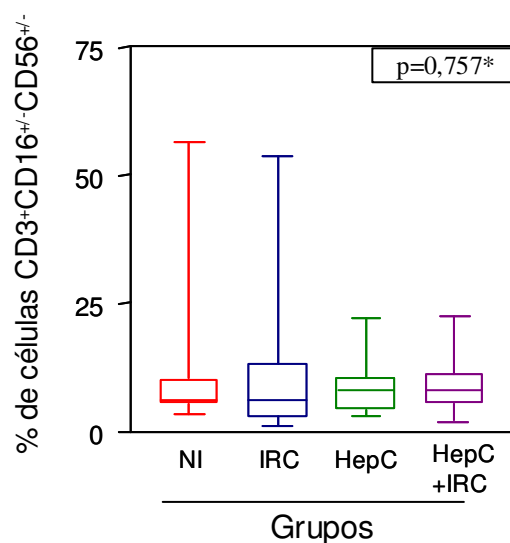


Figura 21 - Análise do percentual de células NKT totais no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; NKT = Células T *Natural Killer*; *Kruskal-Wallis.

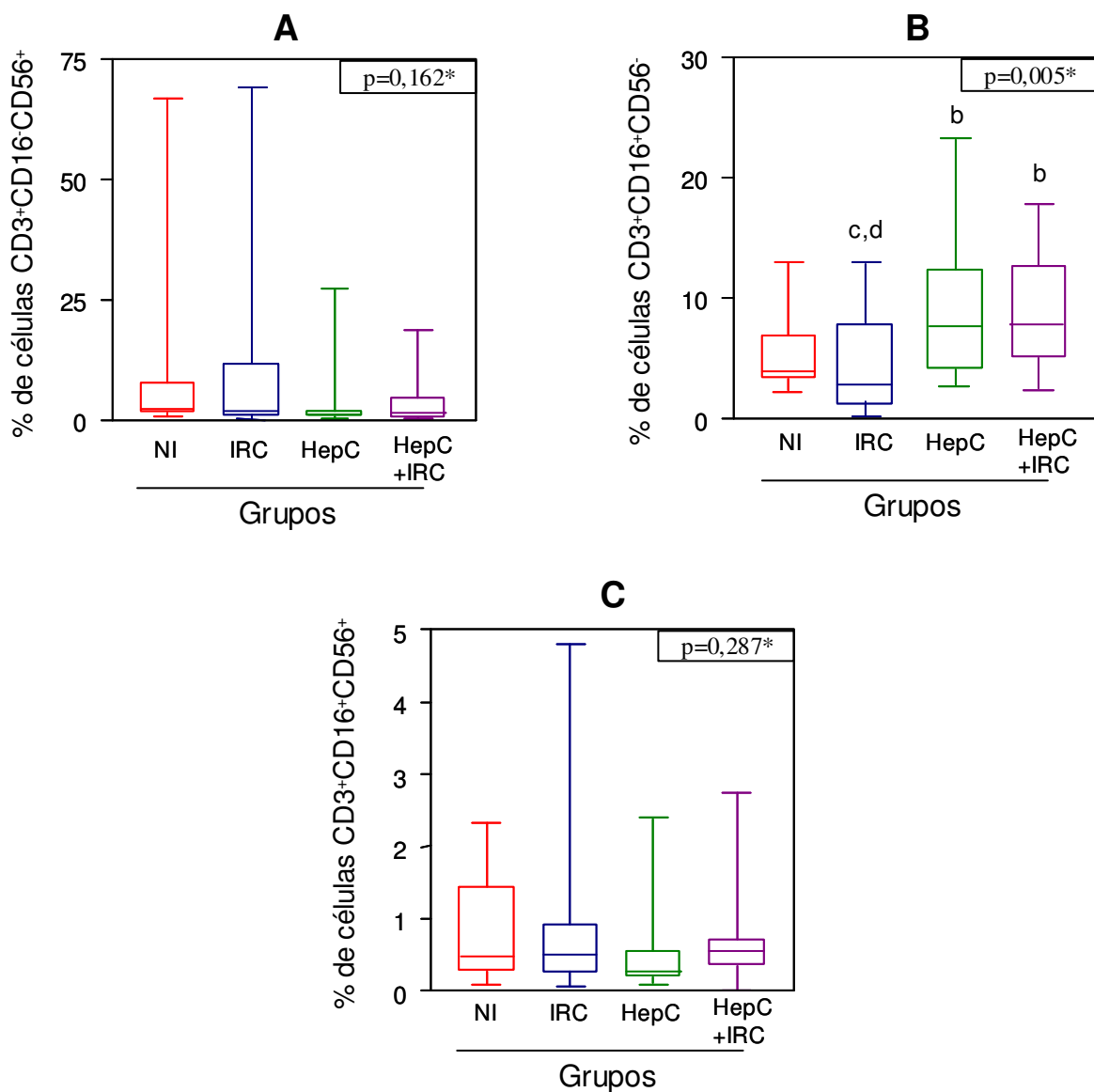


Figura 22 - Análise do percentual de células NKT 1 (A), células NKT 2 (B) e células NKT 3 (C) no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativo: b– em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; NKT = Células T *Natural Killer*; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: IRC x HepC, IRC x HepC+IRC – p<0,05.

Com referência à análise da razão de subpopulações de células NK $CD3^-CD16^-$ e células NK $CD3^-CD16^+$ em relação à população de células $CD56^+$, observou-se diferença estatisticamente significativa na análise das células NK $CD3^-CD16^-CD56^{DIM}$ (FIG.23A), com aumento da frequência no grupo HepC em relação a IRC ($p<0,01$) e, analogamente, no grupo HepC+IRC em relação aos grupos NI ($p<0,05$) e IRC ($p<0,001$). Não foi encontrada diferença na razão das células NK $CD3^-CD16^-CD56^{BRIGHT}$ entre os grupos ($p=0,116$), como também, das células NK $CD3^-CD16^+CD56^{DIM}$ ($p=0,196$) (FIG.23B e FIG.23C). Foi demonstrada diferença estatisticamente significativa na análise das células NK $CD3^-CD16^+CD56^{BRIGHT}$ (FIG.23D), com uma menor frequência no grupo HepC comparado ao grupo NI ($p<0,001$) e, de forma similar, no grupo HepC+IRC em relação a NI ($p<0,001$) e a IRC ($p<0,05$).

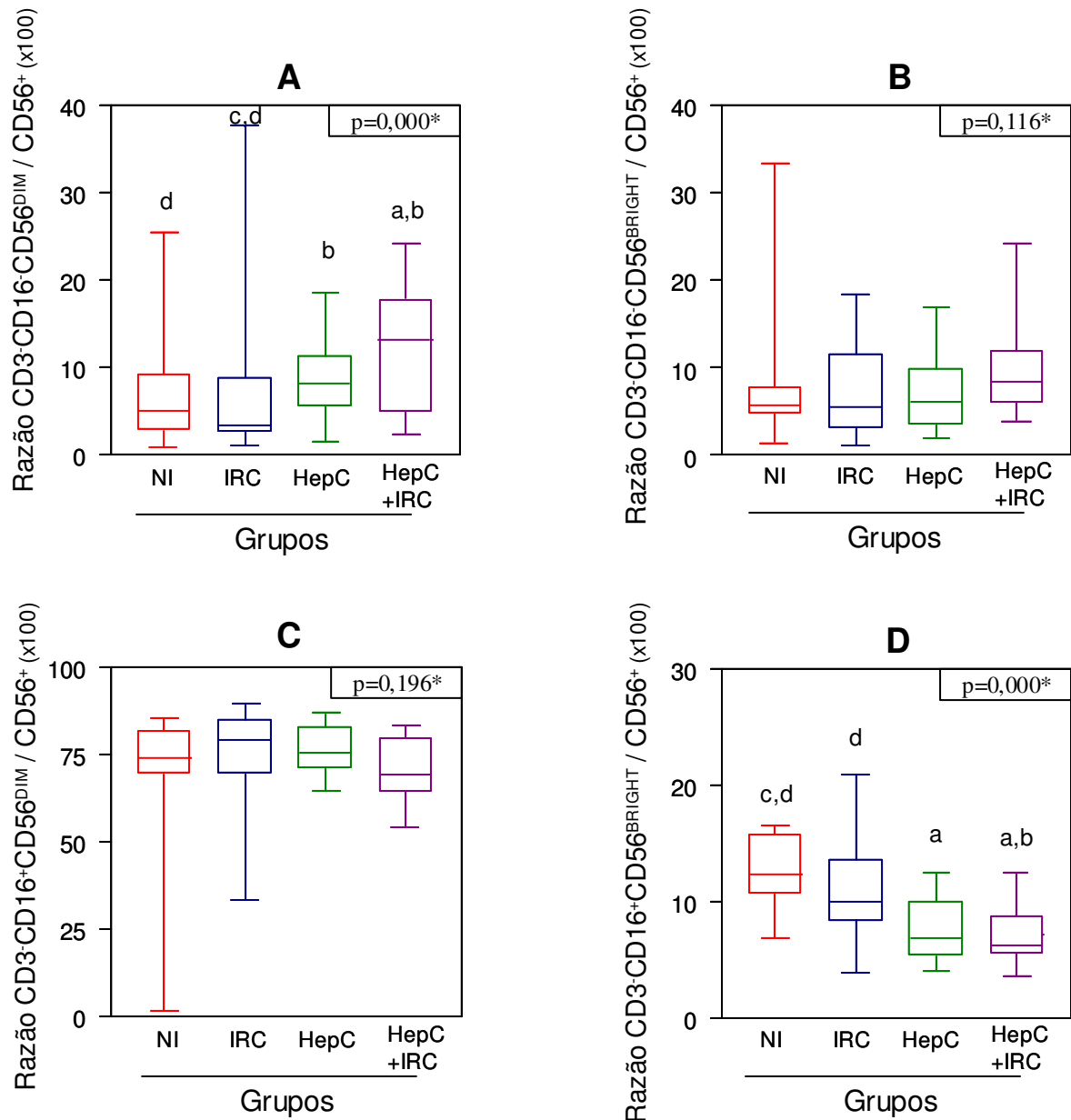


Figura 23 - Análise da razão entre as células NK $CD3-CD16-CD56^{DIM}$ (A), células NK $CD3-CD16-CD56^{BRIGHT}$ (B), células NK $CD3-CD16+CD56^{DIM}$ (C), células NK $CD3-CD16+CD56^{BRIGHT}$ (D) e células $CD56^{+}$ totais no sangue periférico em cada grupo:

□ HepC = hepatite C crônica; □ HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; NK = *Natural Killer*; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HEP C; d- em relação a HepC+IRC *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC+IRC - $p<0,05$, IRC x HepC - $p<0,01$; IRC x HepC+IRC - $p<0,001$ (Células NK[#] $CD3-CD16+CD56^{DIM} / CD56^{+}$); NI x HepC, NI x HepC+IRC - $p<0,001$, IRC x HepC+IRC - $p<0,05$; IRC x HepC+IRC - $p<0,001$ (Células NK[#] $CD3-CD16+CD56^{BRIGHT} / CD56^{+}$).

4.1.1.2. Imunidade adaptativa:

A) Estudo da frequência da população e subpopulações de linfócitos do sangue periférico:

Os resultados relativos à análise estatística da frequência de linfócitos T circulantes ($CD3^+$) não demonstraram diferença significativa entre os grupos ($p=0,942$) (FIG.24A). Entretanto, foi encontrada menor frequência de linfócitos B ($CD19^+$) no grupo IRC em relação a NI ($p<0,01$) e HepC ($p<0,01$) e no grupo HepC+IRC em relação a NI ($p<0,01$) e HepC ($p<0,05$) (FIG.24B). A análise da razão entre linfócitos T ($CD3^+$) e linfócitos B ($CD19^+$) revelou diferença estatisticamente significativa entre o grupo NI e os grupos IRC ($p<0,01$) e HepC+IRC ($p<0,05$), conseqüente ao aumento desta razão nestes grupos (FIG.25).

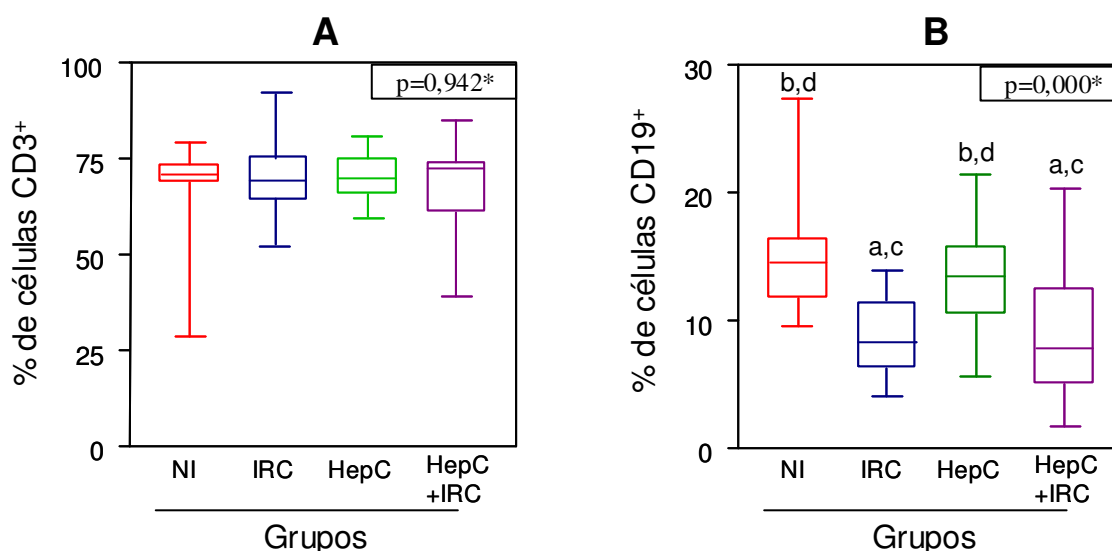


Figura 24 - Análise do percentual de linfócitos T (A) e linfócitos B (B) circulantes em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; *Kruskal-Wallis. Estatisticamente significativo: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC, NI x HepC+IRC, IRC x HepC – $p<0,01$; HepC x HepC+IRC – $p<0,05$.

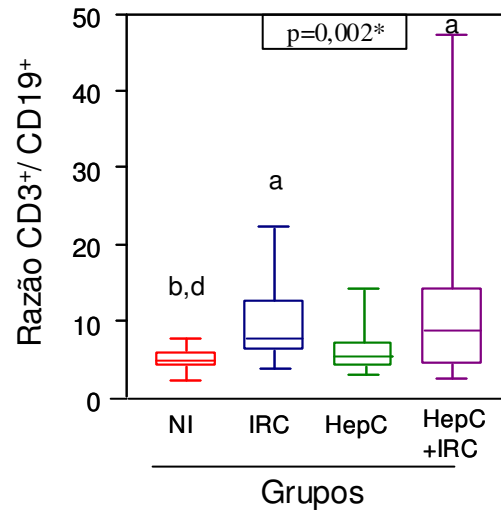


Figura 25 - Análise da razão entre linfócitos T e linfócitos B circulantes em cada grupo:
 ■ NI = controle-doadores de sangue; ■ IRC = controle-insuficiência renal crônica;
 ■ HepC = hepatite C crônica; ■ HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; d- em relação a HepC+IRC *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC – $p < 0,01$; NI x HepC+IRC – $p < 0,05$.

B) Estudo da frequência das subpopulações de linfócitos T:

Não foi observada diferença estatisticamente significativa no percentual de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) ($p=0,496$), percentual de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) ($p=0,183$) (FIG.26A e FIG.26B), como também na razão entre linfócitos T auxiliares e citotóxicos (razão $CD4^+/CD8^+$) ($p=0,588$) do sangue periférico entre os grupos estudados (FIG.27).

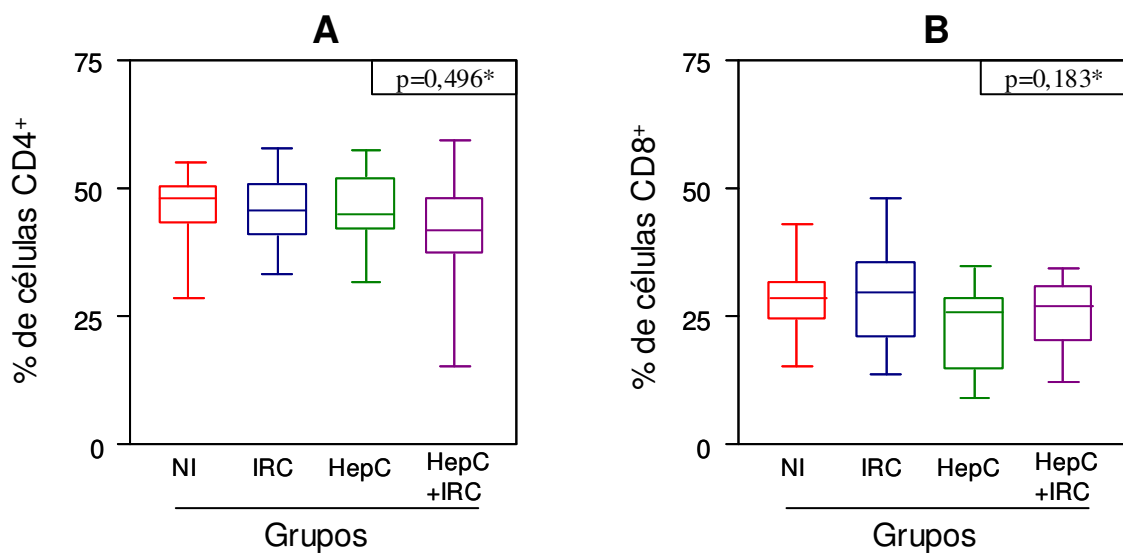


Figura 26 - Análise do percentual de linfócitos T auxiliares (A) e de linfócitos T citotóxicos (B) no sangue periférico em cada grupo:
 NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica;
 HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; *Kruskal-Wallis.

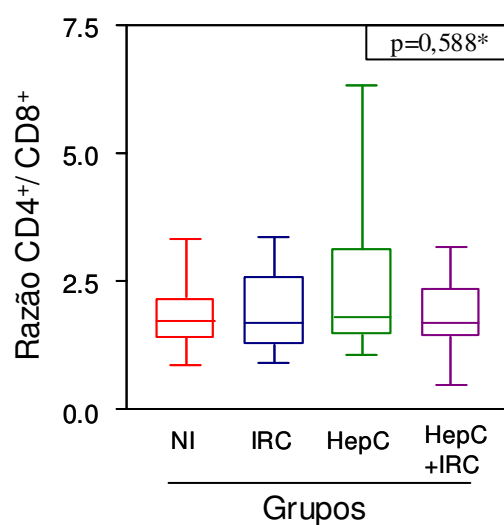


Figura 27 - Análise da razão entre linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos do sangue periférico por grupo:
 NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica;
 HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; *Kruskal-Wallis.

C) Estudo da frequência das subpopulações de linfócitos B:

A análise estatística demonstrou diferença significativa, revelando maior percentual de linfócitos B convencionais ($CD19^+CD5^-$) na população de linfócitos B totais do sangue periférico ($CD19^+$) no grupo IRC comparado a NI e a HepC ($p<0,01$), assim como no grupo HepC+IRC comparado a NI e a HepC ($p<0,05$) (FIG.28A). Paralelamente, percentual significativamente menor de linfócitos B1 ($CD19^+CD5^+$) na população de linfócitos B totais do sangue periférico foi encontrado no grupo IRC em relação a NI e a HepC ($p<0,01$) e no grupo HepC+IRC comparado a NI e a HepC ($p<0,05$) (FIG.28B).

