**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

ROBERTA CHAVES ARAÚJO

**Papel do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) na infecção viral
e na gravidade da doença hepática de pacientes com hepatite C
crônica**

**Ribeirão Preto, SP
2018**

ROBERTA CHAVES ARAÚJO

Papel do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) na infecção viral e na gravidade da doença hepática de pacientes com hepatite C crônica

Versão Original

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli

Ribeirão Preto, SP

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Araújo, Roberta Chaves

Papel do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) na infecção viral e na gravidade da doença hepática de pacientes com hepatite C crônica. Ribeirão Preto, 2018.

112 p. : il. ; 30 cm

Tese (Doutorado em Clínica Médica) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Orientador: Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli

1. HCV. 2. Hepatite C crônica. 3. HLA-E. 4. Atividade inflamatória. 5. Fibrose hepática.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: ARAÚJO, Roberta Chaves

Título: Papel do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) na infecção viral e na gravidade da doença hepática de pacientes com hepatite C crônica

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Clínica Médica.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este importante passo da minha carreira profissional a três pessoas muito especiais que, com dedicação singular, sempre estiveram presentes, propiciando-me o suporte necessário para a construção desta tese: meu marido **Túlio** e meus pais, **Roberto e Maria Helena.**

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli, o meu profundo reconhecimento de uma excelente profissional que me ofertou todas as oportunidades de aprendizado, guiando-me para meu aprimoramento profissional e pessoal. Meus sinceros agradecimentos pela atenção, paciência, generosidade e ensinamentos na orientação desta tese.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Donadi, pelo exemplo de professor e pesquisador. Agradeço pelo apoio e dedicação na concretização deste trabalho.

Foi um privilégio contar com os ensinamentos valiosos de dois Mestres na condução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela saúde, pelas oportunidades, por me guiar em um caminho rodeado de pessoas especiais, muitas das quais citadas nesta tese.

À minha **família** e **amigos**, pelo carinho e apoio constante. Serei eternamente grata a todos.

À **Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho**, pela disponibilidade, contribuição e dedicação na revisão e leitura das lâminas.

Ao **Prof. Dr. Celso Teixeira Mendes Júnior**, pelos préstimos nas análises estatísticas e pela disposição em ajudar sempre que solicitado.

Ao **Prof. Dr. Érick C. Castelli**, pela colaboração com parte dos dados do grupo controle.

Aos **funcionários** do Laboratório de Biologia Molecular, do Laboratório de Gastroenterologia e do Laboratório do Departamento de Patologia, em especial **Sandra Rodrigues, Flavia Almeida e Deisy Mara**, cujos trabalhos foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao **Dr. Fabrício César Dias**, pela orientação e pelo auxílio no sequenciamento genético.

À **Bruna Bertol** e **Guilherme Debortoli**, pela gentil assistência nos procedimentos de laboratório e nas análises dos resultados. O apoio de vocês foi essencial para condução desta pesquisa.

Às amigas **Dra. Marcia Villanova, Profa. Dra. Fernanda Fernandes e Dra. Andreza C Teixeira**, pelos ensinamentos valiosos e pelo apoio incondicional que foram substanciais no decorrer desta caminhada.

À amiga **Patrícia Holanda Almeida** pelo prazer do convívio, durante a residência médica e na pós-graduação. Agradeço pelo companheirismo e pela amizade.

Aos **pacientes, médicos residentes, médicos assistentes e docentes** do Ambulatório de Hepatites do HCFMRP USP, pela colaboração na realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Brandt de Oliveira e Prof. Dr. Luiz Ernesto de Almeida Troncon**, pelos ensinamentos na minha formação em Gastroenterologia.

Os mais ricos não são os que têm mais, mas os que precisam de menos. As pessoas mais felizes não são as que têm o melhor de tudo, mas as que fazem o melhor de tudo com o que têm. Liberdade não é fazer o que se quer, mas querer o que se faz (Jean Paul Sartre). Eu acredito nessas coisas: sou rico, feliz e livre. Desejo-lhe o mesmo.
[Pedro Araújo Gontijo (*in memoriam*)]

RESUMO

Araújo, R.C. **Papel do antígeno leucocitário humano E (HLA-E) na infecção viral e na gravidade da doença hepática de pacientes com hepatite C crônica.** 2018. 112f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é importante fator de risco para o desenvolvimento de cirrose hepática e de carcinoma hepatocelular. A evolução para formas mais graves está relacionada a fatores ligados ao vírus, ao hospedeiro e à resposta imune. O objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre os polimorfismos do gene *HLA-E*, a expressão da molécula HLA-E e a gravidade da doença hepática pelo HCV. Foram incluídos 112 pacientes com hepatite C crônica e avaliados parâmetros clínicos, bioquímicos e histológicos (esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática). A variabilidade do gene *HLA-E* foi avaliada por sequenciamento de Sanger, e a expressão hepática da molécula, por imunoistoquímica. Para comparação da expressão hepática da molécula HLA-E e da variabilidade do gene *HLA-E*, foram usados dois grupos controles de indivíduos sem hepatopatia da mesma região geográfica. A imunoistoquímica para HLA-E identificou expressão da molécula nos hepatócitos e nas células de Kupffer. A expressão de HLA-E em hepatócitos e células de Kupffer foi encontrada em 56,3% e 43,8% dos pacientes com HCV e em 20% e 10% nos controles ($P = 0,008$ e $0,02$), respectivamente. Foi identificado que o percentual de pacientes do sexo masculino, com expressão moderada de HLA-E em células de Kupffer, foi maior em relação aos pacientes do sexo feminino (22,8% x 7,3%; $P = 0,03$). As amostras de fígado classificadas como esteatose, atividade necroinflamatória e fibrose graves apresentaram maior grau de expressão de HLA-E em células de Kupffer e hepatócitos, com associação linear significativa. Na análise multivariada, as variáveis que influenciaram significativamente a gravidade da doença foram a expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, a idade avançada e o índice de massa corporal maior que 25. Foram identificados 14 haplótipos diferentes do gene *HLA-E*, quatro deles ainda não descritos na literatura. A frequência do alelo *HLA-E**01:01:01:03 foi menor no grupo de pacientes, quando comparada ao controle ($P = 0,0001$). O alelo *HLA-E**01:03:05 associou-se a maior probabilidade (OR = 4,69) de expressão da molécula HLA-E, na célula de Kupffer ($P = 0,046$). O genótipo TT do polimorfismo +424 T/C (rs1059510) associou-se a menor probabilidade (OR = 0,06) de expressão da molécula HLA-E, na célula de Kupffer, em relação à ausência de expressão ($P=0,009$), a menor probabilidade (OR = 0,22) de atividade inflamatória moderada/grave em relação à leve ($P = 0,047$) e esteve associado a menor probabilidade (OR = 0,17) de fibrose hepática moderada/grave em relação à fibrose leve ($P = 0,049$). Os resultados do presente estudo sugerem que a pesquisa de fatores imunogenéticos, como a expressão hepática da molécula HLA-E e a identificação da variabilidade genética do *HLA-E*, pode ter aplicabilidade no manejo clínico dos pacientes, uma vez que auxilia na discriminação daqueles com maior risco de atingir formas avançadas da hepatite C crônica.