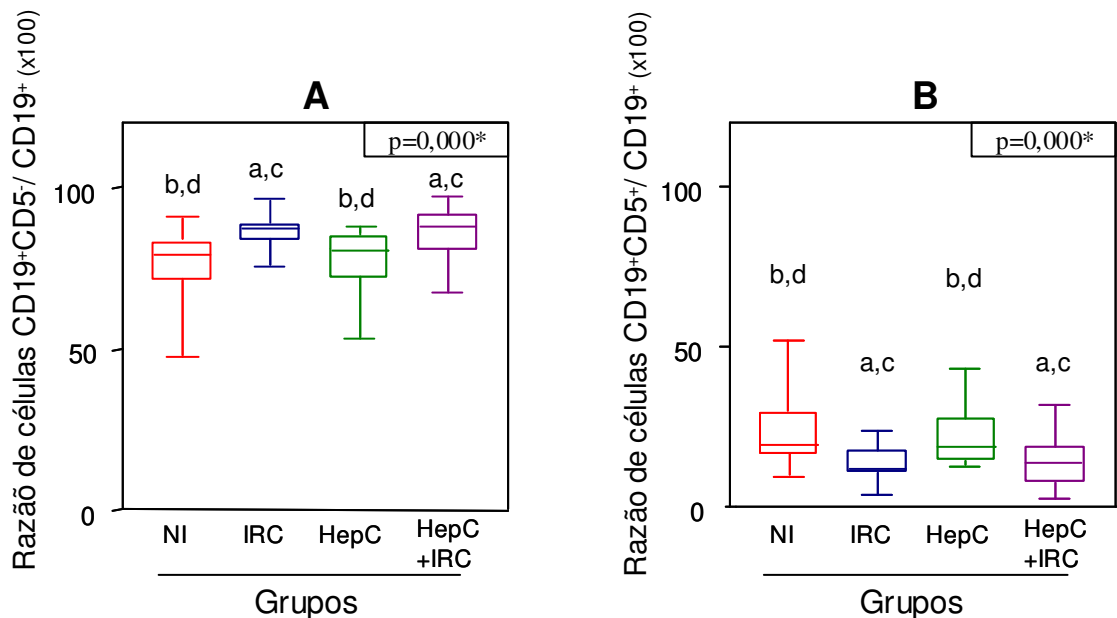


Figura 28 - Análise do percentual entre linfócitos B convencionais (A) e linfócitos B1 (B) circulantes e linfócitos B totais no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC, HepC x IRC – $p<0,01$, NI x HepC+IRC, HepC x HepC+IRC – $p<0,05$.

4.1.2. Estudo da expressão de marcadores de ativação celular nas populações e subpopulações celulares do sangue periférico em cada grupo:

4.1.2.1. Imunidade inata:

A) Expressão de CD23 em neutrófilos, eosinófilos e monócitos:

Os quatro grupos estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à análise da expressão da molécula CD23 em neutrófilos ($p=0,303$), eosinófilos ($p=0,938$) e monócitos ($p=0,433$) do sangue periférico.

B) Expressão de HLA-DR em neutrófilos e eosinófilos:

Observou-se que os grupos HepC e HepC+IRC apresentaram maior percentual de expressão do marcador HLA-DR em neutrófilos circulantes em relação a NI ($p<0,05$) (FIG.29). Não foi encontrada diferença na expressão de HLA-DR em eosinófilos circulantes ($p=0,144$).

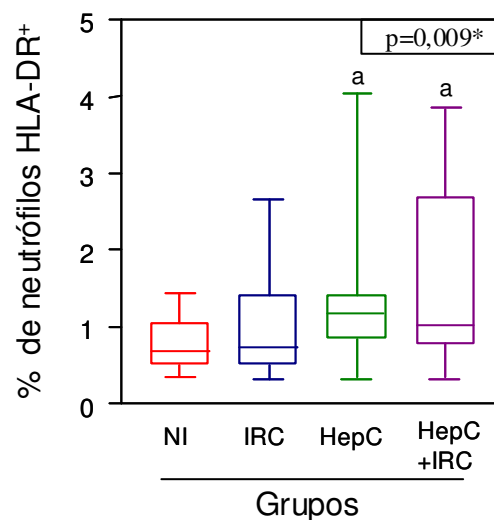


Figura 29 - Análise do percentual de neutrófilos HLA-DR⁺ no sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC e NI x HepC+IRC – $p<0,05$.

4.1.2.2. Imunidade adaptativa:

A) Expressão de HLA-DR em linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos:

O resultado da análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos T auxiliares (células $CD4^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T auxiliares totais ($CD4^+$) do sangue periférico mostrou percentual significativamente maior de células $CD4^+HLA-DR^+$ em ambos os grupos HepC e HepC+IRC em relação a NI ($p<0,001$) (FIG.30A). Com relação à análise da expressão da molécula HLA-DR em linfócitos T citotóxicos (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos totais ($CD8^+$) do sangue periférico, foi encontrado resultado semelhante ($p<0,05$) (FIG.30B).

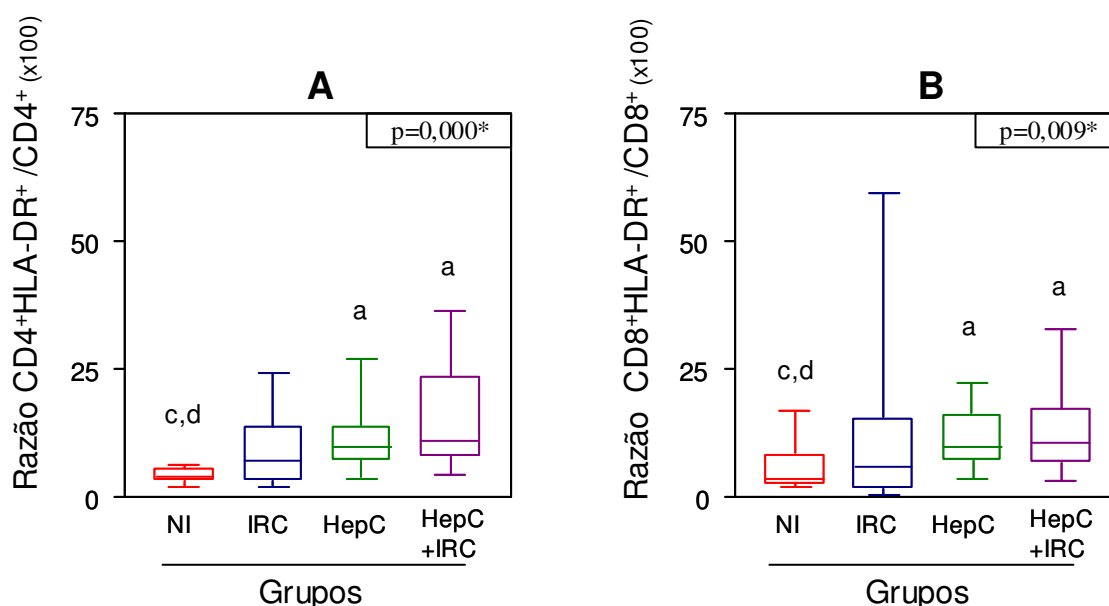


Figura 30 - Análise do percentual de células T auxiliares ativadas na população de linfócitos T auxiliares (A) e do percentual de células T citotóxicas ativadas na população de linfócitos T citotóxicos (B) circulantes por grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC, NI x HepC+IRC – $p<0,001$ ($\%CD4^+HLA-DR^+ / CD4^+$) e $p<0,05$ ($\%CD8^+HLA-DR^+ / CD8^+$).

B) Expressão de HLA-DR em linfócitos B:

O estudo da expressão da molécula HLA-DR em Linfócitos B (FIG.31) circulantes não revelou diferença significativa na análise da intensidade média de fluorescência entre os quatros grupos ($p=0,109$).

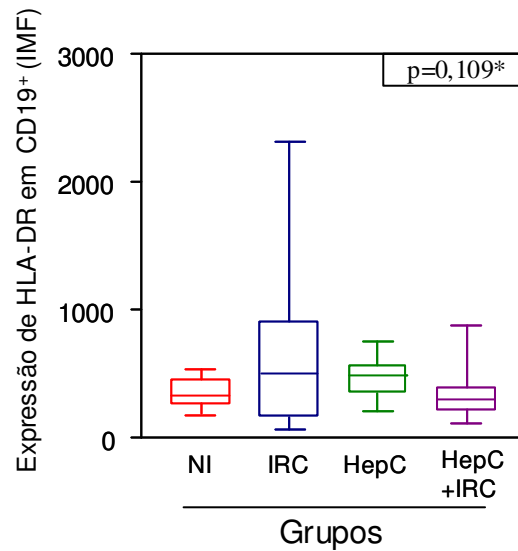


Figura 31 - Análise da expressão de HLA-DR em linfócitos B do sangue periférico: ■ NI = controle-doadores de sangue; ■ IRC = controle-insuficiência renal crônica; ■ HepC = hepatite C crônica; ■ HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; IMF = intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis.

C) Expressão de CD23 em linfócitos B:

A análise da expressão da molécula CD23 em linfócitos B (CD19⁺) demonstrou redução significativa no percentual de linfócitos B ativados (Células CD19⁺CD23⁺) do sangue periférico nos grupos IRC e HepC+IRC em relação a NI ($p<0,05$) (FIG.32).

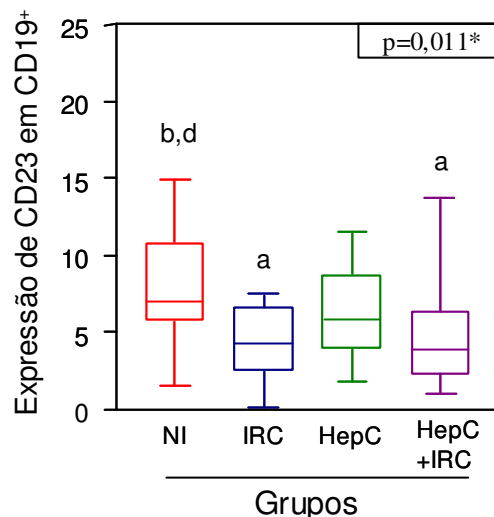


Figura 32 - Análise da expressão da molécula CD23 em linfócitos B (linfócitos B ativados) do sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a– em relação a NI; b– em relação a IRC; d– em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC, NI x HepC+IRC – $p < 0,05$.

4.1.3. Estudo da regulação da resposta imune nos leucócitos do sangue periférico:

4.1.3.1. Análise de receptores de imunoglobulina em células da Imunidade inata:

A) Expressão de CD64 (FcγRI) em monócitos, neutrófilos e eosinófilos:

O resultado da análise estatística da expressão do receptor de imunoglobulina CD64 (FcγRI) não mostrou diferença significativa entre os grupos em relação aos monócitos ($p=0,110$) e neutrófilos ($p=0,144$) do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa na expressão do receptor FcγRI em eosinófilos (FIG. 33), demonstrada por menor percentual de eosinófilos CD64⁺ no grupo IRC em relação a HepC+IRC ($p < 0,05$).

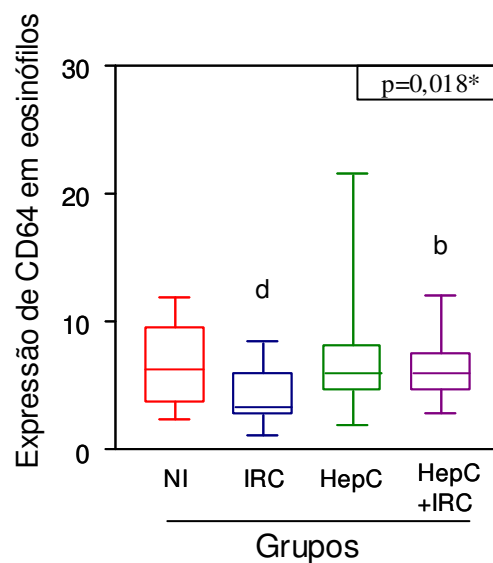


Figura 33 - Análise da expressão da molécula CD64 (FcγRI) em eosinófilos circulantes por grupos:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: b- em relação a IRC; d- em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: IRC x HepC+IRC – $p < 0,05$.

B) Expressão de CD32 (FcγRII) em monócitos, neutrófilos e eosinófilos:

A análise dos dados referentes à expressão do receptor de imunoglobulina CD32 (FcγRII) não mostrou diferença significativa entre os grupos em relação aos neutrófilos ($p=0,068$) e eosinófilos ($p=0,277$) do sangue periférico. Houve diferença estatisticamente significativa na expressão do receptor FcγRII em monócitos (FIG.34), demonstrada por redução na intensidade média de fluorescência da molécula CD32 no grupo IRC em relação a HepC ($p < 0,001$).

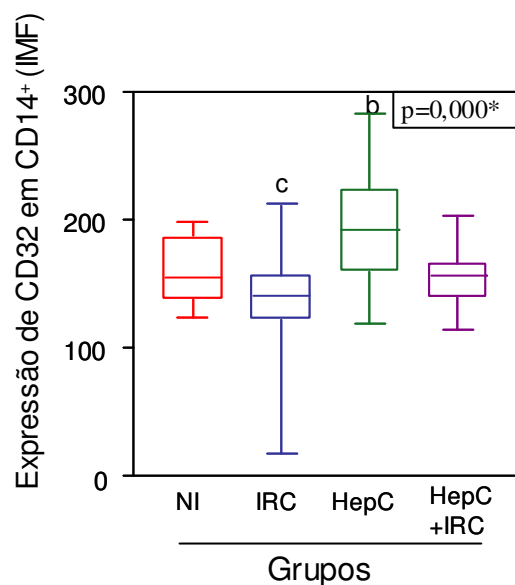


Figura 34 - Análise da expressão da molécula CD32 (FcγRII) em monócitos do sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativo: b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: IRC x HepC+IRC – $p<0,001$.

C) Expressão de CD16 (FcγRIII) em monócitos e neutrófilos;

O resultado relativo à análise da expressão do receptor de imunoglobulina CD16 (FcγRIII) mostrou diferença significativa entre os grupos em relação à expressão em neutrófilos do sangue periférico (FIG.35). Houve redução estatisticamente significativa na expressão do receptor FcγRIII, demonstrada por diminuição na intensidade média de fluorescência de CD16 em neutrófilos nos grupo HepC e HepC+IRC em relação a NI ($p<0,01$), como também em relação a IRC ($p<0,001$). Em relação à expressão da molécula CD16 em monócitos, os resultados foram anteriormente descritos.

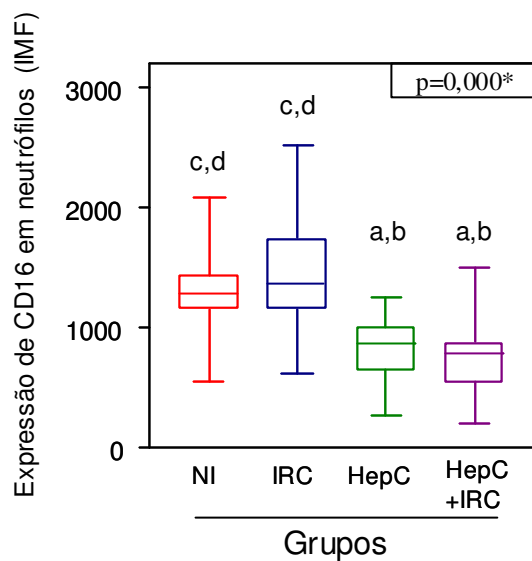


Figura 35 - Análise da expressão da molécula CD16 (Fc γ RIII) em neutrófilos circulantes em cada grupo:
 NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC, NI x HepC+IRC – $p<0,01$; IRC x HepC, IRC x HepC+IRC – $p<0,001$.

4.1.3.2. Análise da frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}):

Em relação à análise do percentual de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) no sangue periférico, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,662$) (FIG. 36).

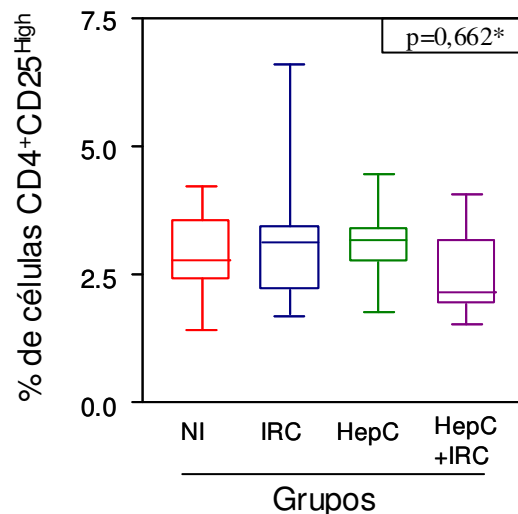


Figura 36 - Análise do percentual de células T Reguladoras (Células CD4⁺CD25^{HIGH}) no sangue periférico em cada grupo:
 NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica;
 HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica. *Kruskal-Wallis.

4.1.3.3. Análise da expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B:

O resultado da análise da expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B (Células CD19⁺) do sangue periférico não revelou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos estudados (p=0,754) (FIG.37).

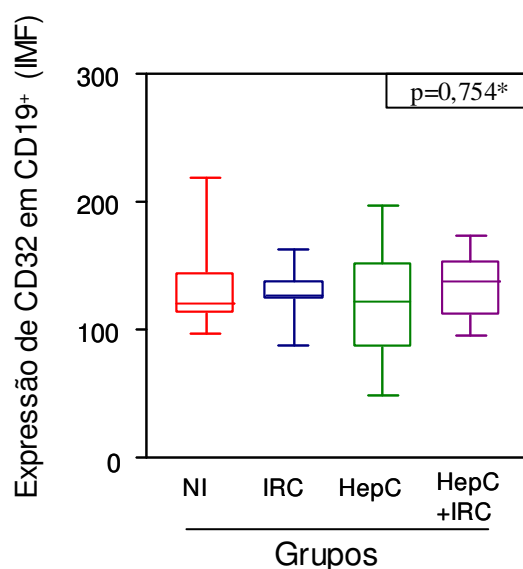


Figura 37 - Análise da expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B circulantes por grupo:
 NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica;
 HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica. *Kruskal-Wallis.

4.1.4. Análise da expressão de receptores de quimiocinas em cada grupo:

4.1.4.1. Imunidade inata:

A) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 0 (CCR2, CXCR4) em monócitos:

A intensidade média de fluorescência do receptor de quimiocinas CCR2 em monócitos mostrou-se semelhante entre os quatro grupos ($p=0,812$). No entanto, a intensidade média de fluorescência de CXCR4 em monócitos do sangue periférico foi significativamente menor nos grupos IRC ($p<0,01$) e HepC+IRC ($p<0,05$) em relação a NI (FIG.38).

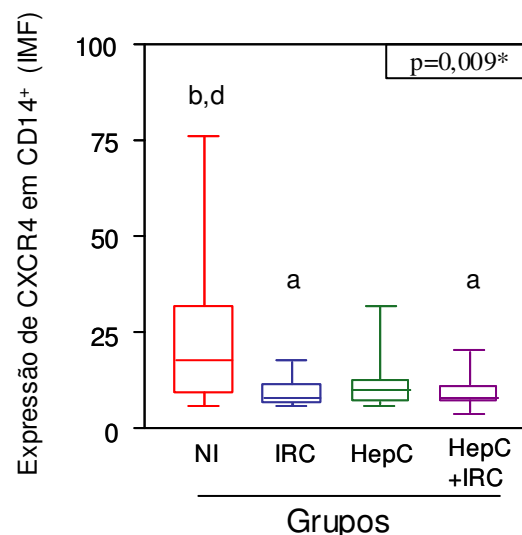


Figura 38 - Análise da expressão de CXCR4 em monócitos do sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativo: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; d- em relação a HepC+IRC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC – $p<0,01$; NI x HepC+IRC – $p<0,05$.

B) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 1 (CXCR3, CCR5) em monócitos:

O resultado da análise estatística da expressão dos receptores de quimiocinas CXCR3 e CCR5 em monócitos circulantes não evidenciou diferença significativa entre os grupos ($p=0,083$ e $p=0,259$, respectivamente).

C) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 2 (CCR3) em monócitos:

Com referência à expressão do receptor de quimiocina CCR3 em monócitos, observou-se uma intensidade média de fluorescência significativamente menor nos grupos IRC ($p<0,05$) e HepC ($p<0,05$) em relação a NI (FIG.39).

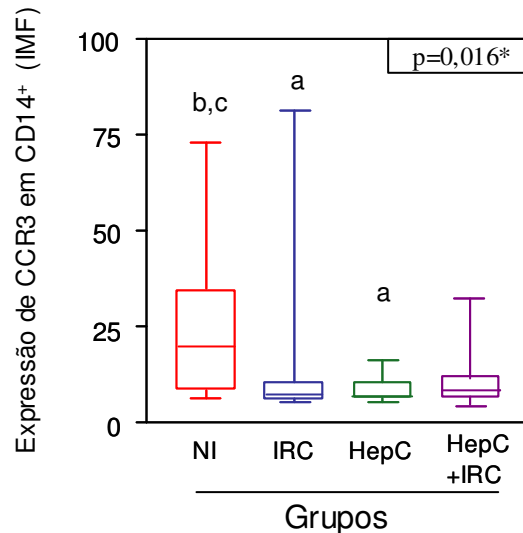


Figura 39 - Análise da expressão de CCR3 em monócitos do sangue periférico em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativo: a– em relação a NI; b– em relação a IRC; c- em relação a HepC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x IRC e NI x HepC – $p<0,05$.

4.1.4.2. Imunidade Adaptativa:

A) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 0 (CCR2, CXCR4) em linfócitos T:

A análise estatística não encontrou diferença significativa entre os grupos em relação à expressão da molécula CCR2 em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), respectivamente, $p=0,073$ e $p=0,057$. O resultado da análise dos dados referentes à expressão dos receptores de quimiocinas do tipo CXCR4 em linfócitos T evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com uma menor intensidade média de fluorescência em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) no grupo HepC+IRC em relação a NI ($p<0,01$), como também diminuição da intensidade média de fluorescência em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) no grupo HepC+IRC em relação a NI e a IRC ($p<0,001$) (FIG.40).

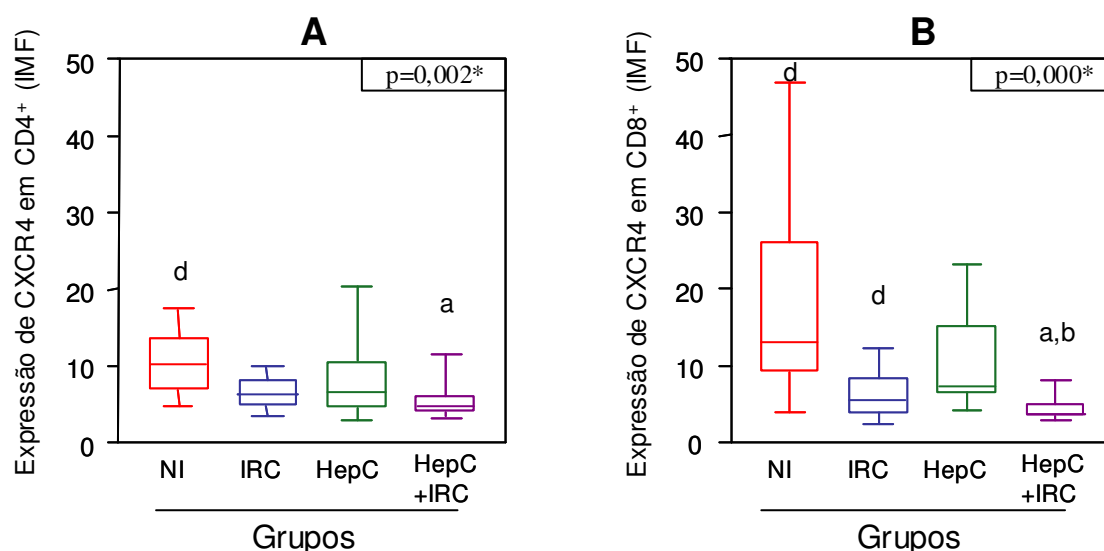


Figura 40 - Análise da expressão de CXCR4 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; d- em relação a HepC+IRC; IMF= intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: NI x HepC+IRC em CD4⁺ - $p<0,05$; NI x HepC+IRC e IRC x HepC+IRC em CD8⁺ - $p<0,001$.

B) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 1 (CXCR3, CCR5) em linfócitos T:

O resultado da análise da expressão de receptores de quimiocinas do tipo CXCR3 em linfócitos T demonstrou diferença significativa. Em relação aos linfócitos T auxiliares ($CD4^+$), encontrou-se maior percentual de células $CD4^+CXCR3^+$ no grupo HepC comparado a NI ($p<0,01$) e a IRC ($p<0,05$). Em relação aos linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), observou-se menor percentual de células $CD8^+CXCR3^+$ nos grupos HepC ($p<0,01$) e HepC+IRC ($p<0,05$) comparados a NI (FIG.41). Com referência à expressão de CCR5 em linfócitos T (FIG.42), foi demonstrado aumento na intensidade média de fluorescência em linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) no grupo IRC em relação a HepC+IRC ($p<0,05$) e, considerando os linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), houve, também, aumento na intensidade média de fluorescência no grupo IRC em relação a NI ($p<0,01$) e em relação a HepC e HepC+IRC ($p<0,001$).

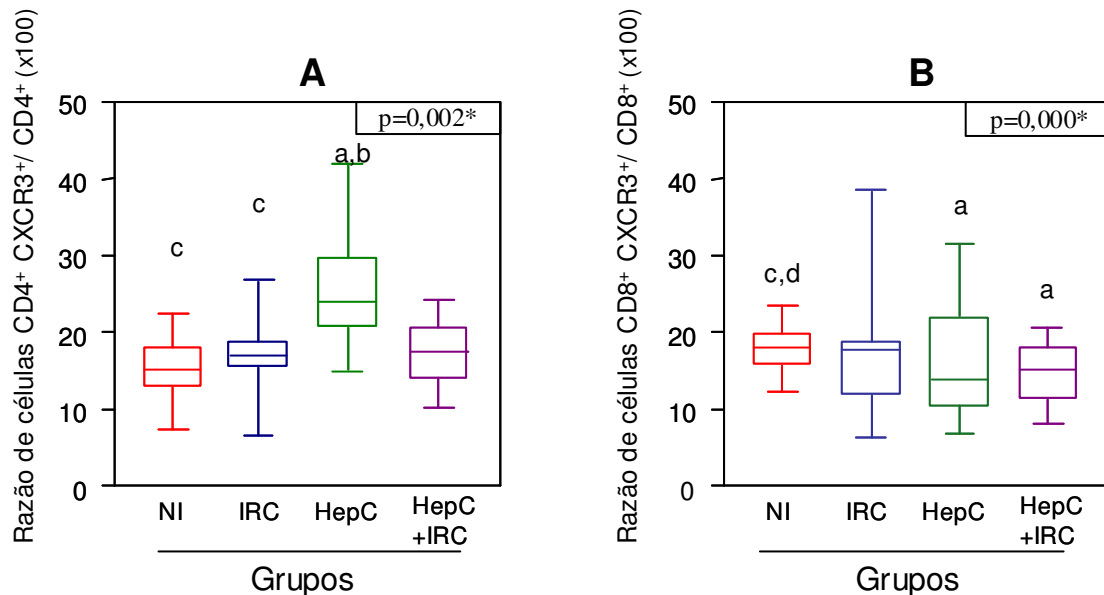


Figura 41 - Análise da expressão de CXCR3 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: HepC x NI- $p<0,01$ e HepC x IRC - $p<0,05$ em $CD4^+$; NI x HepC - $p<0,01$ e NI x HepC+IRC - $p<0,05$ em $CD8^+$.

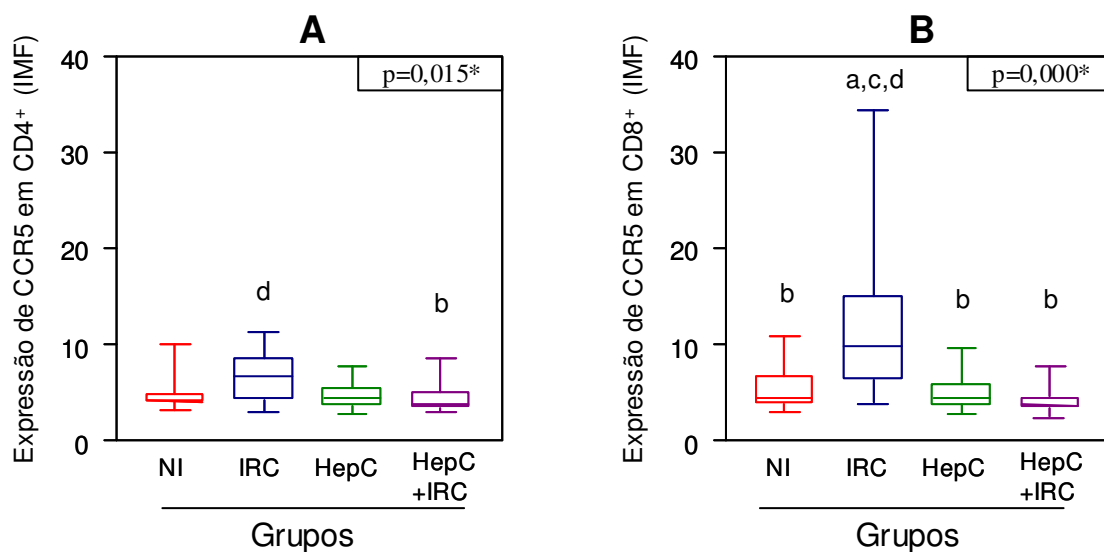


Figura 42 - Análise da expressão de CCR5 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significativa: a- em relação a NI; b- em relação a IRC; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: IRC x IRC+HepC - $p<0,05$ em CD4⁺; IRC x NI - $p<0,01$ e IRC x HepC, IRC x HepC+IRC - $p<0,001$ em CD8⁺.

C) Expressão de receptores de quimiocinas do Tipo 2 (CCR3) em linfócitos T:

O resultado da análise da expressão de receptores de quimiocinas do tipo CCR3 em linfócitos T demonstrou diferença significativa entre os grupos. Em relação aos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), encontrou-se redução na intensidade média de fluorescência de CCR3⁺ no grupo HepC comparado a NI ($p<0,05$). Com referência aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), observou-se redução na intensidade média de fluorescência de CCR3⁺ no grupo HepC+IRC comparados a NI ($p<0,05$) (FIG.43).

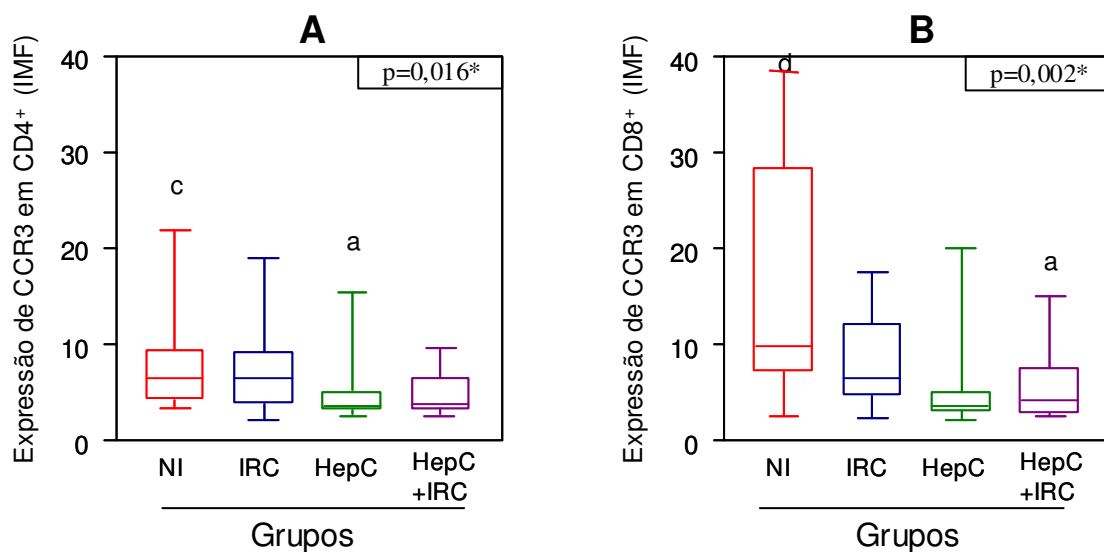


Figura 43 - Análise da expressão de CCR3 em linfócitos T auxiliares (A) e em linfócitos T citotóxicos (B) em cada grupo:

NI = controle-doadores de sangue; IRC = controle-insuficiência renal crônica; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica; Estatisticamente significante: a- em relação a NI; c- em relação a HepC; d- em relação a HepC+IRC; IMF=intensidade média de fluorescência; *Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns: HepC x NI- $p < 0,05$ em CD4⁺; HepC+IRC x NI – $p < 0,05$ em CD8⁺.

4.1.5. Correlações entre as variáveis em estudo (demográficas, laboratoriais, imunofenotipagem):

Os gráficos, a seguir, descrevem as correlações realizadas entre as principais variáveis em estudo. Para limitar a extensão da exposição, foram inseridos, de uma forma geral, apenas os gráficos referentes às correlações estatisticamente significantes. Quando pertinente, no texto foram descritas as correlações que não atingiram significância estatística. Foi empregada a correlação de Spearmann (não paramétrica), haja vista que as variáveis não apresentam distribuição normal.

Em determinadas situações, quando as análises de correlação dos grupos HepC e/ou HepC+IRC, individualmente, não atingiram significância estatística e ao se refletir sobre os resultados houve a suposição de um possível erro β , foram realizadas as correlações com a associação entre os grupos, visto que ambos são constituídos de pacientes com Hepatite C crônica.

4.1.5.1. Correlação entre ALT e Grau de Atividade Histológica:

Foi encontrada correlação positiva estatisticamente significativa entre ALT e grau de atividade histológica (Metavir) no grupo HepC ($R=0,819$; IC=0,582 a 0,928 – $p<0,000$) (FIG. 44), não sendo encontrada correlação significativa em relação ao grupo HepC+IRC ($R=0,491$; IC= - 0,133 a 0,837 – $p>0,05$). Não houve correlação significativa entre ALT e estágio de fibrose, em ambos os grupos ($p>0,05$).

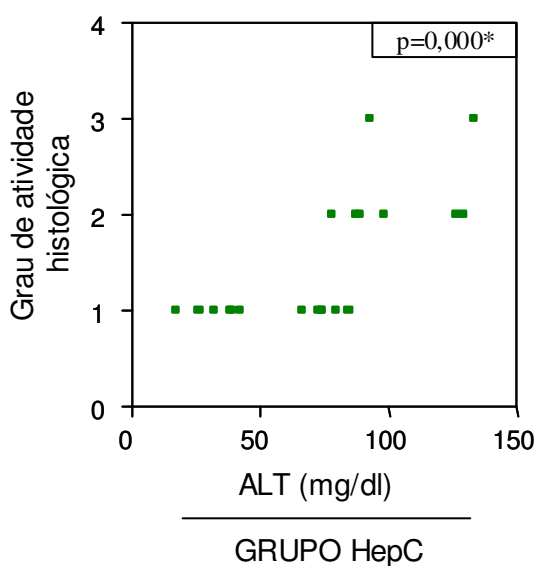


Figura 44 - Correlação entre ALT e Atividade Histológica no grupo HepC:

*Correlação de Spearman - $R=0,819$; IC=0,582-0,928; ALT=alanino aminotransferase; Grau de atividade histológica – METAVIR (0-3). HepC = hepatite C crônica.

4.1.5.2. Correlação entre variáveis em estudo (demográficas, laboratoriais) e parâmetros fenotípicos de células da imunidade inata:

Em relação à análise das correlações entre o percentual de monócitos (CD14⁺) do sangue periférico e as variáveis tempo provável de infecção (epidemiológico), ALT, grau de atividade histológica e estágio de fibrose, não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa em ambos os grupos HepC e HepC+IRC ($p>0,05$). A análise individual desses grupos não encontrou significância estatística em relação à carga viral ($p>0,05$), embora houvesse correlação inversa fraca em HepC ($R=-0,221$) (FIG.45B). Quando associados, foi demonstrada correlação inversa significativa ($R= -0,500$; IC= $-0,753$ a $-0,119$ – $p=0,011$) entre o percentual de monócitos (CD14⁺) do sangue periférico e carga viral (HCV-RNA quantitativo por P-CR) (FIG.45A).

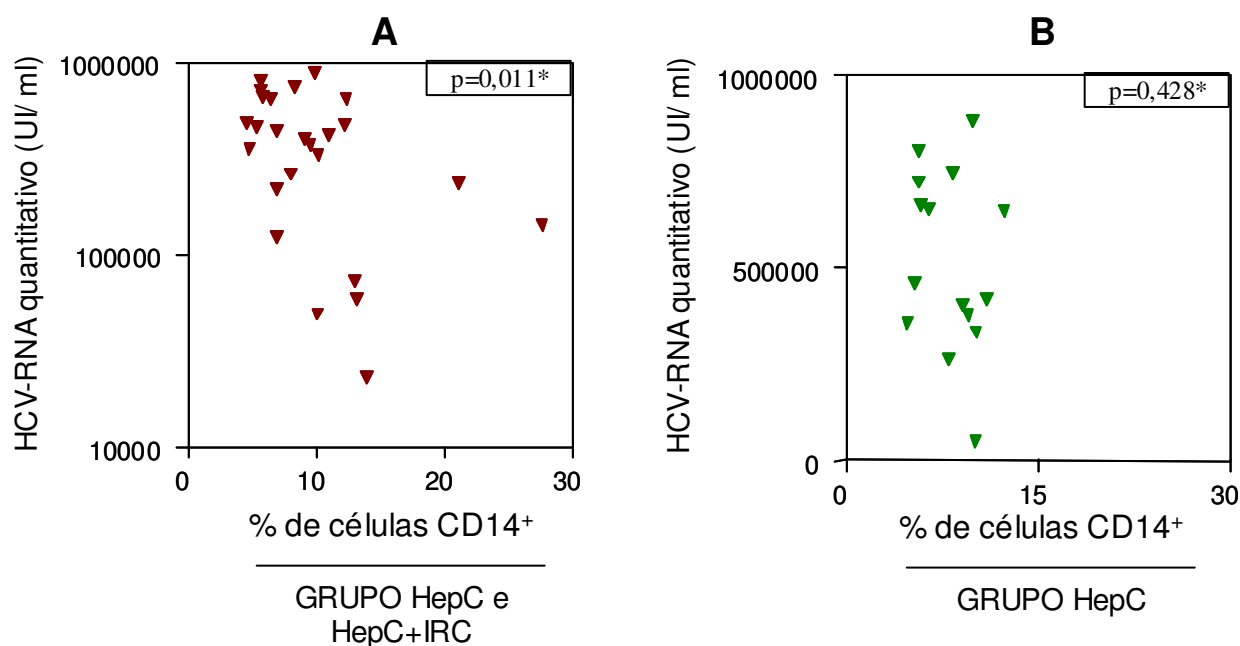


Figura 45 - Correlação entre o percentual de monócitos no sangue periférico e carga viral nos grupos HepC e HepC+IRC associados (A) e no grupo HepC (B):

* Correlação de Spearman – Grupos HepC e HepC+IRC associados: $R=-0,500$; IC= $-0,753$ a $-0,119$; Grupo HepC $R= -0,221$; HCV-RNA quantitativo por Reação em Cadeia da Polimerase; HepC = hepatite c crônica e HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

Com referência às células NK totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) não se observou correlação estatisticamente significativa com as variáveis demográficas, laboratoriais e histológicas em estudo ($p>0,05$).

Foi encontrada correlação inversa estatisticamente significativa entre as células NKT totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) e o tempo provável de infecção (epidemiológico) no grupo HepC+IRC ($R = -0,637$; IC= -0,865 a -0,192 – $p=0,008$) (FIG.46). As demais correlações não obtiveram significância estatística.