Palavras-chaves: HCV. Hepatite C crônica. HLA-E. Atividade inflamatória. Fibrose hepática.

ABSTRACT

Araújo, R.C. **Role of human leukocyte antigen E (HLA-E) in viral infection and severity of liver disease in patients with chronic hepatitis C.** 2018. 112f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Chronic hepatitis C is an important risk factor for the development of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The severity of liver disease can be influenced by factors related to the virus, the host and the immune response. The aim of this study was to evaluate the association between *HLA-E* gene polymorphisms, HLA-E molecule expression and HCV liver disease severity. We included 112 patients with chronic hepatitis C and evaluated clinical, biochemical and histological parameters (steatosis, inflammatory activity and liver fibrosis). The variability of the *HLA-E* gene was assessed by Sanger sequencing and liver HLA-E expression by immunohistochemistry. Two control groups of individuals without hepatopathy from the same geographical region were used to compare the HLA-E expression and the gene variability. Immunohistochemistry for HLA-E showed positivity in hepatocyte and Kupffer cell. HLA-E positivity in hepatocytes and Kupffer cells were found in 56.3% and 43.8% of HCV patients and in 20% and 10% in the controls ($P = 0.008$ and 0.02), respectively. We found that the percentage of male patients with moderate HLA-E expression in Kupffer cells was higher than in females (22.8% vs. 7.3%, $P = 0.03$). The liver samples classified as severe fibrosis, necroinflammatory activity and steatosis presented greater expression of HLA-E on Kupffer cells and hepatocytes. There was a positive linear association between HLA-E expression and severity of liver damage ($P < 0.05$). In the multivariate analysis, the variables that significantly influenced the severity of the disease were HLA-E molecule expression in hepatocytes, advanced age and body mass index greater than 25. Fourteen different *HLA-E* haplotypes were identified, four of them not yet described in the literature. The frequency of the *HLA-E* * 01: 01: 01: 03 allele was lower in the group of patients than in the control group ($P = 0.0001$). The *HLA-E* * 01: 03: 05 allele was associated with increased likelihood (OR = 4.69) of HLA-E expression in the Kupffer cell ($P = 0.046$). The TT genotype of the +424 T / C polymorphism (rs1059510) was associated with a lower probability (OR = 0.06) of HLA-E expression in the Kupffer cell in relation to the absence of its expression ($P = 0.009$), was associated with a lower probability (OR=0,22) of moderate/severe necroinflammatory activity in relation to the mild inflammatory activity ($P=0,047$) and was associated with a lower probability (OR = 0.17) of moderate / severe hepatic fibrosis in relation to mild fibrosis ($P = 0.049$). The results of the present study suggest that the study for immunogenic factors such as HLA-E liver expression and the identification of certain polymorphisms and alleles of the *HLA-E* gene may have applicability in the clinical management of patients since it aids in discrimination of those at greatest risk of reaching advanced forms of chronic hepatitis C.

Key words: HCV. Chronic hepatitis C. HLA-E. Necroinflammatory activity. Liver fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxa de detecção de hepatite C no Brasil de 2003 a 2016, de acordo com a região de origem dos indivíduos infectados	24
Figura 2	Proporção de casos de hepatite C segundo fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação no Brasil, de 2003 a 2016.....	25
Figura 3	Esquema do genoma do HCV.....	26
Figura 4	Organização e localização do complexo HLA no cromossomo 6 humano.....	33
Figura 5	Interação da molécula HLA-E com receptores da resposta imune inata e adaptativa.....	35
Figura 6	Nomenclatura padronizada do gene <i>HLA-E</i> de acordo com o <i>WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System</i>	36
Figura 7	Gel de agarose evidenciando produtos de amplificação (<i>amplicons</i>) obtidos na amplificação do gene <i>HLA-E</i>	51
Figura 8	Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=111), de acordo com os genótipos do vírus da hepatite C	58
Figura 9	Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de fibrose hepática.....	59
Figura 10	Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de atividade inflamatória no fígado...	59
Figura 11	Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de esteatose hepática.....	60
Figura 12	Imunoistoquímica para estudo da expressão da molécula HLA-E em amostras de tecido hepático de indivíduos do grupo controle e de pacientes com hepatite C crônica.....	61
Figura 13	Expressão da molécula HLA-E em hepatócitos e em células de Kupffer de amostra de tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica.....	61
Figura 14	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática.....	68

Figura 15	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática.....	69
Figura 16	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática.....	70
Figura 17	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática.....	71
Figura 18	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática.....	72
Figura 19	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores (<i>primers</i>) definidos para amplificação do gene <i>HLA-E</i>	49
Tabela 2	Iniciadores (<i>primers</i>) definidos para o sequenciamento do gene <i>HLA-E</i>	52
Tabela 3	Classificação histológica METAVIR para análise da fibrose e da atividade inflamatória hepática (Bedossa e Poynard, 1996).....	53
Tabela 4	Comparação da expressão da molécula HLA-E entre biópsias hepáticas de pacientes com HCV e de indivíduos do grupo controle.....	62
Tabela 5	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas.....	63
Tabela 6	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas.....	64
Tabela 7	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com o genótipo do HCV.....	65
Tabela 8	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a mediana de ALT e a média de Log HCV RNA	65
Tabela 9	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com o genótipo do HCV.....	66
Tabela 10	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a mediana de ALT e a média de Log HCV RNA	66
Tabela 11	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática.....	67
Tabela 12	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática.....	68