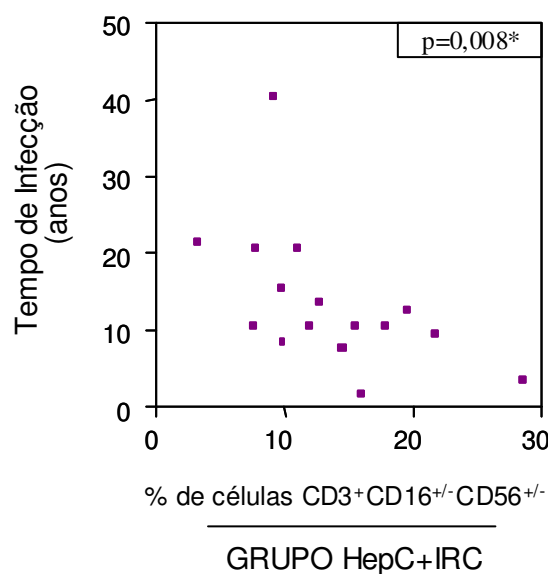


Figura 46 - Correlação entre células o percentual de células NKT totais no sangue periférico e o tempo provável de infecção (epidemiológico) no grupo HepC+IRC:

* Correlação de Spearman - $R = -0,637$; IC= -0,865 a -0,192; NKT= Células T *Natural Killer*; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

4.1.5.3. Correlação entre variáveis em estudo (demográficas e laboratoriais) e parâmetros fenotípicos de células da imunidade adaptativa:

O resultado da análise da correlação entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T auxiliares periféricos e ALT demonstrou correlação inversa significativa no grupo HepC+IRC ($R = -0,637$; IC= -0,865 a -0,192 – $p=0,008$) (FIG. 47). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa em relação ao grupo HepC.

Não se encontrou correlação estatisticamente significativa entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T auxiliares periféricos e tempo provável de infecção (epidemiológico), grau de atividade histológica, estágio de fibrose ou carga viral em ambos os grupos HepC e HepC+IRC ($p>0,05$).

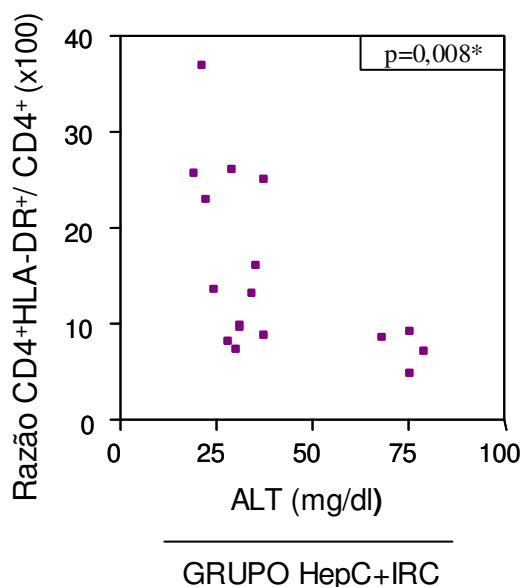


Figura 47 - Correlação entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados na população de linfócitos T auxiliares periféricos e ALT no grupo HepC+IRC:

* Correlação de Spearman - $R = -0,637$; IC = $-0,865$ a $-0,192$; ALT = alanino aminotransferase; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

Com referência ao estudo da correlação entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e ALT encontrou-se, também, correlação inversa significativa no grupo HepC+IRC ($R = -0,508$; IC = $-0,807$ a $-0,001$ – $p = 0,04$) (FIG.48). Não foi observada correlação estatisticamente significativa em relação ao grupo HepC.

Foi demonstrada correlação inversa estatisticamente significativa entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e carga viral (HCV-RNA quantitativo por PCR) no grupo HepC ($R = -0,604$; IC = $-0,857$ a $-0,116$ – $p = 0,017$) (FIG.49). Em relação ao grupo HepC+IRC não foi observada esta correlação, sendo o valor de $R = -0,369$ ($p > 0,05$). Não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos ($CD8^+$) e tempo provável de infec-

ção (epidemiológico), grau de atividade histológica ou estágio de fibrose em ambos os grupos HepC e HepC+IRC ($p>0,05$).

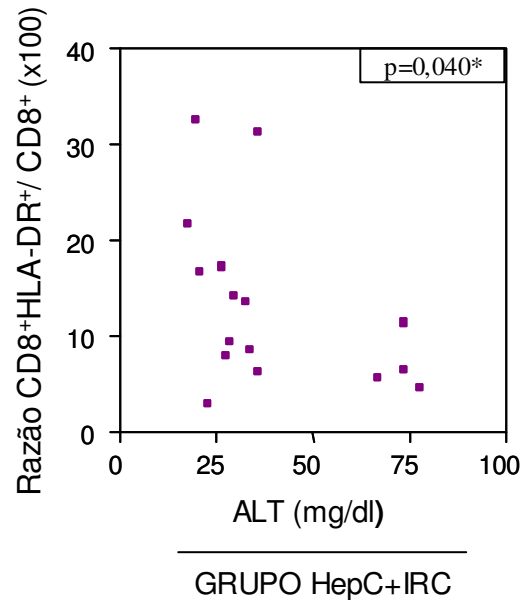


Figura 48 - Correlação entre linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos citotóxicos periféricos e ALT no grupo HepC+IRC:

* Correlação de Spearman - $R = -0,508$; IC= -0,807 a -0,001. ALT=alanino aminotransferase; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

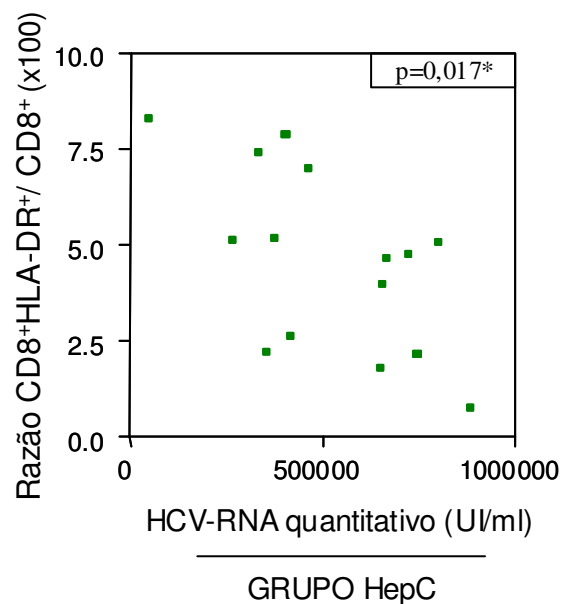


Figura 49 - Correlação entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e carga viral no grupo HepC:

* Correlação de Spearman - $R = -0,604$; IC= -0,857 a -0,116; # HCV-RNA quantitativo por Reação em Cadeia da Polimerase; HepC = hepatite C crônica.

Em relação à análise das correlações entre células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) e as variáveis tempo provável de infecção (epidemiológico), ALT, grau de atividade histológica, estágio de fibrose e carga viral, não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa em ambos os grupos HepC e HepC+IRC ($p>0,05$). Resultados semelhantes foram demonstrados em relação ao estudo das correlações com Linfócitos B (células $CD19^+$).

4.1.5.4. Correlação entre os parâmetros fenotípicos celulares avaliados no sangue periférico:

Foi encontrada correlação positiva estatisticamente significativa entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios (células $CD16^+CD14^+DR^{++}$) na população de monócitos totais ($CD14^+$) do sangue periférico e o percentual de linfócitos B (células $CD19^+$) do sangue periférico no grupo HepC+IRC ($R= 0,656$; $IC= 0,222$ a $0,873$ – $p=0,006$) (FIG.50). Esta correlação não foi significativa no grupo HepC ($p>0,05$).

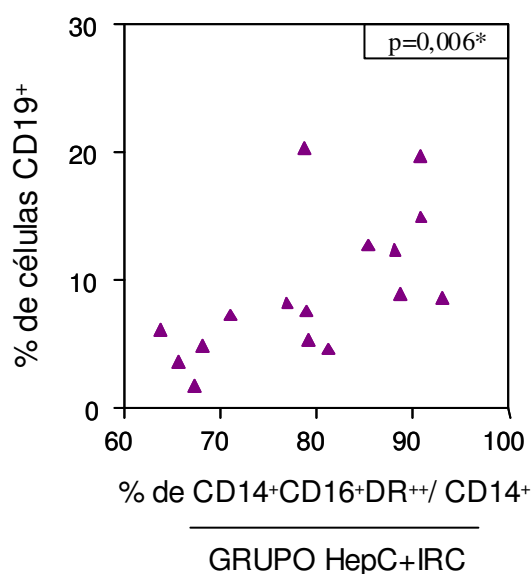


Figura 50 - Correlação entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios na população de monócitos totais e o percentual de linfócitos B do sangue periférico no grupo HepC+IRC:

* Correlação de Spearman – $R= 0,656$; $IC= 0,222$ a $0,873$; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

Foi demonstrada correlação inversa estatisticamente significativa entre o percentual de linfócitos B (células CD19⁺) do sangue periférico e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células CD8⁺HLA-DR⁺) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos (CD8⁺) quando associados os grupos HepC e HepC+IRC (n=36) (R= -0,368; IC= -0,627 a -0,034– p=0,027) (FIG.51A). Em relação ao grupo HepC+IRC não foi observada esta correlação, sendo o valor de R=-0,265 (p>0,05). No entanto, embora com valor p=0,079, foi observada correlação de Spearman (R= -0,402; IC: -0,717 a 0,050) no grupo HepC (n=20) (FIG.51B).

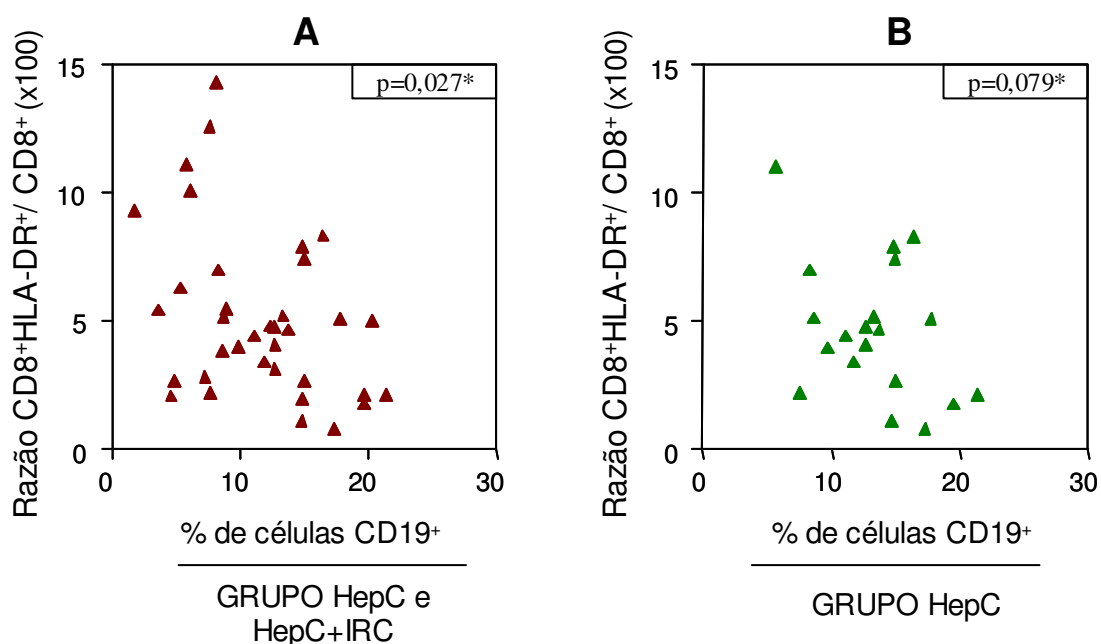


Figura 51 - Correlação entre o percentual de linfócitos B e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos do sangue periférico na associação entre os grupos HepC e HepC+IRC (A) no grupo HepC (B):

* Correlação de Spearman – associação dos Grupos HepC e HepC+IRC (n=36): R = -0,368; IC= -0,627 a 0,034; Grupo HepC (n=20): R= -0,402; IC: -0,717 a 0,050; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

O resultado da análise de correlação entre o percentual de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) do sangue periférico e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células CD4⁺HLA-DR⁺) na população de linfócitos T auxiliares periféricos revelou uma correlação positiva estatisticamente significativa no grupo HepC (R= 0,569; IC= 0,156 a 0,813 – p=0,009) (FIG.52). Em relação ao grupo HepC+IRC não foi observada esta correlação (p>0,05).

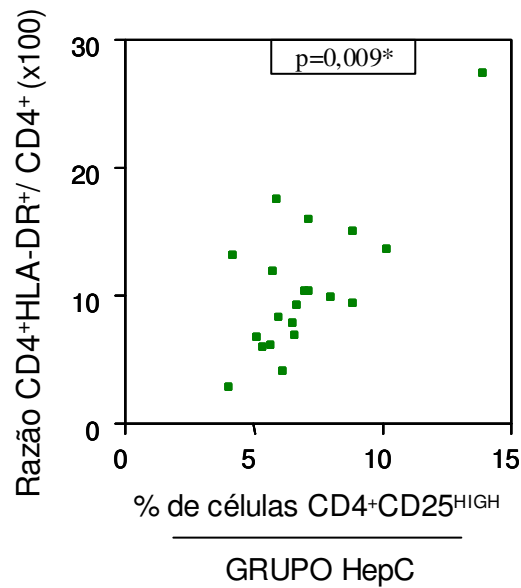


Figura 52 - Correlação entre o percentual de células T reguladoras e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados na população de linfócitos T auxiliares periféricos no grupo HepC:
 *Correlação de Spearman - $R = 0,569$; IC= 0,156 a 0,813; HepC = hepatite C crônica.

Foi demonstrada correlação inversa estatisticamente significativa entre o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) do sangue periférico e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos ($CD8^+$) no grupo HepC+IRC ($R = -0,568$; IC= -0,835 a -0,084– $p = 0,022$) (FIG.53). Em relação ao grupo HepC não foi observada esta correlação ($p > 0,05$).

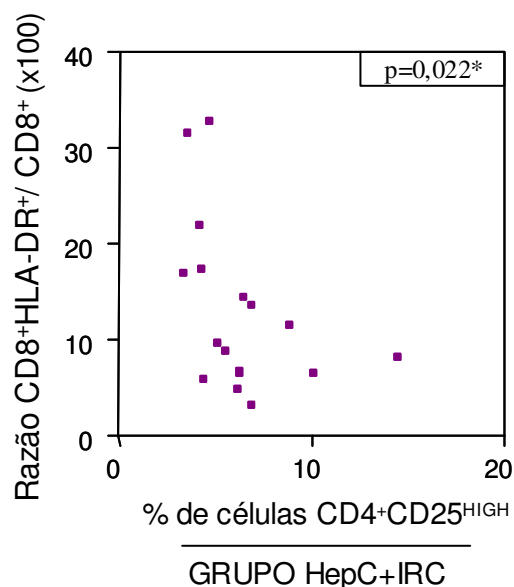


Figura 53 - Correlação entre o percentual de células T reguladoras do sangue periférico e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos no grupo HepC+IRC:
 *Correlação de Spearman - $R = -0,568$; $IC = -0,835$ a $-0,084$; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

4.1.5.5. Correlação entre células com expressão de quimiocinas e outros fenótipos celulares estudados:

O resultado das análises de correlações entre células com expressão de receptores de quimiocinas e outros parâmetros fenotípicos avaliados demonstrou significância estatística nos seguintes casos:

A- Expressão de receptores de quimiocinas do tipo 0:

Foi encontrada correlação inversa estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência de CXCR4 em linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos ($CD8^+$) quando associados os grupos HepC e HepC+IRC ($n=36$) ($R = -0,487$; $IC = -0,708$ a $-0,179$ — $p=0,003$) (FIG.54).

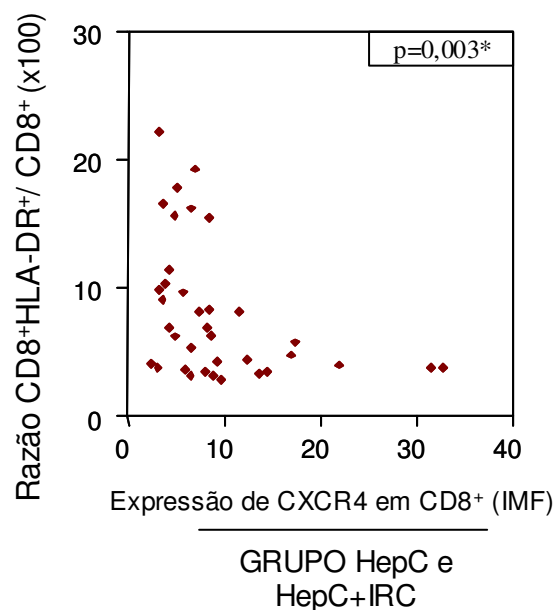


Figura 54 - Análise da correlação entre a expressão de CXCR4 em linfócitos T citotóxicos e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos quando associados os grupos HepC e HepC+IRC (n=36):

*Correlação de Spearman – $R = -0,487$; IC = -0,708 a -0,179; IMF = intensidade média de fluorescência; HepC = hepatite C crônica; HepC+IRC = hepatite C crônica+insuficiência renal crônica.

B- Expressão de receptores de quimiocinas do tipo 1:

O resultado da análise de correlação entre o percentual de células $CD8^+CXCR3^+$ nos linfócitos T citotóxicos periféricos ($CD8^+$) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) na população de linfócitos T citotóxicos periféricos ($CD8^+$) demonstrou correlação positiva estatisticamente significativa no grupo HepC ($R = 0,584$; IC = 0,176 a 0,820 – $p = 0,006$) (FIG.55).

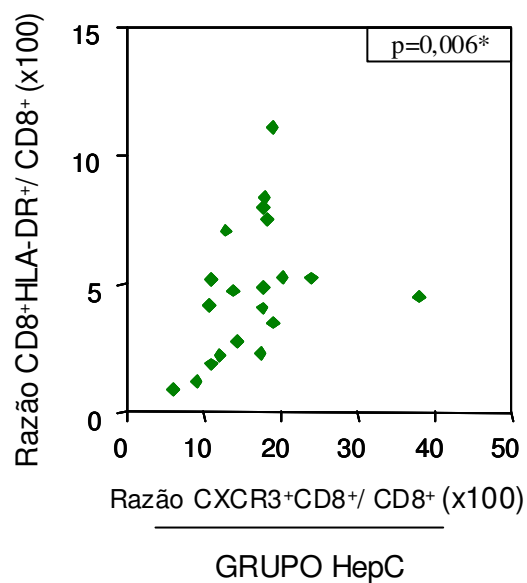


Figura 55 - Análise da correlação entre o percentual de células CD8⁺CXCR3⁺ na população de linfócitos T citotóxicos periféricos e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados na população de linfócitos T citotóxicos periféricos no grupo HepC: *Correlação de Spearman – R= 0,584; IC = 0,176 a 0,820; HepC = hepatite C crônica.

C- Expressão de receptores de quimiocinas do tipo 2:

Foi observada correlação inversa estatisticamente significativa entre a intensidade média de fluorescência de CCR3 em monócitos (CD14⁺) e o percentual de monócitos pró-inflamatórios (células CD16⁺CD14⁺DR⁺⁺) no sangue periférico no grupo HepC (R= -0,472; IC= -0,763 a -0,023 – p=0,036) (FIG.56).

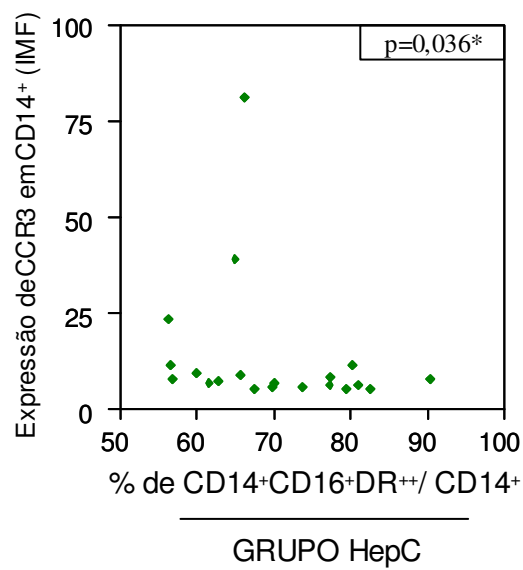


Figura 56 - Análise da correlação entre a expressão de CCR3 em monócitos e o percentual de monócitos pró-inflamatórios na população de monócitos do sangue periférico no grupo HepC:

* Correlação de Spearman –

R = -0,472; IC= -0,763 a -0,023; IMF = intensidade média de fluorescência; HepC = hepatite C crônica.

5. DISCUSSÃO:

Diversos estudos, que avaliam os mecanismos imunológicos associados à apresentação de diferentes formas clínicas e histológicas da hepatite C crônica, têm sugerido a participação de eventos multifatoriais e a combinação de parâmetros imunológicos diferentes na origem e na progressão da injúria hepatocelular, conferindo suporte à hipótese de que mecanismos complexos estão envolvidos na indução e/ou regulação da patogenia na infecção crônica pelo HCV. Embora alguns dos elementos envolvidos no fenômeno de cronificação diferenciada no curso da infecção pelo HCV já tenham sido descritos, estudos adicionais fazem-se ainda necessários para a compreensão da dinâmica desse processo (THIMME et al., 2002) e a abordagem da participação de diferentes populações celulares nos eventos protetores e/ou patológicos da doença concorre para o envolvimento e a interligação de ambos componentes da resposta imune, inata e adaptativa (DOHERTY & FARRELLY, 2000). Nesse contexto, a citometria de fluxo, através da detecção de moléculas expressas na superfície de células, marcadores de ativação, regulação e/ou migração celular, tem contribuído para um grande avanço na pesquisa científica aplicada ao estudo das doenças infecciosas humanas (FREEMANN et al., 2001). Empregando-se sistemas de análises mais elaborados e protocolos experimentais mais atuais, torna-se possível a análise simultânea de um maior número de moléculas por superfície celular, motivando a possibilidade de identificação e/ou caracterização de novas subpopulações, oferecendo, assim, informações adicionais que podem enriquecer os conhecimentos acerca dos diferentes padrões de resposta imune na hepatite C crônica. Neste trabalho, foi realizado um estudo detalhado de aspectos fenotípicos celulares e moleculares do sangue periférico de pacientes portadores de infecção crônica pelo HCV, que se presume, possa contribuir para enriquecer o conhecimento sobre esta doença, que continua a ser um desafio científico após, aproximadamente, 15 anos da descoberta do vírus C. A seguir, serão discutidos os achados relacionados aos principais parâmetros fenotípicos abordados neste estudo e suas diferenças entre os grupos envolvidos, correlacionando-os com trabalhos relevantes da literatura.

Em relação ao estudo da imunidade inata, observou-se que o grupo HepC+IRC apresenta um percentual de monócitos (CD14⁺) circulantes significativamente maior em relação aos demais grupos (NI, HepC e IRC). Paralelamente, a frequência de monócitos macrófagos-like (CD14⁺CD16⁺) revelou-se maior em ambos os grupos IRC e HepC+IRC. A razão de monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺DR⁺⁺) encontrada foi, analogamente, maior nos grupos

IRC e HepC+IRC em relação a NI, devendo-se ressaltar que foi significativamente maior no grupo HepC+IRC em relação ao grupo HepC. Diante destes achados, pondera-se que o compartimento de células fagocíticas é afetado em número e em ativação pela presença da insuficiência renal e sugere, ainda, que a infecção crônica pelo vírus C contribui para uma maior ativação de monócitos nos pacientes renais crônicos (molécula DR⁺⁺). Os monócitos CD14⁺CD16⁺, denominados “macrófagos-like”, representam uma população ativada, que podem ser distinguidos ainda como monócitos pró-inflamatórios (CD14⁺CD16⁺HLA-DR⁺⁺), contrapondo a população dos chamados monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻HLA-DR⁺) (ZIEGLER et al., 1996 SKRZECYŃSKA et al., 2002). A população minoritária de monócitos pró-inflamatórios é a principal produtora de TNF- α no sangue periférico (BELGE et al., 2002). Estudos sobre resposta imune e liberação de citocinas em pacientes sob hemodiálise demonstraram que a interação entre sangue e membrana de diálise tem o potencial de ativar células mononucleares, em particular monócitos, induzindo a síntese de citocinas: TNF- α , IL1-Beta e IL-6, gerando um estado inflamatório crônico (ZAOUI et al., 1994; PERTOSA et al., 2000), talvez exacerbado nos pacientes com doença renal e hepatite C crônica. Em relação ao estudo dos receptores de imunoglobulinas, observou-se redução na expressão da molécula CD32 (Fc γ RII) em monócitos periféricos no grupo IRC em relação a HepC, com essa mesma tendência no grupo HepC+IRC. Este receptor está relacionado à ligação de imunocomplexos, que podem ter papel modulador da atividade de monócitos. STRAUSS-AYALI et al. (2007) enfatizaram que a população de monócitos circulantes tem importante participação na resposta imune a infecções e, ao contrário do que se acreditava anteriormente, os monócitos constituem uma população diversificada morfológica e funcionalmente.

Atribui-se, na atualidade, ao estudo das células *natural killer* (CD3⁻CD16^{+/-}CD56^{+/-}), a terceira maior população de linfócitos periféricos, grande destaque na abordagem da resposta imune em pacientes com infecção crônica pelo HCV. Em contraste, estas células representam a população predominante da imunidade inata no compartimento hepático, constituindo entre 50 a 75% do total de linfócitos no fígado saudável (DOHERTY & O'FARRELLY, 2000). É importante ressaltar que os linfócitos intra-hepáticos não sofrem expansão clonal local, mas migram a partir de sítios extra-hepáticos para o órgão cronicamente infectado, onde exercem suas funções efectoras e, subseqüentemente, morrem, sugerindo que a manutenção da população de linfócitos intra-hepáticos depende de migração contínua (VALIANTE et al., 2000). As células NK são efectoras essenciais na resposta imune contra agentes virais, produzindo citoci-

nas (tais como IFN- γ e TNF- α), são responsáveis pela atividade citotóxica dependente de anticorpos, como também, interagem com células dendríticas e linfócitos T, sendo um importante elo na ligação entre imunidade inata e adaptativa, atuando na regulação e na manutenção da resposta imune específica. (BACKSTROM et al., 2004; GOLDEN-MASON & ROSEN, 2006). Ressalta-se, ainda, que uma importante forma de escape imune do HCV é a ligação da proteína E2 ao receptor CD81 nas células NK, inibindo sua função (CROTTA et al., 2002).

No presente estudo, não foi encontrada diferença significativa em relação à frequência de células NK totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) no sangue periférico entre os grupos em estudo. No entanto, a análise das subpopulações evidenciou uma menor frequência de células pré-NK (células $CD3^+CD16^+CD56^-$) no grupo HepC comparado ao grupo NI. Em relação às células NK maduras ($CD3^+CD16^+CD56^+$), os grupos não apresentaram diferença estatística, sendo encontrada uma maior frequência de células NK ativadas ($CD3^+CD16^+CD56^+$) no grupo HepC+IRC em relação aos grupos NI e IRC. GADDY & BROXMEYER (1997) ao estudarem a ontogenia das células NK, utilizando sangue de cordão umbilical, demonstraram a existência de uma nova subpopulação de células NK ($CD3^+CD16^+CD56^-$) com baixa atividade lítica. Esta população, quando cultivada na presença de IL-2, evolui para o fenótipo $CD16^{+/-}CD56^+$, sendo considerada por esses autores como linfócitos pré-NK ($CD3^+CD16^+CD56^-$), um possível precursor de células NK maduras ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^+$). O grupo HepC apresentou uma menor frequência de células pré-NK, sendo que, no grupo HepC+IRC, foi demonstrada uma maior frequência de células NK ativadas, havendo tendência a aumento também no grupo HepC. Considerando os avanços atuais no estudo fenotípico e/ou funcional detalhado de subpopulações de NK, torna-se importante situar essas informações à luz de nossas observações. Neste contexto, acredita-se que estes achados estão em concordância com a importância funcional dessas células e da sua ativação na infecção pelo HCV (BACKSTROM et al., 2004; GOLDEN-MASON & ROSEN, 2006).

No âmbito dos estudos fenotípicos e/ou funcionais de células NK, segundo ROBERTSON & RITZ (1990), existem, ainda, duas subpopulações distintas de células NK identificadas pela densidade de expressão da molécula CD56 na superfície da célula. Em indivíduos saudáveis, aproximadamente 90% das células NK são $CD56^{DIM}$ e expressam altos níveis de Fc γ RIII (CD16), enquanto a minoria, aproximadamente 10%, são $CD56^{BRIGHT}$ e $CD16^{DIM/-}$. Células NK $CD56^{DIM}$ são descritas, por esses autores, como uma população com maior atividade cito-

tóxica intrínseca e baixa produção de IFN- γ , enquanto as células CD56^{BRIGHT} caracterizam-se pelo inverso. Os resultados demonstram um aumento da população de células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{DIM}, no grupo HepC em relação a IRC ($p < 0,01$) e, analogamente, no grupo HepC+IRC em relação aos grupos NI e IRC. Simultaneamente, observa-se uma menor proporção de células NK CD3⁻CD16⁺CD56^{BRIGHT} no grupo HepC comparado ao grupo NI e, de forma similar, no grupo HepC+IRC em relação a ambos os grupos controles. Pode-se especular que o grupo HepC+IRC, além de apresentar maior frequência de células NK ativadas, apresenta ainda um percentual mais elevado de células NK com maior potencial citolítico e menor produção de IFN- γ . Acredita-se que, na infecção crônica pelo HCV, a atividade citotóxica desempenhe um papel protetor, enquanto a produção de altos níveis de IFN- γ seja responsável, preponderantemente, pelo dano tecidual hepático sobrepondo ao controle da infecção viral (GOLDEN-MASON & ROSEN, 2006). Supõe-se que, possivelmente, as células NK CD3⁻CD16⁻CD56^{DIM}, com maior potencial citotóxico, possam contribuir para o controle da resposta imune na hepatite C crônica. Assim, aliando-se ao papel protetor dos anticorpos líticos, previamente descritos, na interface da resposta imune celular e humoral, as células NK seriam um elo na ativação dos eventos de ADCC, importantes no controle da morbidade na infecção humana crônica pelo HCV.

Adicionalmente, na abordagem da população de células NK, realizou-se uma avaliação detalhada das subpopulações de células NKT. Segundo DOHERTY et al. (1999), as células NKT podem ser identificadas pelo fenótipo CD3⁺CD56⁺. São abundantes no fígado normal, representando um terço do montante total de células CD3⁺ que expressam, simultaneamente, CD16, CD56 e/ou CD161 (receptores de superfície de células NK), situando-se, portanto, na interface entre resposta imune inata e adaptativa. As células NKT parecem ter implicação na vigilância tumoral e em fenômenos de auto-imunidade, sendo seu papel na infecção crônica pelo HCV ainda pouco definido (TAKEDA et al., 2000). Com o intuito de classificar as diferentes subpopulações, as células NKT foram subdivididas em: NKT1 (CD3⁺CD16⁺CD56⁻), NKT2 (CD3⁺CD16⁻CD56⁺) e NKT3 (CD3⁺CD16⁺CD56⁺). No presente estudo, a frequência das células NKT totais (CD3⁺CD16^{+/-}CD56^{+/-}) mostrou-se semelhante em todos os grupos, assim como a frequência das células NKT1 (CD3⁺CD56⁻CD16⁺) e NKT 3 (CD3⁺CD56⁺CD16⁺). Observou-se que os grupos HepC e HepC+IRC apresentam um maior percentual de células NKT2 (CD3⁺CD56⁺CD16⁻) em relação a IRC. O papel dessas subpopulações de células NKT ainda não está estabelecido na literatura através de estudos funcionais.

Assim, investigações focalizando aspectos funcionais destas populações de linfócitos, bem como o seu padrão de síntese de citocinas, consistem em importante objeto de interesse futuro.

Comum a ambos os grupos HepC e HepC+IRC foi a identificação de maior expressão do marcador HLA-DR em neutrófilos circulantes em relação a NI, caracterizando a presença de ativação destas células. Os conhecimentos sobre o papel da imunidade inata na determinação da evolução e progressão da infecção pelo HCV são, não obstante, restritos, haja vista que apenas recentemente pesquisas científicas, nesta esfera do sistema imune, têm sido desenvolvidas. Por conseguinte, este estudo se sobressai pela análise global e abrangente dos seus respectivos componentes. As características que conferem à imunidade adaptativa distintas particularidades em relação à imunidade inata incluem especificidade, diversidade e memória. A seguir, serão discutidos os principais resultados encontrados na análise da imunidade adaptativa.

Considerando o compartimento de linfócitos T ($CD3^+$) e a frequência das subpopulações de linfócitos T, respectivamente, o percentual de linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e de linfócitos T citotóxicos ($CD8^+$), não há diferença entre os grupos. Todavia, o estudo da expressão da molécula HLA-DR (o mais fidedigno marcador de ativação de células T em humanos) em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ identificou percentual significativamente maior de células $CD4^+HLA-DR^+$ e células $CD8^+HLA-DR^+$ em ambos os grupos HepC e HepC+IRC em relação a NI, refletindo a presença da ativação celular no contexto da infecção crônica pelo HCV, independentemente da presença de IRC. Estudos imunohistoquímicos, há tempos, indicam que estas células são importantes mediadores da injúria hepática na patogenia da infecção pelo HCV (MARROGI et al., 1995).

Recentemente, foi descrita, em humanos, a presença de células T co-expressando o marcador CD4 e altos níveis de CD25 (IL-2R) que se caracterizam pela anergia em respostas a estímulos policlonais, associada à elevada capacidade de suprimir a produção de citocinas e a proliferação de células T $CD4^+$ e $CD8^+$, através de um mecanismo complexo de contato célula-célula, sendo assim denominadas células T $CD4^+$ reguladoras (BAECHER-ALLAN et al., 2001; DIECKMANN et al., 2001; JONULEIT, et al., 2001). Embora, em modelos experimentais murinos, as células T $CD4^+$ reguladoras sejam diferenciadas por apresentarem o fenótipo

CD4⁺CD25⁺, sendo, na sua totalidade, possuidoras de potencial papel regulador, caracterizado por diminuição de produção de citocinas e habilidade de inibir proliferação celular *in vitro*, em humanos, apenas as CD4⁺CD25^{HIGH} apresentam esta habilidade. Em camundongos, os estudos de células Treg sugeriram que as células CD4⁺CD25⁺ parecem ser importantes para a manutenção da tolerância própria e na prevenção de doenças autoimunes (SAKAGUCHI et al., 2001). Em humanos, estudos de células T CD4⁺CD25^{HIGH} evidenciaram sua importância crucial na contenção de desordens autoimunes em humanos, pois estão relacionadas com uma importante função na manutenção da tolerância periférica. Neste contexto, TAAMS et al. (2002) demonstraram que estas células suprimem a proliferação contra antígenos próprios, assim como contra aqueles provenientes da dieta e antígenos estranhos. Segundo BACHER-ALLAN et al. (2001) as células CD4⁺CD25^{HIGH} apresentam um papel regulador, caracterizado por diminuição da produção de citocinas e habilidade de inibir proliferação celular *in vitro*, em especial a produção da citocina IFN- γ . Analisando de forma isolada, não se encontrou diferença estatisticamente significativa no percentual de células CD4⁺CD25^{HIGH} entre os grupos estudados. CABRERA et al. (2004) demonstraram expansão relativa dessas células no sangue periférico de portadores de infecção crônica pelo HCV em relação a controles, empregando como marcador a presença de IL-10 no citoplasma, estudo sob ênfase mais funcional.

A forma de envolvimento da resposta imune humoral na evolução da infecção crônica pelo HCV não está claramente definida (FREEMANN et al., 2001). De acordo com BASSETT et al. (1999), o clareamento da infecção pelo HCV pode ocorrer na ausência do desenvolvimento de quaisquer anticorpos contra proteínas do envelope, portanto, a presença de anticorpos parece não se correlacionar com proteção. No entanto, o emprego recente de culturas de tecido hepático possibilitou a identificação de anticorpos que bloqueiam a entrada do HCV nos hepatócitos, através da neutralização de pseudópodes do vírus *in vitro* (LOGVINOFF et al., 2004). Conforme discutido previamente, observa-se que os resultados não demonstraram diferença significativa em relação à frequência de linfócitos T circulantes (CD3⁺), como na razão entre linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺) entre os grupos. Entretanto, a análise dos dados revelou um aumento da razão entre linfócitos T (CD3⁺) e linfócitos B (CD19⁺) nos grupos IRC e HepC+IRC em relação ao grupo NI, decorrente de uma redução significativa no percentual de linfócitos B (CD19⁺) periféricos nesses grupos, inclusive em relação à HepC. De forma interessante, avaliando as subpopulações de linfócitos B, identifica-se que a diminuição da população de linfócitos B periféricos (CD19⁺) resulta da redução do percentual de

linfócitos B1 ($CD19^+CD5^+$) na população de linfócitos B totais, com um aumento relativo do percentual de linfócitos B convencionais ($CD19^+CD5^-$) nos grupos IRC e HepC+IRC. Linfócitos B1 ($CD19^+CD5^+$) representam uma subpopulação de linfócitos B envolvida, principalmente, em fenômenos de imunidade e produção de IgM, sendo suprimida por citocinas do tipo 1 (IFN- γ) e estimulada por citocinas do tipo 2 (IL-2, IL-4, IL-5 e IL-10) (VOGEL et al., 1996).

A expressão da molécula reguladora CD32 (Fc γ RII) em linfócitos B (Células $CD19^+$) do sangue periférico foi semelhante entre os grupos estudados. Estudos realizados por MUTA et al. (1994) mostraram que a ligação de imunocomplexos ao receptor CD32 em linfócitos B e o seu entrecruzamento junto ao receptor de células B (BCR) gera um sinal regulador negativo que inibe a ativação, a proliferação e a secreção de anticorpos pelos linfócitos B. Quando analisada a expressão de moléculas de ativação celular, a expressão da molécula HLA-DR em linfócitos B não revelou, igualmente, diferença significativa entre os quatro grupos. Entretanto, a análise da expressão da molécula ativadora CD23, que consiste em um receptor para IgE, em linfócitos B ($CD19^+$) demonstrou uma diminuição no percentual de linfócitos B ativados (Células $CD19^+CD23^+$), no sangue periférico, nos grupos IRC e HepC+IRC em relação a NI.

Os resultados da abordagem de linfócitos B, conjuntamente, sugerem um comprometimento do segmento humoral, tanto dos parâmetros fenotípicos quanto funcionais, determinado pela doença renal subjacente, em conformidade com os estudos da literatura. Verifica-se que há retração quantitativa do segmento de linfócitos B em IRC e HepC+IRC, associada à diminuição de linfócitos B1, com redução do número de linfócitos B ativados ($CD19^+CD23^+$), embora a expressão das moléculas CD32 e HLA-DR tenha sido semelhante. Pesquisas atuais afirmam que a resposta imune celular está relativamente preservada na IRC e que, paralelamente, parece haver deficiência da resposta imune humoral na doença renal avançada, evidência suportada pela menor eficácia na produção de anticorpos induzida pelas vacinas do HBV, pneumocócica, contra o hemófilos, dentre outras. (MEYERS et al, 2003). Não obstante, já foi demonstrado que a sorologia pelo ELISA anti-HCV pode não ser confiável em pacientes em diálise (HINRICHSSEN et al., 2002; DOTTA et al., 2003). Não foram encontrados estudos, na literatura, sobre esta análise de caráter abrangente, envolvendo infecção crônica pelo HCV e IRC.