Tabela 13	Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática.....	69
Tabela 14	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática.....	71
Tabela 15	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática.....	72
Tabela 16	Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática.....	73
Tabela 17	Análise multivariada referente ao papel das variáveis que influenciaram o desenvolvimento da fibrose hepática avançada F3 + F4 (Bedossa e Poynard, 1996), em pacientes com hepatite C crônica.....	75
Tabela 18	Frequência dos haplótipos do gene <i>HLA-E</i> nos pacientes com hepatite C crônica e nos indivíduos controles.....	76
Tabela 19	Associação entre os polimorfismos do gene <i>HLA-E</i> e os achados histológicos esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.....	78
Tabela 20	Associação entre os haplótipos do gene <i>HLA-E</i> e os achados histológicos atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica.....	79

LISTA DE SÍMBOLOS E SINAIS

%	porcentagem
g	gramas
<i>g</i>	força g – unidade de aceleração
Kg	quilogramas
m	metros
m ²	metros quadrados
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitros
mM	milimol
NaOAc 3M	acetato de sódio
Ng	nanograma
°C	Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
UI	unidades internacionais
ul	microlitros
V	Volts
X ²	teste do Chi-quadrado

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
Anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
APC	célula apresentadora de antígenos
cDNA	DNA complementar
CEH	célula estrelada hepática
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	carcinoma hepatocelular
DAAs	antivirais de ação direta
DC	célula dendrítica
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	desvio-padrão
E1 e E2	proteínas do envelope do vírus da hepatite C
ECM	matriz extracelular
ER	retículo endoplasmático
HBV	vírus da hepatite B
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
HCV	vírus da hepatite C
HCV RNA	ácido ribonucleico do vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
IC	intervalo de confiança
IL	interleucina
IMC	índice de massa corporal
INF	interferon
IPD-IMGT	<i>International ImmunoGenetics</i>
KC	célula de Kupffer
KIRs	<i>killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
MHC	complexo de histocompatibilidade principal
NCR	receptores de citotoxicidade naturais

NK	<i>Natural Killer</i>
NCR	região não codificante
NKG2	<i>natural killer group 2</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
NTPase	nucleosídeo trifosfatase
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i>
Pb	pares de base
PBS	<i>phosphate buffer solution</i> – tampão fosfato salino
PCR	reação de polimerase em cadeia
RNA	ácido ribonucleico
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPM	rotação por minuto
SNPs	<i>single nucleotide polymorphisms</i> - polimorfismos de nucleotídeo único
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	receptor de células T
TNF	fator de necrose tumoral
UTR	<i>untranslated region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	O vírus da hepatite C.....	23
1.1.1	Epidemiologia do vírus da hepatite C	23
1.1.2	Vias de transmissão do vírus da hepatite C.....	24
1.1.3	Estrutura do vírus da hepatite C.....	26
1.2	História natural da infecção pelo vírus da hepatite C.....	27
1.3	Resposta imunológica na infecção crônica pelo HCV.....	28
1.3.1	Resposta imune inata.....	29
1.3.2	Resposta imune adaptativa.....	31
1.4	Complexo principal de histocompatibilidade.....	32
1.4.1	Antígeno leucocitário humano E.....	33
1.5	Histologia hepática na infecção pelo vírus da hepatite C.....	37
2.	OBJETIVOS.....	40
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos.....	41
3.	PACIENTES E MÉTODOS.....	42
3.1	Desenho do estudo.....	43
3.2	Pacientes.....	43
3.3	Crítérios de exclusão.....	44
3.4	Seleção dos pacientes.....	44
3.4.1	Grupo de pacientes.....	44
3.4.2	Grupo controle.....	45
3.5	Métodos.....	46
3.5.1	Avaliação bioquímica.....	46
3.5.2	Biologia molecular do vírus da hepatite C.....	46
3.5.3	Expressão proteica de HLA-E em biópsias hepáticas.....	47
3.5.4	Processamento das amostras biológicas para determinação dos polimorfismos.....	48
3.5.5	Tipificação do gene <i>HLA-E</i>	49
3.5.6	Avaliação histológica do fígado.....	53
3.6	Tratamento dos dados e análise estatística.....	54
4.	RESULTADOS.....	56
4.1	Características da população.....	57
4.1.1	Características gerais dos pacientes.....	57
4.1.2	Características laboratoriais dos pacientes.....	58
4.1.3	Características histológicas.....	58
4.2	Expressão hepática da molécula HLA-E.....	60
4.2.1	Características gerais.....	60
4.2.2	Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis clínico-demográficas.....	63
4.2.3	Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis laboratoriais	64
4.2.4	Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis histológicas.....	67

4.3	Análise multivariada	74
4.4	Variabilidade do gene <i>HLA-E</i> em pacientes e em indivíduos controles	75
4.5	Associação entre a variabilidade do gene <i>HLA-E</i> e a expressão hepática da molécula HLA-E	76
4.6	Associação entre a variabilidade do gene <i>HLA-E</i> e a gravidade da doença hepática.....	77
5.	DISCUSSÃO.....	80
6.	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICES	100
	ANEXOS.....	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite C

1.1.1 Epidemiologia do vírus da hepatite C

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é uma das principais causas de doença hepática crônica no mundo e constitui um importante problema de saúde pública. A hepatite C é a principal causa de transplante hepático em países desenvolvidos, e estimativas indicam que complicações decorrentes da infecção crônica pelo HCV, como cirrose descompensada e/ou carcinoma hepatocelular (CHC), devem aumentar até 2030. Atualmente, no Brasil, os óbitos por hepatite C representam a maior causa de morte entre as hepatites virais (DAVIS et al., 2010; AKAMATSU; SUGAWARA, 2012; BRASIL, 2017a).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 71 milhões de pessoas vivem com a infecção crônica pelo HCV. Em 2015, a prevalência global de infecção pelo HCV foi de 1,0%. A região do Mediterrâneo oriental teve a maior prevalência (2,3%), seguida da Europa (1,5%) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Segundo o Ministério da Saúde, de 1999 a 2016, foram detectados no Brasil 155.032 casos de indivíduos que apresentaram anticorpo contra o HCV (anti-HCV) e carga viral (ácido ribonucleico do vírus C - HCV RNA) detectáveis. Na análise de distribuição desses casos por regiões, a maior parte dos casos ocorreu nas regiões Sul e Sudeste (Figura 1). Em 2016, as maiores taxas de detecção foram observadas, em ambos os sexos, na faixa etária de 55 a 59 anos, chegando a 46,6 casos por 100 mil habitantes para os homens e 33,7 para as mulheres (razão de sexo masculino: feminino de 1,3) (BRASIL, 2017a).