Conforme ressaltado previamente, os linfócitos intra-hepáticos não sofrem expansão clonal no fígado, mas migram a partir de sítios extra-hepáticos para o órgão cronicamente infectado, sugerindo que a manutenção da população de linfócitos intra-hepáticos depende de migração contínua (VALIANTE et al., 2000). As quimiocinas são moléculas que regulam a migração e o acúmulo de leucócitos específicos para os sítios onde estão ocorrendo processos inflamatórios. Estas proteínas, de pequeno peso molecular (aproximadamente 8 a 12 Kda), compreendem quatro famílias classificadas conforme a posição de seus resíduos de cisteína na região N-terminal: CXC (α), CC (β), C (γ) e CX3C (δ) (BAGGIOLINI et al., 1994; KELNER et al., 1994; CLARK-LEWIS et al., 1995; HOWARD et al., 1996). As quimiocinas parecem estar envolvidas em vários fenômenos biológicos, incluindo proliferação de células T (TAB et al., 1996), diferenciação das subpopulações de linfócitos T do tipo 1 e tipo 2 (GAO et al., 1996) e produção de IL-1 e IL-6 por macrófagos (JIANG et al., 1992). Exercem funções efetoras através da ligação a receptores específicos presentes na superfície celular, acoplados à proteína G (FOXMANAET et al., 1997), com expressão diferenciada em linfócitos e monócitos (ARAI & CHARO, 1996; SALLUSTO et al., 1998). Estes estudos correlacionaram a expressão diferencial de receptores de quimiocinas com funções celulares específicas, como por exemplo: a expressão de CCR7 e CXCR4 em células T virgens, CCR5/CXCR3 e CCR3/CCR4 em células T com o padrão de síntese de citocinas do tipo 1 e do tipo 2, respectivamente. Por outro lado, o receptor CCR2 é expresso em ambas as subpopulações de linfócitos T (tipo 1 e tipo 2). A população de monócitos circulantes expressa na superfície celular CCR1, CCR4, CCR5 e CXCR4 (JIANG et al., 1992) e, em humanos, os monócitos pró-inflamatórios, ativados no intercurso de infecções, não expressam CCR2 (STRAUSS-AYALI et al., 2007). A análise de receptores de quimiocinas apresenta-se como uma abordagem complementar que possibilita a identificação do perfil da resposta imune associada à dinâmica dos eventos imunológicos desencadeados pela infecção crônica pelo HCV. Em síntese, a maior expressão de CXCR3 e CCR5 tem sido associada ao padrão de resposta imune do tipo 1, enquanto o padrão de resposta imune do tipo 2 é caracterizado por maior expressão de CCR3 e CCR4. Na resposta imune do tipo 0 (mista) é observada maior expressão de CCR2 e CXCR4 (SALLUSTO, 1998).

Haja vista as importantes diferenças encontradas no estudo dos parâmetros fenotípicos em macrófagos circulantes, decidiu-se avaliar a expressão de quimiocinas nestas células, como representantes da imunidade inata. A expressão dos receptores de quimiocinas CCR2 (Tipo 0)

e CXCR3/ CCR5 (Tipo 1) em monócitos do sangue periférico mostrou-se semelhante entre os quatro grupos e a expressão do receptor de quimiocina CCR3 (Tipo 2) foi significativamente menor em ambos os grupos HepC e IRC. Por outro lado, a expressão de CXCR4 (Tipo 0), que é uma quimiocina de padrão misto, foi significativamente menor nos grupos IRC e HepC+IRC em relação a NI, o que poderia sugerir uma tentativa de modulação da resposta imune ou alteração nos mecanismos de regulação e/ou ativação dessas células, através de internalização do receptor, nestes grupos.

Em relação à imunidade adaptativa, o resultado do estudo da expressão dos receptores de quimiocinas do tipo 0 mostrou-se semelhante entre os grupos em relação à expressão da molécula CCR2 em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). A análise dos dados referentes à expressão da molécula CXCR4 em linfócitos T identificou redução da intensidade média de fluorescência em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e em linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) no grupo HepC+IRC. Ressalva-se que o receptor CXCR4 tem atividade quimiotática para linfócitos T inativos/virgens (VALIANTE et. al., 2000).

Considerando a análise da expressão de receptores de quimiocinas do tipo 1 em linfócitos T periféricos, encontrou-se maior percentual de células CD4⁺CXCR3⁺ no grupo HepC comparado a NI e, em relação aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), observou-se um menor percentual de células CD8⁺CXCR3⁺ nos grupos HepC e HepC+IRC. APOLINARIO et al. (2002) descreveram elevado percentual de células CD3⁺CXCR3⁺ no compartimento intra-hepático de pacientes com infecção crônica pelo HCV, identificando correlação significativa entre a expressão de CXCR3 e atividade inflamatória. Mais recentemente, CALVINO et al. (2007) demonstraram que, além de atuar no recrutamento de linfócitos T CD8⁺ e na inflamação tecidual hepática, o aumento do percentual de linfócitos CD8⁺CXCR3 circulantes, no pós-tratamento, associa-se ao controle da viremia. A hipótese da redução do percentual destes linfócitos na periferia estar relacionada à migração para o fígado deve ser considerada, fundamentando-se na ciência de que a molécula CXCR3 é expressa em linfócitos ativados. Com referência à expressão de CCR5, observou-se aumento da expressão desta molécula em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ do sangue periférico no grupo IRC. A análise da expressão de receptores de quimiocinas do tipo 2 em linfócitos T demonstrou uma diminuição da expressão da molécula CCR3⁺ em linfócitos T auxiliares (CD4⁺) no grupo HepC e, em relação aos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), observou-se redução na expressão de CCR3⁺ no grupo HepC+IRC, ambos

comparados a NI. No âmbito da análise fenotípica aplicada ao estabelecimento de padrões de resposta imune distintos, incluindo-se a imunidade do tipo 1 e do tipo 2, diversos estudos têm demonstrado que as quimiocinas têm uma papel importante mediando suas atividades através da ligação a seus receptores na superfície dos leucócitos. Para o estabelecimento de um padrão de resposta imune misto (tipo 0) é necessária a existência simultânea de mecanismos ativadores e moduladores da resposta imune (VALIANTE et. al., 2000).

Analisando de forma global, observa-se que a expressão de receptores de quimiocinas no sangue periférico está diminuída no grupo HepC+IRC em relação ao grupo controle e que, na infecção crônica pelo vírus C, há uma complexidade e não um predomínio de resposta imune no contexto da análise desses receptores, sugerindo a existência de mecanismos imunomoduladores neste repertório, sobressaindo a maior expressão de receptores do tipo 1 no grupo HepC. Os estudos de BONECCHI (1998) sugeriram que o padrão de expressão destes receptores pode ser empregado como indicador do estabelecimento de mecanismos distintos da resposta imune no contexto da imunidade do tipo 1 e do tipo 2. Nesse contexto, as células T efectoras expressam diferentes tipos de receptores de quimiocinas que contribuem para determinar a orientação da resposta imune, da qual depende a evolução da infecção pelo HCV, ou seja, o clareamento ou a persistência do vírus (KYONG-MI, 2003).

Em uma segunda fase, foram realizadas correlações entre os diversos parâmetros fenotípicos estudados, entre si e com dados epidemiológicos, laboratoriais e histológicos. Para uma discussão mais concisa, serão abordadas as correlações significantes em cada grupo.

Conforme já estabelecido na literatura (KYONG-MI, 2003), observou-se correlação positiva forte entre ALT e grau de atividade histológica (METAVIR) no grupo HepC ($R=0,819$), importante no contexto das análises de resposta imune inflamatória. Em contraste, acredita-se que pelas características intrínsecas do grupo HepC+IRC - 75% dos participantes com ALT normal, em concordância com a literatura (Meyers et al., 2003) - embora com $R=0,49$, esta correlação não foi significativa em pacientes com IRC e infecção crônica pelo HCV ($IC= -0,133$ a $0,837 - p>0,05$).

De caráter interessante, o grupo HepC apresentou correlação inversa moderada a forte ($R= -0,604$) entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^{+}HLA-DR^{+}$) na

população de linfócitos T e a carga viral (PCR quantitativo). REHERMANN et al. (1996) evidenciaram que a resposta imune específica por linfócitos T citotóxicos é capaz de controlar, mas, isoladamente, não extinguir a viremia. Observou-se, também, correlação positiva moderada ($R= 0,569$) entre o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) do sangue periférico e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$) no grupo HepC. Conforme discutido previamente, as células $CD4^+CD25^{HIGH}$ são responsáveis pelo controle da resposta imune, pois estão relacionadas com a manutenção da tolerância periférica (TAAMS et al., 2002) e apresentam papel regulador, caracterizado por diminuição da produção de citocinas, em especial a produção de $IFN-\gamma$ (BACHER-ALLAN et al., 2001). Neste sentido, possivelmente, proliferam paralelamente ao aumento do número de células ativadas. Foi, ainda, identificada, neste grupo, correlação moderada ($R= 0,584$) entre o percentual de células $CD8^+CXCR3^+$ e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados periféricos (células $CD8^+HLA-DR^+$), corroborando para a importância do recrutamento de $CD8^+HLA-DR^+$ na infecção crônica pelo VHC no grupo HepC. Evidências prévias demonstraram a íntima relação entre a expressão deste receptor de quimiocinas e gravidade da atividade inflamatória tecidual hepática (APOLINARIO et al., 2002; CALVINO et al., 2007).

No grupo HepC+IRC houve correlação inversa moderada a forte ($R = -0,637$) entre as células NKT totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) e o tempo provável de infecção (epidemiológico). Este achado pode se relacionar à importância destas células na fase mais precoce da infecção (TAKEDA et al., 2000) ou à sua exaustão pelo tempo prolongado de infecção. Uma interessante correlação inversa moderada a forte ($R = -0,637$) entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$) periféricos e ALT, como também, entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) e ALT ($R = -0,508$) foi demonstrada somente no grupo HepC+IRC. Aproximadamente 70% dos portadores de hepatite C crônica com IRC associada, sabidamente, apresentam níveis de ALT normal, sendo esta aminotransferase, neste grupo em particular, não confiável para avaliar grau de atividade da doença hepática (MEYERS et al., 2003). Observando as FIG.47 e FIG. 48, identifica-se, de forma clara, que são os únicos quatro pacientes que apresentam ALT acima do limite superior da normalidade (LSN) aqueles que apresentam menores percentuais de células $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD8^+HLA-DR^+$ periféricas. Duas ponderações são pertinentes, ou estes pacientes, em particular, têm maior migração destes linfócitos ativados para o compartimento hepático (causando maior lise hepatocitária) ou um perfil funcional de resposta imune (polarização ou ativação) divergente. Destaca-se, também, a presença de correlação positiva moderada a forte ($R = 0,656$) entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios (células $CD16^+CD14^+DR^{++}$) e o percentual de linfócitos B (células $CD19^+$) do sangue periférico no grupo HepC+IRC. Conforme discutido anteriormente, observou-se, neste grupo, um comprometimento da resposta imune humoral decorrente, provavelmente, da doença renal subjacente, em concordância com estudos prévios (HINRICHSSEN et al., 2002). Esta correlação positiva pode significar uma tentativa da imunidade inata, através da proliferação de monócitos pró-inflamatórios (população que é ampliada neste grupo) e produção de citocinas, de estimular a proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, restituir a resposta imune humoral deficiente. Finalmente, o grupo HepC+IRC apresentou correlação inversa forte ($R = -0,568$) entre o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) periféricos. Está demonstrado que as células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}$ periféricas suprimem a produção de $IFN-\gamma$ por linfócitos T citotóxicos $CD8^+$, tornando-os menos efetivos. No âmbito que a atividade citotóxica destas células é importante mediadora, outrossim, da injúria hepática, esta correlação é bastante relevante, haja vista que este grupo apresenta menor intensidade de dano tecidual hepático. Este estudo envolveu uma análise extensa e minuciosa da resposta imune nestes grupos e, considerando-se a análise ampla de

fenótipos celulares, trata-se de um trabalho original. Para o melhor entendimento e maior abrangência contextual desses achados, analisados à luz dos conhecimentos prévios sobre cada grupo distinto, os resultados foram agrupados (FIG.57).

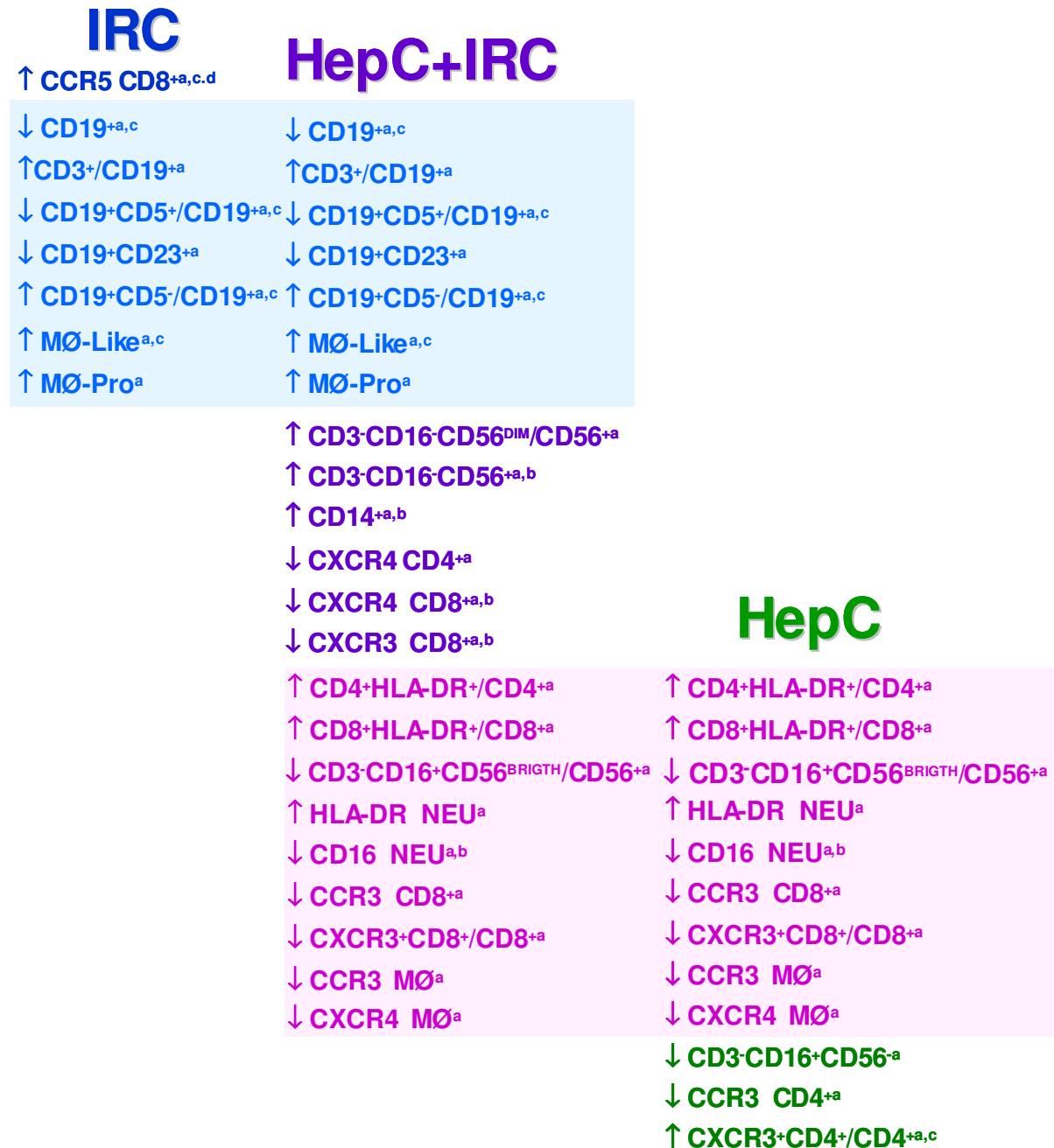


Figura 57 - Síntese do padrão e interseção do perfil fenotípico celular e molecular entre os grupos portadores de hepatite C crônica sem (HepC) e com doença renal associada (HepC+IRC) e controle renais crônicos (IRC):
A orientação das setas representa elevação ou diminuição de um dos parâmetros em relação aos grupos NI, IRC, HepC e HepC+IRC, indicados pelas letras "a", "b", "c" e "d", respectivamente. MØ = macrófagos.

SÍNTESE DA DISCUSSÃO:

Grupos HepC e HepC+IRC:

Os resultados demonstraram perfis distintos de resposta imune entre os portadores de hepatite C crônica com e sem doença renal avançada associada. Comum a ambos os grupos HepC e HepC+IRC foi a identificação de maior expressão do marcador HLA-DR em neutrófilos circulantes, assim como em células T auxiliares e citotóxicas, demonstrando a presença de ativação celular, independente da presença de IRC.

Grupo HepC:

O grupo de portadores de hepatite C crônica com função renal preservada apresentou, de forma particular, aumento da expressão de CXCR3 (quimiocina do tipo 1, normalmente expressa em linfócitos T ativados, relacionada à produção de IFN- γ e TNF- α) em linfócitos T auxiliares e uma redução da expressão de CCR3 (quimiocina do tipo 2), evidência que contribui para determinar, especificamente neste grupo, o perfil da resposta imune celular, que é essencialmente adaptativa, com predomínio da resposta do tipo 1. Foi demonstrado, em estudos experimentais, que esse ambiente de produção IFN- γ e TNF- α correlaciona-se com inflamação e injúria hepatocelular (DOHERTY & FARRELLY, 2000; FREEMANN et al., 2001). Neste grupo, 75% dos portadores crônicos do HCV têm ALT (marcador de lise hepatocitária) maior que duas vezes o LSN e observou-se uma forte correlação positiva entre ALT e grau de atividade histológica (METAVIR) no grupo em estudo HepC. Resultado interessante foi a presença no grupo HepC de correlação inversa moderada a forte entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células CD8⁺HLA-DR⁺) e a carga viral (PCR quantitativo). REHERMANN et al. (1996) evidenciaram que a resposta imune específica por linfócitos T citotóxicos é direcionada para o controle viremia, entretanto envolve mecanismos que, por vezes, resultam na destruição celular. Foi, ainda, identificada, neste grupo, correlação entre as células CD8⁺ que expressam a quimiocina CXCR3⁺ (efetora de quimiotaxia para linfócitos ativados) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados periféricos (células CD8⁺HLA-DR⁺), corroborando para a importância do recrutamento de CD8⁺HLA-DR⁺ na infecção crônica pelo HCV no grupo HepC. Evidências recentes apontam para a estreita relação entre a expressão

deste receptor de quimiocinas e a gravidade da atividade inflamatória tecidual hepática (APOLINARIO et al., 2002; CALVINO et al., 2007). É possível que o sistema imune, com o objetivo de controlar a viremia, promova a injúria hepática e, em face da correlação positiva encontrada entre o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$), haja uma tentativa de controlar essa resposta imune, dado o papel regulador de $CD4^+CD25^{HIGH}$ (TAAMS et al., 2002).

Grupo HepC+IRC:

Em portadores de hepatite C crônica e insuficiência renal crônica observou-se evidente envolvimento global da imunidade inata, principalmente via ativação de monócitos, além da participação de células NK, paralelamente à participação da imunidade adaptativa.

O grupo controle IRC, estrategicamente incluído, suporta a hipótese de que o aumento na frequência da população de monócitos circulantes e sua ativação ($CD14^+CD16^+HLA-DR^{++}$) seja uma característica específica de portadores de IRC. Estudos prévios demonstraram que o contato com a membrana de diálise e bactérias presentes no líquido de diálise promove e perpetua a ativação anormal de monócitos (PERTOSA et al., 2000; CARRACEDO et al., 2002).

O grupo HepC+IRC apresentou maior frequência de células NK ativadas ($CD3^-CD16^-CD56^+$), além de percentual mais elevado de células NK com maior potencial citolítico (aumento das células NK $CD3^-CD16^-CD56^{DIM}$) e menor produção de IFN- γ (diminuição das células NK $CD3^-CD16^+CD56^{BRIGHT}$). Acredita-se que, na infecção crônica pelo VHC, as células NK com atividade citotóxica (ADCC) desempenham papel protetor, enquanto a produção de altos níveis de IFN- γ seja responsável, preponderantemente, pelo dano tecidual hepático sobrepondo ao controle da infecção viral (GOLDEN-MASON & ROSEN, 2006). Embora publicações mais recentes ressaltem a importância da imunidade inata na patogenia da hepatite C crônica (CROTTA et al., 2002; PERNOLLET et al., 2002), pesquisas envolvendo a participação funcional e subpopulações de células NK são ainda restritas na literatura. Pondera-se um papel protetor da imunidade inata neste subgrupo, suportado, outrossim, neste perfil funcional das células NK.