Figura 1 – Taxa de detecção de hepatite C no Brasil de 2003 a 2016, de acordo com a região de origem dos indivíduos infectados

Nota: Até 2014, eram considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentavam ambos os testes anti-HCV e HCV RNA reagentes; em 2015, passaram a ser considerados casos confirmados de hepatite C aqueles que apresentam pelo menos um dos testes anti-HCV ou HCV RNA reagentes.
Fonte: Brasil (2017a).

1.1.2 Vias de transmissão do vírus da hepatite C

As vias de transmissão do HCV podem ser divididas em percutânea (transusão de sangue e inoculação com objeto perfurocortante) e não cutânea (contato sexual e exposição perinatal) (WEDEMEYER, 2016). Sua transmissão ocorre principalmente por via parenteral, por meio do contato com sangue contaminado (WANG; D'SOUZA; JACOBSON, 2016).

A transmissão sexual do HCV também é relatada de forma esporádica em alguns grupos populacionais. De forma geral, a transmissão sexual desse vírus é pouco eficiente e ocorre, sobretudo, em indivíduos com múltiplos parceiros e práticas sexuais de risco, sem uso de preservativo. Como em outras doenças de transmissão sexual, a presença de uma comorbidade, como a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), é um importante facilitador da transmissão. Há também a possibilidade de transmissão vertical, em menor proporção dos casos (BRASIL, 2017b).

No Brasil, a hepatite C teve como formas preferenciais de transmissão o

uso de drogas injetáveis (ilícitas e não ilícitas, como o uso de fortificantes injetáveis com material não descartável), a hemodiálise, a transfusão de sangue e hemoderivados e outros procedimentos médicos invasivos, sobretudo até o início dos anos de 1990 (PASSOS, 2008; SOUZA, 2011; BRASIL, 2017b). Atualmente, as pessoas que usam drogas, injetáveis ou inaláveis, ainda constituem um grupo de risco no Brasil, embora em número bem menor do que na Ásia, Europa e Estados Unidos. No entanto, a transmissão do vírus não se restringiu a esses grupos. Foram identificados outros mecanismos de transmissão: procedimentos de manicure e pedicure; *piercings* e tatuagens; tratamentos odontológicos; uso de seringas de vidro; endoscopia digestiva alta; e relações sexuais desprotegidas. A doença também encontrou oportunidade de propagação em populações que apresentam fatores adicionais de vulnerabilidade, como transtornos mentais e privação de liberdade (BRASIL, 2017b) .

A Figura 2 mostra as formas mais comuns de transmissão, nos casos notificados de hepatite C no Brasil, de 2003 a 2016.

Figura 2 – Proporção de casos de hepatite C segundo fonte ou mecanismo de infecção e ano de notificação no Brasil, de 2003 a 2016

Fonte: Brasil (2017a).

1.1.3 Estrutura do vírus da hepatite C

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, constitui o único membro do gênero *Hepacivirus* e foi identificado a partir de um *pool* de plasma de chimpanzés, previamente infectados com soros de pacientes com hepatite crônica não A não B (CHOO et al., 1989). Esse vírus possui um genoma de ácido ribonucleico (RNA), fita simples, com aproximadamente 9.600 nucleotídeos. Nessa sequência, observa-se uma fase de leitura aberta que codifica aproximadamente 3.000 aminoácidos que são processados durante e após a tradução de, pelo menos, dez proteínas, sendo três estruturais e sete não estruturais. O HCV possui ainda regiões não codificantes (NCR) nas extremidades 5' e 3', sendo que tais regiões são importantes no processo de replicação viral e de detecção dos diferentes genótipos. Na Figura 3, é mostrado o esquema do genoma do HCV (KAPLAN, 2015; WEDEMEYER, 2016).

Figura 3 – Esquema do genoma do HCV

C: core; E: envelope; NS: não estrutural; RNA: ácido ribonucleico

A partir do processamento da poliproteína precursora, são originadas as proteínas estruturais (*core*, envelope) e não estruturais (Figura 3). A função da proteína *core* ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que suprime genes celulares, pode participar na patogênese, quando há coinfeção com outros vírus (HIV e vírus da hepatite B – HBV), altera o metabolismo lipídico celular e suprime a apoptose. As proteínas do envelope (E1 e E2) estão envolvidas na replicação viral. As proteínas não estruturais estão envolvidas em reações na própria poliproteína (NS2 e NS4) e na replicação viral. A NS3 contém atividade de protease, RNA helicase e nucleosídeo trifosfatase (NTPase), as quais são essenciais para a replicação do vírus. A NS5B é uma RNA polimerase RNA-dependente, constituindo-se em uma enzima

essencial para a transcrição e replicação. Tendo em vista tais características, as drogas antivirais de ação direta (DAAs) podem ser categorizadas em inibidores da protease NS3/4A, inibidores NS5A ou inibidores da polimerase NS5B (ISHII; KOZIEL, 2008; KAPLAN, 2015; WANG; D'SOUZA; JACOBSON, 2016).

Em 1993, a análise filogenética das sequências parciais de HCV recuperadas de um grande número de isolados, em todo o mundo, demonstrou que o vírus podia ser classificado em seis principais genótipos com subtipos importantes. Esses grandes grupos genéticos são numerados com algarismos arábicos, na ordem de sua descoberta, e possuem divergência de 31% a 33% em sua sequência nucleotídica. As cepas mais relacionadas dentro de cada genótipo (similaridade da sequência de nucleotídeos entre 75% e 80%) são denominadas subtipos e são indicadas por letras (BRASIL, 2017b).

A distribuição dos vários genótipos e subtipos do HCV apresenta significativa variação geográfica. Os genótipos 1, 2 e 3 são predominantemente encontrados na Europa, no Japão e nos Estados Unidos; o genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire; o genótipo 5, na África do Sul; e o genótipo 6, na Ásia (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017). Campiotto et al. (2005) encontraram predomínio do genótipo 1 em todas as regiões do Brasil, com frequência que variou de 51,7% a 74,1%, sendo o genótipo 2 mais frequente na região Centro-Oeste (11,4%) e o genótipo 3, na região Sul (43%) (CAMPIOTTO et al., 2005; SILVA et al., 2006). Em Ribeirão Preto, de acordo com estudo em que foram avaliados 239 pacientes com hepatite C crônica em seguimento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), foi encontrada a seguinte distribuição: genótipo 1 em 60,2%, genótipo 2 em 1,7% e genótipo 3 em 38,1% dos casos (SOUZA, 2011).

Em 2013, foi atualizada a classificação dos genótipos do HCV para sete genótipos e 67 subtipos. O alto nível de heterogeneidade genética do genoma do HCV tem grandes implicações para o diagnóstico, tratamento e estudos para desenvolvimento de uma vacina eficaz no futuro (BRASIL, 2017b).

1.2 História natural da infecção pelo vírus da hepatite C

Após a infecção aguda pelo HCV, apenas 15% a 45% dos pacientes terão

resolução espontânea, e 55% a 85% irão desenvolver infecção crônica, com o diagnóstico feito a partir de viremia positiva por mais de 6 meses. Daqueles cronicamente infectados, 20% a 30% desenvolverão cirrose, com risco de apresentarem complicações como o CHC, que pode ocorrer na ordem de 1 a 4% ao ano (LINGALA; GHANY, 2015).

A taxa de progressão para a cirrose é altamente variável, e fatores que modificam o curso da doença, como aqueles relacionados ao hospedeiro e ao vírus, não são totalmente compreendidos. Em relação aos fatores do hospedeiro, sabe-se que idade mais avançada no momento da infecção, sexo masculino, coinfeção com HIV ou HBV, imunossupressão, resistência à insulina e esteato-hepatite não alcoólica podem estar associados, bem como fatores externos, como ingestão etílica excessiva (mais de 20g/dia de álcool para mulher e 30g/dia para homem) (AHMED et al., 2017).

Pacientes com infecção crônica pelo HCV podem apresentar-se com manifestações extra-hepáticas ou síndromes consideradas como de origem imunológica, uma vez que o HCV, além de ser hepatotrópico, é também linfotrópico, podendo levar à desordem do sistema imune. Uma variedade de condições autoimunes pode estar associada à hepatite C crônica, tais como síndrome sicca, líquen plano, glomerulonefrite, linfoma, porfiria cutânea tardia e crioglobulinemia. Distúrbios psicológicos, incluindo depressão, são associados com a infecção pelo HCV em até 20% a 30% dos casos (WANG; D'SOUZA; JACOBSON, 2016; REID; PRICE; TIEN, 2017). A infecção crônica pelo HCV também está associada a risco elevado de diabetes mellitus ou de resistência à insulina, os mecanismos exatos dessa relação não são bem estabelecidos, mas acredita-se que o vírus possa exercer efeito direto no metabolismo da glicose (DESBOIS; CACOUB, 2017).

1.3 Resposta imunológica na infecção crônica pelo HCV

A resposta imunológica é dividida em imunidade inata e adaptativa. Os principais componentes celulares da imunidade inata incluem células *Natural Killer* (NK) e células *Natural Killer T* (NKT), enquanto os da imunidade adaptativa consistem em células T e células B (TAKEHARA; HAYASHI, 2005). O fígado consiste principalmente em hepatócitos que compõem, aproximadamente, 80% das células. O componente celular não parenquimatosos é formado por cerca de 20% de linfócitos,

20% de células de Kupffer, 40% de células endoteliais, 20% de células estreladas e células biliares (FASBENDER et al., 2016).

As células de Kupffer correspondem aos macrófagos residentes no tecido hepático e exercem papel essencial na regulação da funcionalidade e da tolerância da resposta imune no fígado. São capazes de detectar antígenos, de expressar uma variedade de receptores de reconhecimento padrão, de secretar grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS), interferon (IFN) de tipo I e citocinas pró-inflamatórias, além de suprimir células T ativadas (ORTEGA-PRIETO; DORNER, 2017).

Os determinantes da persistência do HCV incluem (1) a evasão da resposta imune através de diversos mecanismos de escape viral, (2) indução inadequada da resposta imune inata, (3) indução ou manutenção insuficientes de uma resposta imune adaptativa, (4) produção de *quasispecies* virais e (5) a indução de tolerância imunológica (WEDEMEYER, 2016).

1.3.1 Resposta imune inata

É a primeira linha de defesa quando o patógeno penetra no organismo do hospedeiro, desencadeada através de receptores que reconhecem o patógeno estranho, mas não o hospedeiro. Os mediadores dessa resposta são o sistema complemento, neutrófilos, macrófagos, células NK, NKT, células dendríticas (DC), citocinas e quimiocinas. Essa resposta é inespecífica e ocorre entre horas e dias após o início da infecção e, apesar de haver controle da replicação viral até certo ponto, não há eliminação completa do HCV (HEIM; THIMME, 2014).

Células NK

Essas células correspondem a 30% dos linfócitos intra-hepáticos no fígado normal e desempenham papel importante na primeira linha de defesa contra a infecção viral, bem como na regulação da resposta imune adaptativa, através de secreção de citocinas. Os efeitos antivirais ocorrem por meio da liberação de moléculas citotóxicas (perforinas/granzimas), indução de apoptose da célula-alvo por meio da expressão do ligante de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TNF) - *related apoptosis-inducing ligand* e secreção de outro tipo de IFN, o IFN tipo

II (IFN- γ) (HEIM; THIMME, 2014).

A atividade antiviral da célula NK é regulada por intermédio do equilíbrio entre as interações de receptores inibitórios e ativadores na membrana plasmática. Os receptores inibitórios incluem os KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) e NKG2A (*natural killer group 2A*), os quais interagem com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal I (*Major Histocompatibility Complex* - MHC), para garantir a tolerância às células saudáveis do corpo. A ativação das células NK pode ser mediada por uma variedade de diferentes receptores de superfície, como NKG2D, NKG2C, receptores de citotoxicidade naturais, NKp30, NKp44 e NKp46. (FASBENDER et al., 2016; YOON et al., 2016). O receptor inibitório NKG2A e o ativador NKG2C reconhecem especificamente a molécula não clássica HLA-E (antígeno leucocitário humano E) do MHC I (NATTERMANN et al., 2006).