Em relação à imunidade adaptativa, foi notória a retração no compartimento de linfócitos B ($CD19^+$) nos grupos IRC e HepC+IRC, decorrente da redução do percentual de linfócitos B1 ($CD19^+CD5^+$) na população de linfócitos B totais, paralelamente a uma diminuição no percentual de linfócitos B ativados (Células $CD19^+CD23^+$). Estes achados, em conjunto, sugerem um comprometimento do segmento humoral, tanto dos elementos fenotípicos quanto funcionais, determinado pela doença renal subjacente, em conformidade com os estudos da literatura. Pesquisas atuais afirmam que parece haver uma deficiência da resposta imune humoral na doença renal avançada (MEYERS et al., 2003). Destaca-se, também, a correlação positiva moderada a forte, observada neste grupo, entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios (células $CD16^+CD14^+DR^{++}$) e o percentual de linfócitos B (células $CD19^+$) do sangue periférico. Esta correlação pode significar uma tentativa da imunidade inata, através da proliferação de monócitos pró-inflamatórios (população que é ampliada neste grupo) e produção de citocinas, de estimular a proliferação de linfócitos B e, conseqüentemente, restituir a resposta imune humoral deficiente. Observou-se correlação inversa entre NKT totais ($CD3^+CD16^{+/-}CD56^{+/-}$) e o tempo provável de infecção pelo HCV, sugerindo a importância destas células na fase mais precoce da infecção (TAKEDA et al., 2000) ou a sua exaustão pelo tempo prolongado de infecção. Contudo, algumas ponderações merecem ser feitas em relação à análise geral deste grupo. Sabe-se que a hemodiálise em portadores de IRC sustenta um ambiente inflamatório contínuo, onde se observa uma exacerbação da resposta imune inata buscando a ativação da resposta imune adaptativa, que não é, em suma, eficaz. De fato, os estudos de CARRACEDO et al. (2002) identificaram um processo de senilização precoce dos monócitos submetidos à ativação constante, reduzindo a sua capacidade funcional, contribuindo para a deficiência na estimulação da resposta imune adaptativa.

Observou-se aumento no percentual de linfócitos T ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$ e células $CD8^+HLA-DR^+$) neste grupo, assim como em HepC. Ressalva-se, entretanto, que há redução, de forma global, da expressão de receptores de quimiocinas nos linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ no grupo Hep+IRC, em especial CXCR3 e CXCR4, moléculas quimiotáticas para linfócitos, podendo esse achado caracterizar uma menor migração dessas células para o fígado. Lembra-se que os linfócitos intra-hepáticos não sofrem expansão clonal no fígado, mas migram a partir de sítios extra-hepáticos para o órgão cronicamente infectado, sugerindo que a manutenção da população de linfócitos intra-hepáticos depende de migração contínua (VALIANTE et al., 2000). Uma interessante correlação inversa moderada a forte entre o percentual de lin-

fócitos T auxiliares ativados (células $CD4^+HLA-DR^+$) periféricos, como também, entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) e ALT foi demonstrada somente no grupo HepC+IRC. Tem-se descrito que cerca de 70% dos portadores de IRC infectados pelo HCV apresentam ALT normal (MEYERS et al., 2003). Interessante foi a identificação, neste estudo, que somente os pacientes renais crônicos com ALT acima do LSN ($n=4$) apresentaram menores percentuais de células $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD8^+HLA-DR^+$ periféricas. Explicações possíveis para este fato são a provável maior migração dos linfócitos ativados para o compartimento hepático (causando maior lise hepatocitária) ou um perfil funcional de resposta imune (polarização ou ativação) divergente. Através do emprego de gráficos de dispersão e da avaliação direta no banco de dados, observa-se que estes quatro portadores de HepC+IRC com ALT elevada apresentam comportamento fenotípico bastante próximo do grupo HepC, em detrimento à IRC. Finalmente, demonstrou-se correlação inversa moderada entre o percentual de células T reguladoras ($CD4^+CD25^{HIGH}$) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células $CD8^+HLA-DR^+$) periféricos, exclusivamente no grupo HepC+IRC. Está demonstrado que as células T reguladoras $CD4^+CD25^{HIGH}$ periféricas suprimem a produção de IFN- γ por linfócitos T citotóxicos $CD8^+$, tornando-os menos efetivos. No âmbito que a atividade citotóxica destas células é importante mediadora, outrossim, da injúria hepática, esta correlação é bastante relevante, haja vista que este grupo apresenta lesão hepatocelular menos intensa. Uma segunda ponderação, com bases nestes achados, é pertinente. Os pacientes portadores de hepatite C crônica e insuficiência renal apresentam, em sua maioria, ALT normal e lesão hepática histológica menos intensa, conforme descrito na literatura (MEYERS et al., 2003). Numa visão ampliada, os resultados acima apresentados sugerem que o grupo HepC+IRC apresenta uma resposta adaptativa deficiente ou são mais intolerantes, refletindo no grau de lesão inflamatória hepática. LIBETTA et al. (2001) descreveram que a uremia promove uma configuração do perfil de citocinas que deprime a imunidade celular, também em concordância, YOON et al. (2006) identificaram que a doença renal avançada resulta no aumento da apoptose e na diminuição das populações de linfócitos T virgens e de memória. Associadamente, estes pacientes, submetidos a consecutivas sessões de hemodiálise, podem sofrer sucessivas perdas de moléculas de baixo peso molecular, tais como citocinas e quimiocinas.

Contudo, para melhor esclarecimento dos achados deste estudo, postula-se que a avaliação do perfil das citocinas produzidas pelos leucócitos no sangue periférico, bem como das citocinas

solúveis no plasma, e a análise comparativa dos parâmetros fenotípicos no compartimento hepático sejam objetos de futuras linhas de pesquisa, visando o aprimoramento e o amadurecimento das concepções propostas sobre a resposta imune no contexto da infecção crônica pelo HCV, todavia restringindo as limitações deste trabalho porventura existentes.

Não foram encontrados estudos, na literatura, contendo esta análise de perfil abrangente, envolvendo hepatite C crônica e/ou IRC. Acredita-se que mecanismos múltiplos estejam atuando de forma diferenciada, acoplando eventos protetores ou indutores de danos teciduais, envolvendo distintos compartimentos do sistema imune, bem como diferentes tipos celulares, na orquestração da imunopatogenia na infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

À luz do conhecimento da complexidade do sistema imune, enfatiza-se a importância da compreensão de suas interações no contexto do balanço entre padrões da resposta imune inflamatória e moduladora não como mecanismos polares, isolados e independentes, mas sim como uma resultante do predomínio de um ou outro tipo de resposta imune. Concluindo, este estudo submete à seguinte reflexão (WRIGHT & DARLING, 2004): “Resposta imune na hepatite C: o problema é o vírus ou o hospedeiro?”

6. CONCLUSÕES:

Os resultados demonstraram perfis distintos de resposta imune entre os portadores de hepatite C crônica com e sem doença renal avançada. Paralelamente, foram encontrados parâmetros fenotípicos relacionados, exclusivamente, à presença de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, comuns a ambos os grupos, além de parâmetros fenotípicos particularmente determinados e que se preservam na presença da insuficiência renal crônica subjacente.

A. Em relação à frequência de populações e subpopulações de leucócitos do sangue periférico envolvidos na resposta imune inata e adaptativa:

- o grupo de portadores de hepatite C crônica e insuficiência renal crônica apresentou evidente envolvimento global da imunidade inata, principalmente via ativação de monócitos ($CD14^+CD16^+HLA-DR^{++}$), sendo esta uma característica da doença renal crônica que se preserva na vigência da infecção pelo HCV. Este grupo, além de apresentar maior frequência de células NK ativadas ($CD3^-CD16^-CD56^+$), apresenta ainda percentual mais elevado de células NK com maior potencial citolítico ($NK\ CD3^-CD16^-CD56^{DIM}$) e menor produção de $IFN-\gamma$ ($NK\ CD3^-CD16^+CD56^{BRIGHT}$);
- sobre a imunidade adaptativa, observou-se significativa retração no compartimento de linfócitos B ($CD19^+$) nos grupos com insuficiência renal crônica, decorrente da redução do percentual de linfócitos B1 ($CD19^+CD5^+$), independentemente da presença de infecção crônica pelo vírus da hepatite C.

B. Considerando a expressão de marcadores de ativação de leucócitos do sangue periférico:

- ambos os grupos HepC e HepC+IRC apresentaram maior expressão do marcador HLA-DR em neutrófilos circulantes;
- não houve diferença na frequência de populações e subpopulações de linfócitos T ($CD3^+$), entretanto, a ativação de células T auxiliares ($CD4^+HLA-DR^+$) e citotóxicas ($CD8^+HLA-DR^+$) foi comum a ambos os grupos portadores de hepatite C crônica, independentemente da presença de insuficiência renal;

- a expressão da molécula de ativação HLA-DR em linfócitos B foi semelhante entre os grupos estudados e identificou-se redução do percentual de linfócitos B ativados (Células CD19⁺CD23⁺) no grupo de portadores de hepatite C crônica e doença renal associada.

C. Sobre a expressão dos marcadores de regulação da resposta imune em leucócitos circulantes:

- encontrou-se diferença significativa na expressão de receptores de imunoglobulinas em células da imunidade inata, de forma particular e diversificada em cada grupo, não estabelecendo um perfil definido;
- não se observou diferença na frequência de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) e na expressão de CD32 (FcγRII) em linfócitos B nos grupos de pacientes portadores de hepatite C crônica, com e sem insuficiência renal crônica associada.

D. Com referência à expressão dos receptores de quimiocinas:

- o grupo de portadores de hepatite C crônica com função renal preservada apresentou, de forma exclusiva, aumento da expressão de CXCR3 (quimiocina do tipo 1) em linfócitos T auxiliares e redução da expressão de CCR3 (quimiocina do tipo 2);
- observou-se redução, de forma global, da expressão de receptores de quimiocinas nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no grupo de portadores de infecção crônica pelo vírus C e insuficiência renal crônica, em especial CXCR3 e CXCR4 (quimiocinas para linfócitos).

E. Sobre as análises de correlação realizadas entre os parâmetros fenotípicos abordados no estudo e as variáveis epidemiológicas, laboratoriais e histológicas:

- o grupo de portadores de hepatite C crônica e função renal preservada apresentou correlação inversa entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células CD8⁺HLA-DR⁺) e a carga viral (PCR quantitativo). Foi identificada,

neste grupo, correlação positiva entre as células CD8⁺ que expressam a quimiocina CXCR3⁺ (efetora de quimiotaxia para linfócitos ativados) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados periféricos (células CD8⁺HLA-DR⁺) e entre o percentual de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) e o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células CD4⁺HLA-DR⁺);

- demonstrou-se correlação positiva, no grupo de portadores de hepatite C crônica e insuficiência renal, entre o percentual de monócitos pró-inflamatórios (células CD16⁺CD14⁺DR⁺⁺) e o percentual de linfócitos B (células CD19⁺) do sangue periférico. Correlação inversa entre o percentual de linfócitos T auxiliares ativados (células CD4⁺HLA-DR⁺) periféricos, como também, entre o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células CD8⁺HLA-DR⁺) e ALT foi demonstrada somente nesse grupo. Foi identificada, também, correlação inversa entre o percentual de células T reguladoras (CD4⁺CD25^{HIGH}) e o percentual de linfócitos T citotóxicos ativados (células CD8⁺HLA-DR⁺) periféricos.

CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO:

1. Os distintos padrões específicos da resposta imune observados nesta investigação contribuem para a maior compreensão das diferenças na apresentação e evolução da hepatite C crônica em indivíduos com e sem doença renal avançada;
2. Esta pesquisa apoia o estudo de marcadores séricos não invasivos de inflamação e de resposta terapêutica em grupos distintos de indivíduos infectados pelo vírus C, através de imunofenotipagem, haja vista que existe correlação entre fenótipos celulares, inflamação e lesão histológica hepática, corroborando com os estudos dessa linha;
3. Estimula futuras pesquisas, abordando aspectos funcionais, tais como o estudo do perfil de citocinas, contribuindo para um melhor e mais abrangente entendimento da resposta imune nestes grupos particulares, além da análise comparativa dos parâmetros fenotípicos no compartimento hepático;
4. Demonstra que a hepatite C crônica é uma doença individualizada e complexa, em relação à resposta imunológica, e que assim também deverá ser o futuro da terapêutica;
5. Como abordagem ampla da resposta imune, pode contribuir para futura identificação de pontos críticos da imunopatogenia, relativos à implementação de agentes terapêuticos e de vacinas;
6. Trata-se de uma análise abrangente e pioneira da resposta imune, que, conseqüentemente, abriu caminhos para diversos projetos em nosso grupo, com o propósito de uma melhor elucidação sobre os resultados obtidos;
7. Ressalta-se que a revisão literatura, realizada para esta investigação, resultou em um capítulo sobre resposta imune na hepatite C. Uma análise parcial deste estudo foi selecionada para apresentação no Congresso da EASL-2007 na Espanha, sendo o resumo publicado no periódico Journal of Hepatology;

8. Este trabalho foi vencedor do Prêmio “Luiz Carlos da Costa Gayotto” – melhor trabalho de pesquisa em área básica, no XIX Congresso Brasileiro de Hepatologia, sendo, automaticamente, o resumo expandido aceito para publicação na GED – Revista de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LITCHTMAN, A.D.; POBER, J.S. Immunity to viruses. In: ABBAS, A.K.; LITCHTMAN, A.D. Cellular and molecular immunology. 4 ed. W.B. Philadelphia: Saunders Company.2000.Cap.35. p.352-354.

ALTER, H.J.; SEEF, L.B. Recovery, persistence and sequelae in hepatitis C virus infection: a prospective on long-term outcome. Semin Liver Dis, 20:17-35, 2000.

APOLINARIO, A.; MAJANO, P.L.; ALVAREZ-PÉREZ, E. *et al.* Increased expresion of T cell chemokines and their receptors in chronic hepatitis C: relashionship with the histological activity of liver disease. Am J Gastroenterol, 97: 2862-70, 2002.

ARAI, H. E.; CHARO, I. F. Differential regulation of G-protein-madiated signaling by chemokine receptors. J Bio Chem, 271:21814-19, 1996.

ASANZA, C.G.; GARCIA-MONZÓN, C.; CLEMENTE, G. *et al.* Imunnohistochemical evidence of immunopathogenetic mechanisms in chronic hepatitis C recurrence after liver transplantation. Hepatology, 26:755-763, 1997.

BACKSTROM, E.;KRISTENSOSON, K.; LJUNGGREN, H.-G. Activation of natural killer cells: underlying molecular mechanisms revealed. Scand J Immunol, 60:14-22, 2004.

BAECHER-ALLAN, C; BROWN, J.A.; FREEMAN, G.J.; HAFLER, D. A. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. J Immunol, 167:1245-53, 2001.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. Interleukin-8 and related chemotatic cytokines CXC and CC chemokines. Adv Immunol, 55:97-179, 1994.

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 with chronic hepatitis C. J Clin Invest, 95:2067-2075, 1995.

BANNER, B.F. ; ALLAN, C. ; SAVAS, L. *et al.* Inflammatory markers in chronic hepatitis C. Virchows Arch, 431:181-187, 1997.

BASSETT, S.E.; THOMAS, D.L.; BRASKY, K.M.; LANFORD, R. E. Viral persistence, antibody to E1 and E2, and hypervariable region 1 sequence stability in hepatitis C virus-inoculated chimpanzees. *J Virol*, 73:1118-26, 1999.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology*, 24: 289-93, 1996.

BELGE, K.U.; DAYYANI, F.; HORELT, A. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*, 168:3536-42, 2002.

BERTOLETTI, A.; D'ELIOS, M. M.; BONI, C. *et al.* Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic hepatitis B and C virus infections. *Gastroenterology*, 112:193-199, 1997.

BOLLACHI, F.; SINISTRO, A.; CIAPRINI, C. *et al.* Increased hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD4+ T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin Exp Immunol*, 144:88-96, 2006.

BOWEN, D.G.; McCAUGHAN, G.W.; BERTOLINO, P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol*, 26:512-17, 2005.

CABRERA, R.; TU, Z.; XU, Y. *et al.* An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 40:1062-71, 2004.

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* 24:6-9, 1996.

CACCOUB, P.; POYNARD, T.; GHILLANI, P. *et al.* Extrahepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C. *Arthritis Rheum*, 42:2204-12, 1999.

CALVINO, M.; BENITO, S.; PARRA, T. *et al.* Role of CCR5 and CXCR3 chemokine receptors expression on CD8+ cells during chronic hepatitis C infection. *J Hepatol*, 46: S170, 2007.

CARITHERS, R.L.Jr. Hepatitis C and renal failure. *Am J Med*, 107: 90S-94S, 1999.

CARRACEDO, J.; RAMÍREZ, R.; MADUEÑO, J.A. *et al.* Cell apoptosis and hemodialysis-induced inflammation. *Kidney Int*, 80:89-93, 2002.

CHENEY, C. P.; CHOPRA, S.; GRAHAM, C. Hepatitis C. Clin Infect Dis, 14: 633-667, 2000.

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, 244:359-362, 1989.

CLARK-LEWIS, I.; KIM, K. S.; RAJARATHNAM, K. *et al.* Structure-activity relationships of chemokines. J Leukoc Biol, 57:703-11, 1995.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T.A.; TURNER, S.C. *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood, 97: 3146-51, 2001.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol, 22:633-40, 2001.

CROTTA, S.; STILLA, A.; WACK, A. *et al.* Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major C virus envelope protein. J Exp Med, 195: 35-41, 2002.

DARLING, J. M.; WRIGHT, T.L. Immune responses in hepatitis C: is virus or host the problem? Curr Opin Infect Dis, 17: 193-98, 2004.

Di BISCEGLIE, A.M.; GOODMAN, Z.D.; ISHAK, K.G. *et al.* Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis. Hepatology, 14: 969-74, 1991.

DATZ, C.; CRAMP, M.; HAAS, T. *et al.* The natural course of hepatitis virus infection 18 years after an epidemic outbreak of non-A, non-B hepatitis in a plasmapheresis centre. Gut, 44: 563-7, 1999.

DIECKMANN, D.; PLOTTNER, H.; BERCHTOLD, S. *et al.* Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med, 193:1303-10, 2001.

DOHERTY, D. G.; FARRELLY, C. O. Innate and adaptative lymphoid cells in the human liver. Immunol Rev, 174: 5-20, 2000.

DOTTA, M. A.; CHEQUER, H.; PEREIRA, J. P. M. *et al.* Métodos molecular e imunológico no diagnóstico de hepatite C em pacientes em hemodiálise. J Bras Nefrol, 25: 86-94, 2003.

EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus statement. J. Hepatol, 30:956-961, 1999.

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, 30: 526-530, 1999.

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, 292:767-770, 1975.

FOCACCIA, R.; DA CONCEIÇÃO, O. J.; SETTE Jr. H., *et al.* Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serological survey of a stratified, randomized and residence-based population. Braz J Infect Dis, 2:269-84, 1998.

FOXMAN, E.F.; CAMPBELL, J. J.; BUTCHER, E. C. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. J Cell Biol, 139:1349-60, 1997.

FREEMAN, A. J.; DORE, G.J.; LAW, M.G. *et al.* Estimating progression to cirrhosis in chronic hepatitis C virus infection. Hepatology, 34: 809-16, 2001.

FREEMANN, A. J.; MARINOS, G.; FFRENCH, R. A. *et al.* Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection, Immunology and Cell biology, 79: 515-36, 2001.

FUKUDA, R.; ISHIMURA, N.; ISHIHARA, S. *et al.* Intrahepatic expression of pro-inflammatory cytokine mRNAs and interferon efficacy in chronic hepatitis C. Liver, 16:390-399, 1996.

GADDY, J.; BROXMEYER, H. E. Cord blood CD16+56- cells with low lytic activity are possible precursors of mature natural killer cells. Cell Immunol, 180:132-142, 1997.

GAO, J. L.; WYNN, T. A.; CHANG, Y. *et al.* Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. J Exp Med, 185:1959-68, 1997.

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, 117:933-941, 1999.

GLUCK, T.; SEELIG, R.; DETTE, S. *et al.* Parameters predicting response to alpha-interferon treatment in chronic hepatitis C. *Hepatogastroenterology*, 14:484-491, 1997.

GODFREY, D. I.; HAMMOND, K. J.; POULTON, L. D. *et al.* NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today*, 21:573-83, 2000.

GOLDEN-MASON, L.; ROSEN, H. R. Natural Killer cells: primary target for hepatitis C virus immune evasion strategies? *Liver Transplantation*, 12:363-372, 2006.