Os possíveis mecanismos de inibição das células NK na infecção crônica pelo HCV incluem, mas não estão limitados a: (1) interação da proteína E2 do vírus com o receptor CD8+1 das células NK, inibindo diretamente sua ação; (2) estabilização da molécula HLA-E, induzida pela proteína *core* do HCV, levando a super-regulação dos receptores inibitórios NKG2A, com consequente inibição das células NK; (3) redução do receptor ativador NKG2D pelas proteases virais NS5A e NS3/4A (GOLDEN-MASON; ROSEN, 2013; KAPLAN, 2015).

Células Dendríticas

As DCs são células apresentadoras de antígenos e atuam como um elo entre a resposta imune inata e adaptativa, são capazes de aumentar a expressão de moléculas HLA classes I e II, além de produzir citocinas inflamatórias. Essas células são divididas em dois subtipos principais: *myeloid dendritic cells* (mDCs) que secretam interleucina (IL) 12 e TNF-alfa, seguindo estímulo pró-inflamatório e induzem células CD4+ a um fenótipo Th1, e *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) que secretam grande quantidade de IFN-alfa na infecção viral e induzem células TCD4+ *naive* em direção a um fenótipo Th2 (ORTEGA-PRIETO; DORNER, 2017).

Apesar de estar bem estabelecido que a infecção pelo HCV prejudica a função das DCs, os mecanismos exatos que contribuem para isso ainda permanecem controversos. Alguns estudos indicam que a infecção pelo HCV está associada ao comprometimento da maturação da DC e de sua função de apresentação de antígeno,

possivelmente mediada pela proteína *core* do HCV. Além disso, a expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos leva à produção, pelas células NK, de citocinas imunossupressoras como IL10 e *transforming growth factor- β* (TGF- β), com consequente inibição da maturação das células DCs. Duas consequências importantes da função prejudicada das DCs na infecção pelo HCV incluem uma resposta imune inata prejudicada e ação defeituosa dos linfócitos T CD4+ e CD8+ (KAPLAN, 2015).

1.3.2 Resposta imune adaptativa

É uma resposta patógeno-específica, composta pela resposta imune humoral (através da produção de anticorpos pelas células B, por exemplo) e, mais importante em infecções virais, pela resposta imune celular (através das células T CD4+ e CD8+, por exemplo) (THIMME; LOHMANN; WEBWE, 2006).

Resposta celular ao vírus da hepatite C

As células T CD4+ reconhecem antígenos apresentados pelas moléculas do MHC classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). Subsequentemente, as células T CD4+ executam múltiplas funções, incluindo a ativação direta de macrófagos e células B antígeno-específicas, bem como a ativação de células T CD8+ por intermediação de citocinas (THIMME; LOHMANN; WEBWE, 2006; KAPLAN, 2015).

As células T CD8+ reconhecem os antígenos apresentados por moléculas do MHC classe I na superfície das células infectadas e podem ser ativadas através da apresentação cruzada de antígenos do HCV pelas DCs. A partir disso, diferentes funções podem ser desempenhadas por essas células, como a indução de morte de células-alvo infectadas, secreção de citocinas tais como IFN- γ e TNF- α , que podem inibir a replicação viral sem, necessariamente, levar à apoptose da célula infectada (THIMME; LOHMANN; WEBWE, 2006; KAPLAN, 2015).

A magnitude e amplitude da resposta das células T CD4+ e CD8+ parecem ser os fatores fundamentais para o esclarecimento espontâneo da infecção pelo HCV. Ambas as respostas das células T CD4+ e CD8+ determinam se uma infecção aguda é resolvida, ou se progride para infecção crônica. Nessa última, as células T HCV-

específicas são caracterizadas pela alta expressão de marcadores de exaustão, incluindo receptor de células T e domínio de mucina-3, além de expressão de antígeno citotóxico associado a linfócitos T4 e 2B4, o que restringe sua polifuncionalidade, sua capacidade de proliferar e desgranular em resposta ao antígeno viral (ORTEGA-PRIETO; DORNER, 2017).

Resposta humoral ao vírus da hepatite C

O anti-HCV sérico pode ser detectado de seis a oito semanas, após a infecção. Os primeiros anticorpos detectáveis contra antígenos do HCV têm as proteínas *core* e NS3 como alvos. Posteriormente, surgem os anticorpos específicos contra as proteínas NS4 e de envelope (E1 e E2). O papel do anti-HCV na proteção contra a infecção é questionado, uma vez que não previne a reinfeção e não se relaciona com um desfecho favorável. As possíveis razões para a ausência de proteção mediada por esse anticorpo incluem: (1) a natureza mutável das *quasispecies* de HCV com rápida seleção de variantes de escape aos anticorpos, (2) variabilidade intrínseca da especificidade das proteínas E1 e E2 que impede a neutralização pelo anti-HCV e (3) facilitação paradoxal da entrada do vírus por meio da ligação dos anticorpos com as proteínas de envelope E1 e E2 (THIMME; LOHMANN; WEBWE, 2006; ISHII; KOZIEL, 2008; KAPLAN, 2015).

1.4 Complexo principal de histocompatibilidade

Os genes do MHC, na espécie humana, recebem a denominação de sistema HLA (Figura 4) (KLEIN; SATO, 2000). Esses genes codificam moléculas importantes na indução ou na regulação da resposta imune. São agrupados em classe I, II e III, de acordo com as suas localizações no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), e são classificados em clássicos e não clássicos, de acordo com suas funções biológicas (DONADI, 2000; HOWELL; CARTER; CLARK, 2010). As moléculas de classe I clássicas (HLA-A, -B e -C) estão envolvidas na apresentação de peptídeos aos linfócitos T, ao passo que as não clássicas de classe I (HLA-E, -F e -G) estão, primordialmente, associadas com modulação da resposta imune (DONADI et al., 2011).

O gene *HLA-E* apresenta pequena variabilidade de nucleotídeos e de moléculas codificadas, em comparação com outros genes *HLA*. De acordo com o banco de dados *International ImmunoGenetics* (IPD-IMGT / *HLA*), versão 3.33.0, o *HLA-E* apresenta 27 alelos (ou sequências codificadoras) que codificam oito diferentes moléculas. Dentre elas, duas apresentam maior frequência, conhecidas como E * 01: 01 (*HLA-E^R*) e E * 01: 03 (*HLA-E^G*) que diferem em um aminoácido codificado no éxon 3, na posição 107, sendo Arginina para E * 01: 01 e Glicina para E * 01: 03. Essa baixa variabilidade está associada a seu papel fundamental como modulador da resposta imune, bem como a sua ação durante a gravidez, uma vez que o *HLA-E* fetal interage com as células NK maternas, proporcionando um mecanismo invariável de tolerância e assegurando a sobrevivência do feto alogênico. Não há estudos que analisaram com detalhes as diferenças funcionais entre esses dois alelos, mas sabe-se que células que possuem o alelo *E* 01: 03* em homozigose (*HLA-E^G / HLA-E^G*) apresentam maior expressão da molécula *HLA-E* e maior afinidade de ligação a peptídeos (FELICIO et al., 2014; JOOSTEN; SULLIVAN; OTTENHOFF, 2016; RAMALHO et al., 2017).