GORDON, S. C.; ELLOWAY, R. S.; LONG, J. C. *et al.* The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission: blood transfusion vs. intravenous drug use. *Hepatology*, 14:969-74, 1991.

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 Dis*, 181:1528-1536, 2000.

GUMBER, S. C.; CHOPRA, S. C. Hepatitis C: a multifaced disease. Review of extrahepatic manifestations. *Ann Intern Med*, 123:615 –20, 1995.

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*, 32:837-842, 2000.

HERRINE, S. Controversial Issues in HCV. In: *Gastroenterology Conference Summaries*. American Association for the Study of Liver Diseases. Dallas. 50th Annual Meeting, 1999.

HINRICHSSEN, H.; LEIMENSTOLL, G.; STEGEN, G. *et al.* Prevalence and risk factors of hepatitis C virus infection in haemodialysis patients: a multicentre study in 2796 patients. *Gut*, 51: 429-33, 2002.

HINO, K.; SAINOKAMI, S.; SHIMODA, K. *et al.* Clinical course of acute hepatitis C and changes in HCV markers. *Dig Dis. Sci*, 39:19-27, 1994.

HOUGHTON, M. Hepatitis C viruses. In: *FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., et al. Fields Virology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. Cap. 32, p.1035-1058.

HOWARD, O.M.; BEM-BARUCH, A.; OPPENHEIM, J. J. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol*, 14:46-51, 1991.

ISAGULIANTS, M. G. Hepatitis C virus clearance: the enigma of failure despite an impeccable survival strategy. *Curr Pharm Biotechnol*, 4:169-83, 2003.

ISAGULIANTS, M. G.; OZERETSKOVSKA, Y. A. N. N. Host background factors contributing to hepatitis C virus clearance. *Curr Pharm Biotechnol*, 4: 185-93, 2003.

JIANG, Y.; BELLER, D. I.; FRENDEL, G. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*, 148:2423-28, 1992.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; STASSEN, M. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193:1285-94, 2001.

KELNER, G. S.; KENNEDY, J.; BACON, K. B. *et al.* Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science*, 266:1395-99, 1994.

KENNY-WALSH, E. The natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis*, 5:969-77, 2001.

KIM, W. R. The burden of hepatitis C in the United States. *Hepatology*, 36: S30-S34, 2002.

KIYOSAWA, K.; SODEYAMA, T.; TANAKA, E. *et al.* Interrelationship of blood transfusion, non-A, non-B hepatitis and hepatocellular carcinoma: analysis by detection of antibody to hepatitis C virus. *Hepatology*, 12:671-5, 1990.

KNODELL, R. G.; CONRAD, M. E.; DIENSTAG, J. L. *et al.* Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology*, 69:1278-1285, 1975.

KORETZ, R. L.; BREZINA, M.; POLITO, A. J. *et al.* Non-A, non-B posttransfusion hepatitis: comparing C and non-C hepatitis. *Hepatology*, 17:361-5, 1993.

KOZIEL, M. J. Cytokines in viral hepatitis. *Semin Liver Dis*, 19:157-169, 1999.

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*, 240:362-364, 1989.

KUZUSHITA, N.; HAYASHI, N.; MORIBE, T. *et al.* Influence of HLA haplotypes on the clinical courses of individuals infected with hepatitis C virus. *Hepatology*, 27:240-244, 1998.

KYONG-MI, C. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. Clin Liver Dis, 7: 89-105, 2003.

LARREA, E.; Garcia, N.; Qian, C. *et al.* Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. Hepatology, 23: 210-217, 1996.

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, 28:815-822, 1998.

LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol, 14: 233-58, 1996.

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, 24:790-795, 1996.

LIBETTA, C.; RAMPINO, T.; DALCANTON, A. Polarization of T-helper lymphocytes toward the Th2 phenotype in uremic patients. Am J Kidney Dis, 38:286-95, 2001.

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 USA, 87:5031-5035, 1990.

LOGVINOFF, C.; MAJOR, M.E.; OLDACH, D. *et al.* Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci USA, 101:10149-54, 2004.

MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. Hepatology, 36:S47-56, 2002

MARROGI, A. J.; CHELES, M. K.; GERBER, M. A. Chronic hepatitis C. Analysis of host immune response by immunohistochemistry. Arch Pathol Lab Med, 119:232-7, 1995.

MARTINS, M. A. Estudo da Resposta Imune Celular Desencadeada pela Vacina Anti-amarílica 17DD. 2005. 119f. Projeto de Dissertação (Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia) - Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

MARTINS-FILHO, O. A. Course on flow cytometry. XXV Meeting of the Brazilian Society of Immunology. Florianópolis, 2000.

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, G. C. Hepatite C – Aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. 1 ed. W.B. Belo Horizonte: COOPMED e FIOCRUZ EDITORA.2005.Cap.4. p.31-40.

MEYERS, C. M.; SEEFF, L. B.; STEHMAN-BREEN, C. O. Hepatitis C and Renal Disease: An Update. *Am J Kidney Dis*, 42:631-57, 2003.

NAKAYAMA, E.; AKIBA, T.; RUMO, F. *et al.* Prognosis of anti-hepatitis C vírus antibody-positive on regular hemodialysis therapy. *J Am Soc Nephrol*, 11:1896-1902, 2000.

NIH. National Institutes of Health Consensus Development Conference Management of Hepatitis C. American Association for the Study the Liver Diseases. *Hepatology*, vol. 36. n.5. 2002.

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*, 31:612-617, 1999.

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*, 28: 225-230, 1998.

NIEDERAU, C.; LANGE, S.; HEINTGES, T. *et al.* Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study. *Hepatology*, 28:1687-95, 1998.

MANGIA, A.; GENTILE, R.; CASCIVILLA, I. *et al.* HLA class II favors clearance of HCV infection and progression of the chronic liver damage. *J Hepatol*, 30:984-989, 1999.

MUTA, T.; KUROSAKI, T.; MISULOVIN, Z. *et al.* A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, 369:340, 1994.

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 Immunol*, 57: 703-710, 1997.

PERNOLLET, M.; JOUVIN-MRCHE, E.; LEROY, V. *et al.* Simultaneous evaluation of lymphocyte subpopulation in teh liver and in peripheral blood mononuclear cells of HCV-infected patients: relationship with histological lesions. *Clin Exp Immunol*, 130: 518-25, 2002.

POYNARD, T.; BEDOSSA, P.; OPOLON, P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. *Lancet*, 349:825-32, 1997.

PAPATHEODORIDIS, 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*, 30:731-738, 1999.

PERTOSA, G.; GRANDALIANO, G.; GESUALDO, L. *et al.* Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int*, 76:S104-11, 2000.

POORDAD, F. F.; FABRIZI, F.; MARTIN, P. Hepatitis C infection associated with renal disease and chronic renal failure. *Seminars in Liver Disease*, 24: 69-77, 2004.

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*, 7875:241-246, 1974.

PYBUS, O. G.; CHARLESTON, M. A.; GUPTA, S. *et al.* The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science*, 292:2323-5, 2001.

RAVETCH, J. V.; LUSTER, A. D.; WEINSHANK, R. *et al.* Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science*, 234(4777):718-25, 1986.

RELATÓRIO DO GRUPO DE ESTUDOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Epidemiologia da infecção pelo vírus da hepatite C no Brasil. In: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Crônica C, Ministério da Saúde, 2002.

REHERMANN, B.; CHANG, K. M.; MCHUTCHINSON, J. *et al.* Differential cytotoxic T-lymphocyte responsiveness to the hepatitis BC viruses in chronically infected patients. *J Virol*, 70: 7092-102, 1996.

ROBERTSON, M.J.; RITZ, J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*, 76:2421-38, 1990.

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*, 42:51-55, 1996.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*, 182:18-32, 2001.

SALLLUUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A; MACKAY, CR. Chemokines and chemokines receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol. Today*, 19:568-74, 1998.

SATHLER-AVELAR, R.; LEMOS, E. M.; MARTINS-FILHO, O. A. *et al.* Phenotypic Features of Peripheral Blood Leucocytes During Early Stages of Human Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol*, 58:655-663, 2003.

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*, 162:6681-6689, 1999.

SEEFF, L. B. Why is there such difficulty in defining the natural history of hepatitis C? *Transfusion*, 40:1161-4, 2000.

SEEFF, L. B.; HOLLINGER, F. B.; ALTER, H. J. *et al.* Long –term mortality and morbidity of transfusion-associated nonA-non-B and type C hepatitis: a National Heart, Lung, and Blood Institute collaborative study. *Hepatology*, 33:455-63, 2001.

SILVA, A. O. Hepatite Viral C. 1 ed. São Paulo: Pizarro Farmacêutica, 2001.

SILVA, C. L. Clivagem in vitro do receptor FCyRIII na superfície de leucócitos humanos: uma nova abordagem para o diagnóstico da Doença de Chagas (Monografia). Biociências - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 1999.

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 Gen Virol*, 74:661-668, 1993.

SKRZECZYNSKA, J.; KOBYLARZ, K.; HARTWICH, Z. *et al.* CD14+CD16+ monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol*, 55:629-38, 2002.

STRADER, D. B.; WRIGHT, T.; THOMAS, D. L. *et al.* AASLD practice guidelines: Diagnosis Management and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology*, 39:1147-71, 2004.

STRAUSS-AYALI, D.; CONRAD, S. M.; MOSSER, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection, *J Leukoc Biol*, 82:244–252, 2007.

SUGIMOTO, K.; IKEDA, F.; STADANLICK, J. *et al.* Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex-vivo in persistent HCV infection. *Hepatology*, 38:1437-48, 2003.

TAKEDA, K.; HAYAKAWA, Y.; VAN KAER, *et al.* Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Sci USA*, 97:5498-5503, 2000.

TALAL, A. H.; SHATA, M.T.; MARKATOU, M. *et al.* Virus Dynamics and Immune Response During Treatment Patients coinfectd with Hepatitis C and HIV. *J Acquir Immune Defic Synd*, 35:103-13, 2004.

TAAMS, L. S.; VUKMANOVIC-STEJIC, M.; SMITH, J. *et al.* Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol*, 32:1621-30, 2002.

SIXTY INTERNACIONAL SYMPOSIUM ON HEPATITIS C AND RELATED VÍRUS. The Scientific Challenge of Hepatitis C, *Science*, 285: 26-30, 1999.

THIMME, R.; BUKH, J.; SPANGENBERG, H. C. *et al.* Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:15661-15668, 2002.

TILG, H.; WILMER, A.; VOGEL, W. *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*, 103: 264-274, 1992.

TONG, M. J.; EL-FARRA, N. S.; REIKES, A. R. *et al.* Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. *N Engl J Med*, 332:1463-6, 1995.

TREMOLADA, F.; CASARIN, C.; ALBERTI, A. *et al.* Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) post-transfusion hepatitis. *J Hepatol*, 16:273-81, 1992.

TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet*, 24:1-8, 1997.

VALIANTE, N. M.; D' ANDREA, A.; CROTTA, S. *et al.* Life, activation and death of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C. *Immunol Rev*. 174: 77-89, 2000.

VAN DER POEL, C. L. Hepatitis C virus: into the fourth generation. *Vox Sang*, 67:95-98, 1994.

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*, 36: 271-7, 2002.

VIDIGAL, P.G.; GERMER, J. J.; ZEIN, N. N. Hepatocellular carcinoma in patients with HCV: an association with a polymorphism in the leader sequence of the transforming growth factor- β 1 gene. *Hepatology*, 32:265A, 2000.

VIERLING, J. M.; PETERS, M. G.; HOWELL, C. D. Acute and Chronic Liver Diseases: Immunologic Mechanisms and Therapy. AASLD Pos-graduate Course conference, 2005.

VILLANO, S. A.; VLAHOV, D.; NELSON, K.E. *et al.* Persistence of viremia and the importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology*, 29:908-14, 1999.

VOGEL, L.A.; LESTER, T. L.; VAN CLEAVE, V.H. *et al.* Inhibition of murine B1 lymphocytes by interleukin-12. *Eur J Immunol*, 26:219-23, 1996.

WALLACE, P.K.; HOWELL, A. L.; FANGER, M. W. Role of Fc gamma receptors in cancer and infectious disease. *J Leukoc Biol*, 55:816-26, 1994.

WOITAS, R. P.; LECHMANN, M.; JUNG, G. *et al.* CD30 induction and cytokine profiles in hepatitis C virus core-specific peripheral blood T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 159: 1012-1018, 1997.

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*, 30:995-1003, 1999.

YOON, J.W.; GOLLAPUDI, S.; PAHL, M.V. *et al.* Naïve and central memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int*, 70:371-6, 2006.

ZAOU, P.; HAKIM, R. M. The effects of the dialysis membrane on cytokine release. *J Am Soc Nephrol*, 9:1711-8, 1994.

ZIEGLE-HEITBROCK, H. W. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD4+CD16+ subpopulation. *Immunol Today*, 17: 424-8, 1996.

8. ANEXOS:

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DOADORES DE SANGUE

1. Identificação do paciente:

Nome: _____ IDsoro: _____

Sexo: 0=Feminino 1=masculino

Cor: 0= Branca 1=não Branca

Idade: _____ DN: ____/____/____

2. HB:

3. Sorologia para hepatites

HbsAg	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBc total	0=Negativo	1=Positivo
Anti- HCV	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HIV	0=Negativo	1=Positivo

4. Etilismo: _____g/dia etanol

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES PORTADORES DE IRC

Identificação do paciente:

Nome: _____ IDsoro: _____

Sexo: 0=Feminino 1=masculino

Cor: 0= Branca 1= não Branca

Idade: _____ DN: ____/____/____

1. Informações sobre a IRC e hemodiálise

Tempo de diagnóstico IRC(anos): _____ Causa da IRC: _____

Tempo de hemodiálise (anos): _____

2. Número de transfusões sanguíneas (meses) _____ Tempo: _____

3. ALT: _____ g/dl - N____ AST: _____ g/dl - N____

4. Etilismo: _____g/dia etanol

5. Sorologia:

HbsAg	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBc total	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBS	0=Negativo	1=Positivo
Anti- HCV	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HIV	0=Negativo	1=Positivo

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA

Identificação do paciente:

Nome: _____ IDsoro: _____

Sexo: 0=Feminino 1=masculino

Cor: 0= Branca 1=não Branca

Idade: _____ DN: ____/____/____

1. Identificação epidemiológica

Fatores de risco para o HCV:

1. Transfusão sanguínea 2. Tatuagens 3. Droga Injetável 4. Acidente biológico

5. Promiscuidade sexual 6. Cirurgia 7. Não identificado

8. Outros: _____

Tempo diagnóstico (anos): Epidemiológico: _____ da doença Hepatite C: _____

Etilismo: _____g/dia etanol

2. ALT: _____g/dl - _____ X LSN

3. AST: _____g/dl - _____ X LSN

4. Sorologia:

HbsAg	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBc total	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBS	0=Negativo	1=Positivo
Anti- HCV	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HIV	0=Negativo	1=Positivo

5. Diagnóstico Molecular do HCV:

Genótipo: _____

Data: _____ PCR qualitativo: 0=Negativo 1=Positivo

Data: _____ PCR quantitativo: _____UI/ml

6. Histologia: A____ F____

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA DE PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA e IRC

Identificação do paciente:

Nome: _____ IDsoro: _____

Sexo: 0=Feminino 1=masculino
Cor: 0= Branca 1=não Branca

Idade: _____ DN: ____/____/____

1. Identificação epidemiológica

Fatores de risco para o HCV:

1. Transusão sanguínea
2. Tatuagens
3. Droga Injetável
4. Acidente biológico
5. Promiscuidade sexual
6. Cirurgia
7. Não identificado
8. Outros: _____

Tempo diagnóstico(anos): Epidemiológico: _____ da doença Hepatite C: _____

Etilismo: _____g/dia etanol

2. Informações sobre a IRC e hemodiálise

Tempo de diagnóstico IRC (anos): _____ Causa da IRC: _____

Tempo de hemodiálise (anos): _____

3. Número de transfusões sanguíneas: _____ **Tempo(anos):** _____

4. ALT: _____ - _____ X LSN

5. AST: _____ - _____ X LSN

6. Sorologia para hepatites

HbsAg	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBc total	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HBS	0=Negativo	1=Positivo
Anti- HCV	0=Negativo	1=Positivo
Anti-HIV	0=Negativo	1=Positivo

7. Diagnóstico Molecular do HCV:

Genótipo: _____

Data: _____ PCR qualitativo: 0=Negativo 1=Positivo

Data: _____ PCR quantitativo: _____ UI/ml

8. Histologia: A____ F____

Avaliação De Parâmetros Fenotípicos Celulares de Leucócitos do Sangue Periférico em Indivíduos Cronicamente 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 dos portadores desta infecção pelo vírus da hepatite C e as diferentes formas de apresentação desta doença, comparando-os com indivíduos saudáveis. 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 (5 mL) colhida em uma veia do seu braço por um profissional treinado. O sangue colhido será usado exclusivamente para os exames propostos nesta pesquisa.

Faremos o máximo para minimizar os riscos e desconfortos (dor e manchas arroxeadas no local da punção). Todos os dados coletados são sigilosos. Você poderá tirar as dúvidas a respeito desse estudo em qualquer momento no decorrer da pesquisa. Os dados encontrados no estudo serão informados para você 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 o Dra. Kátia Barbosa pelo telefone (031) 3248-9820. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em pesquisa do HEMOMINAS, que a aprovou.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

_____ (_ _ _)

Paciente

Pesquisador Responsável

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2004

Avaliação De Parâmetros Fenotípicos Celulares de Leucócitos do Sangue Periférico em Indivíduos Cronicamente 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 Hepatites do Instituto Alfa de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas por ser portador do vírus da hepatite C.

O objetivo deste estudo é analisar a resposta do seu organismo a infecção por este vírus 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 (5mL) colhida em uma veia do seu braço por um profissional treinado. O sangue colhido será usado exclusivamente para os exames propostos nesta pesquisa. Iremos também consultar os dados de seu prontuário e você responderá a um questionário durante a entrevista médica.

Faremos o máximo para minimizar os riscos e desconfortos (dor e manchas arroxeadas no local da punção). Todos os dados coletados são sigilosos. Você poderá tirar as dúvidas a respeito desse estudo em qualquer momento no decorrer da pesquisa. Os dados encontrados no estudo serão informados para você 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 o Dr. Kátia Barbosa pelo telefone (031) 3248-9820. Caso tenha dúvidas sobre o aspecto ético ou o andamento da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em pesquisa da UFMG.

Eu, _____, concordo em participar do estudo.

_____ (_ _ _)

Paciente

Pesquisador Responsável

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2004

Avaliação De Parâmetros Fenotípicos Celulares de Leucócitos do Sangue Periférico em Indivíduos Cronicamente Infectados pelo Vírus da Hepatite C

Prezado(a) paciente,

Você foi convidado(a) para participar de uma pesquisa por ser portador de doença renal crônica e não apresentar hepatite B ou C. O objetivo deste estudo é analisar a resposta dos pacientes com doença renal crônica e portadores da infecção pelo vírus da hepatite C e as diferentes formas de apresentação desta doença, comparando-os com indivíduos saudáveis. 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 (5 mL) colhida em uma veia do seu braço por um profissional treinado. O sangue colhido será usado exclusivamente para os exames propostos nesta pesquisa. Este exame não lhe traz riscos, o material utilizado será descartável e a coleta será realizada por um técnico que tem experiência na realização deste procedimento. Você deve apresentar todas as suas dúvidas à coordenadora deste projeto ou à equipe médica do ambulatório. Você poderá abandonar o projeto, em qualquer época, sem qualquer prejuízo pois a sua assistência médica está assegurada mesmo que não participe deste projeto.

Faremos o máximo para minimizar os riscos e desconfortos (dor e manchas arroxeadas no local da punção). Todos os dados coletados são sigilosos. Você poderá tirar as dúvidas a respeito desse estudo em qualquer momento no decorrer da pesquisa. Os dados encontrados no estudo serão informados para você 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 o Dra. Kátia Barbosa pelo telefone (031) 3248-9820. 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

Belo Horizonte, ____ de _____ de 2004