A molécula HLA-E apresenta uma subunidade de glicoproteína transmembrana, denominada cadeia pesada, associada a uma cadeia leve (beta2 microglobulina) (BORREGO et al., 1998; WADA et al., 2004). Ela exerce influência tanto na imunidade inata quanto na adaptativa, é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo a pele, pulmão, mama, bexiga, baço, medula óssea, rim, endométrio, placenta, amígdala e outros. A molécula HLA-E interage principalmente com células NK e também pode interagir e ativar células T CD8+ através do receptor de células T (TCR) (JOOSTEN; SULLIVAN; OTTENHOFF, 2016; RAMALHO et al., 2017) (Figura 5). O HLA-E apresenta baixa expressão em tecidos normais, enquanto sua maior expressão na superfície celular proporciona maior interação com linfócitos T CD8+ e células NK, podendo gerar resposta inibitória ou estimulatória, dependendo do receptor a ser ligado. A ligação ao receptor CD94 / NKG2A leva a uma resposta inibitória, enquanto a ligação ao CD94 / NKG2C leva a uma resposta estimulatória. Na maioria das condições, a ligação do HLA-E ao CD94/NKG2A é muito mais forte do que a CD94 / NKG2C, sugerindo papel secundário dessa última interação (ZHENG et al., 2015).

A expressão da molécula HLA-E na superfície celular depende da ligação a peptídeos derivados de sequências de sinal de moléculas clássicas do MHC de classe I. Esses peptídeos são processados no citosol e transportados para o retículo endoplasmático (ER) por um transportador associado ao mecanismo dependente da apresentação de antígeno. Dentro do ER, a ligação desses peptídeos estabiliza o complexo HLA-E + beta2 microglobulina que é então transportado para e expresso na superfície celular (NATTERMANN et al., 2005).

Figura 5 – Interação da molécula HLA-E com receptores da resposta imune inata e adaptativa

Fonte: Joosten; Sullivan; Ottenhoff, 2016

Funções imunotolerantes da molécula HLA-E

O HLA-E liga-se a peptídeos derivados de sequências de sinal compartilhadas por outras moléculas HLA classe I. Esta ligação peptídica está relacionada a mecanismo de vigilância imune, indicando que a máquina de expressão e a montagem de moléculas HLA estão funcionando corretamente, evitando a citotoxicidade das células NK contra autoantígenos. Durante a gravidez, por exemplo, existe importante interação da molécula HLA-E com o peptídeo sinal do HLA-G, que é o principal ligante para o HLA-E nesse cenário. O complexo HLA-E/peptídeo sinal do HLA-G interage fortemente com os receptores das células NK, modulando sua atividade que é necessária para a adequada implantação da placenta (RAMALHO et al., 2017).

Em condições patológicas, como tumores e/ou infecções, nas quais o perfil de expressão das moléculas HLA classe I pode estar alterado, isto é, sem o peptídeo sinal como ligante e/ou sem expressão de HLA-E na superfície celular, as células NK podem agir contra as células afetadas, influenciando o desfecho da resposta imune

via HLA-E. Também em situações patológicas, além do peptídeo sinal de HLA classe I, os peptídeos não próprios (*non self*), derivados de patógenos, podem estabilizar a molécula HLA-E e estimular sua expressão na superfície celular. Portanto, a inibição da citotoxicidade das células NK, através da interação da molécula HLA-E com o receptor CD94/NKG2A, pode configurar mecanismo de escape, quando o HLA-E é expresso na superfície celular associado a antígenos de patógenos. Entre eles, podem ser citados peptídeos derivados de proteínas virais tais como gpUL40 (Citomegalovírus Humano), BZLF-1 (Epstein- Barr), InfIM (Influenza), proteína core do HCV, proteína gag (HIV), além de peptídeos bacterianos, como da *Salmonella enterica* e *Mycobacterium tuberculosis* (RAMALHO et al., 2017).

Nomenclatura do gene *HLA-E*

A nomenclatura oficial dos diferentes alelos do gene *HLA-E* segue a padronização apresentada pelo *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* (www.hla.alleles.org). De acordo com tal padronização, a nomenclatura dos alelos pode ser composta de quatro, seis ou oito dígitos (Figura 6).

Figura 6 – Nomenclatura padronizada do gene *HLA-E* de acordo com o *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System*

Sufixo N=null, L= low, S= secreted, C= cytoplasm, A= aberrant, Q= questionable.
Adaptado de Torres; Moraes, 2011.

HLA-E e a infecção pelo vírus da hepatite C

No contexto de infecções virais, sabe-se que há associação entre o HLA e eventos, tais como hipersensibilidade a antivirais, depuração espontânea ou persistência viral na hepatite C crônica, bem como melhor resultado da doença em alguns indivíduos infectados pelo HIV (CRUX; ELAHI, 2017).

Estudos mostram que há maior expressão da molécula HLA-E no tecido hepático de pacientes com infecção pelo HCV, comparando-se a indivíduos não infectados (NATTERMANN et al., 2005; SCHULTE et al., 2009). Os autores identificaram, como potencial mecanismo subjacente, que o HCV dá origem ao peptídeo HCV core 35-44 que se liga ao HLA-E e estabiliza sua expressão na superfície celular, levando, dessa forma, a prejuízo na ação citotóxica das células NK (NATTERMANN et al., 2005; SCHULTE et al., 2009; CRUX; ELAHI, 2017).

Durante a infecção pelo HCV, há menor expressão de receptores que ativam a citotoxicidade das células de defesa, tais como o NKp46 e NKp30, em comparação com controles saudáveis. Além disso, há maior expressão do receptor inibitório NKG2A em células T CD8+ e NK, no tecido hepático (NATTERMANN et al., 2006). Diante da maior expressão do receptor NKG2A na célula NK, há diminuição da sua citotoxicidade contra células que expressam o HLA-E, além de prejuízo nas funções das DCs induzidas pelas células NK (NATTERMANN et al., 2006; CRUX; ELAHI, 2017).

Embora o mecanismo exato de associação entre genótipos do *HLA-E* e a infecção pelo HCV permaneça indeterminado, sabe-se que o genótipo *HLA-E** 01:01 em homozigose (*HLA-E^R* / *HLA-E^R*) está associado à menor expressão da molécula HLA-E e que essa mudança de expressão influencia na resposta do sistema imune (SCHULTE et al., 2009; CRUX; ELAHI, 2017).

1.5 Histologia hepática na infecção pelo vírus da hepatite C

Os achados histológicos na hepatite C crônica são caracterizados por infiltrado de células inflamatórias nos tratos portais e nos lóbulos hepáticos. Com a progressão da doença, a inflamação e a necrose dos hepatócitos levam à formação de fibrose, podendo evoluir com alteração da arquitetura hepática e cirrose (AFDHAL,

2004). A esteatose hepática, achado histológico comumente encontrado na infecção pelo HCV, é resultante tanto de distúrbios metabólicos do paciente, muitas vezes associados à obesidade, quanto da ação direta do vírus que pode causar lesão celular direta através do acúmulo de lipídios. A esteatose contribui para a progressão da fibrose hepática e para risco aumentado de desenvolvimento de CHC (PAWLOTSKY, 2004; LINGALA; GHANY, 2015).

A fibrose hepática é entendida como uma resposta cicatricial do fígado a lesões decorrentes de processo inflamatório crônico, caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (ECM). Esta corresponde a uma mistura complexa de glicoproteínas (colágeno, elastina, fibronectina e laminina) e proteoglicanos, organizados em rede tridimensional (MARCELLIN; ASSELAH; BOYER, 2002). A cirrose hepática é uma condição em que a arquitetura normal do fígado é substituída por nódulos de hepatócitos rodeados por largas faixas de fibrose que restringem massivamente o fluxo sanguíneo e reduzem a função do fígado. A fibrose e a cirrose podem, a princípio, ser causadas por qualquer condição que leve à lesão repetida de uma fração crítica de hepatócitos, como consumo abusivo de álcool, administração repetida de drogas hepatotóxicas, hepatites virais, distúrbios colestáticos ou doenças hepáticas metabólicas (HALDAR et al., 2016).

Embora o HCV não cause lesão citopática direta nos hepatócitos infectados, a resposta imune do hospedeiro tem participação nesse processo, contribuindo para a inflamação do tecido hepático, lise de hepatócitos mediada por linfócitos T citotóxicos e fibrogênese (CRUX; ELAHI, 2017).

Os miofibroblastos são a principal fonte de ECM, e as células estreladas hepáticas (CEH) são a população precursora para os miofibroblastos. As CEHs desempenham papel fundamental na patogênese de fibrose hepática e foram descritas por Karl Wilhelm von Kupffer em 1876, mas sua ação na doença hepática foi identificada apenas nos anos 1980 (HALDAR et al., 2016). As CEHs são ativadas em resposta à lesão de hepatócitos e produzem quantidades aumentadas de ácido retinoico que leva à expressão de RAE-1, um ligante ao receptor NKG2D da célula NK. A ativação das células NK leva à morte das CEHs ativadas, o que pode ser entendido como um mecanismo que visa a antagonizar a formação de fibrose hepática (FASBENDER et al., 2016).

A classificação histológica METAVIR é a mais utilizada na prática médica para casos de hepatites virais, sendo a atividade inflamatória classificada de 0 a 3

(nenhuma, leve, moderada e grave) e a fibrose classificada de 0 a 4 (0: ausente, 1: fibrose portal sem septos, 2: fibrose portal com raros septos, 3: numerosos septos sem cirrose 4: cirrose) (BEDOSSA; POYNARD, 1996; WEDEMEYER, 2016).

A maioria dos pacientes que têm contato inicial com o HCV evolui para a forma crônica da doença, e a hepatite C crônica pode apresentar diferentes formas de evolução, incluindo a cirrose hepática e complicações graves como o CHC. A avaliação do papel do HLA-E na evolução da hepatite C crônica e a investigação da sua relação com o desenvolvimento de fibrose hepática são temas ainda pouco estudados e são essenciais para melhor compreensão dos mecanismos imunes em que essa molécula pode estar envolvida, justificando-se, dessa forma, o presente estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o papel do HLA-E na infecção viral e na gravidade da doença hepática pelo HCV.

2.2 Objetivos específicos

- I) Avaliar a expressão da molécula HLA-E no fígado de pacientes infectados pelo HCV e sua relação com dados clínicos e histológicos de biópsias hepáticas (gravidade da fibrose, atividade necroinflamatória e esteatose hepática), além de comparar tal expressão em indivíduos sem hepatopatia;
- II) Analisar polimorfismos das regiões codificadora e 3' não traduzida (3' *untranslated region* – 3'UTR) do gene *HLA-E*, em pacientes infectados pelo HCV e sua associação com a expressão do HLA-E no fígado e com a gravidade da doença, representada pela fibrose, atividade inflamatória e esteatose hepática.

3 PACIENTES E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP-USP, em sua 398ª Reunião Ordinária, realizada em 10 de novembro de 2014 (Anexo A), de acordo com o processo nº13812/2014, bem como os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) para pacientes com hepatite C crônica e para indivíduos do grupo controle, versões 1.0, de 09 de setembro de 2014. A dispensa do TCLE, para aqueles casos em que não foi possível contato com os indivíduos de ambos os grupos do estudo, foi aprovada pelo CEP (Anexos B e C).

3.1 Desenho do estudo

Na avaliação das características clínicas, laboratoriais e histológicas, trata-se de estudo retrospectivo e transversal. Na etapa de imunoistoquímica para estudar a expressão da molécula HLA-E no fígado e na avaliação de polimorfismos do gene *HLA-E*, o estudo apresenta características metodológicas de caso-controle.

3.2 Pacientes

Foram incluídos pacientes portadores de infecção crônica pelo vírus da hepatite C, de ambos os sexos, idade igual ou superior a 18 anos, acompanhados no Ambulatório de Hepatites do HCFMRP-USP, no período de 2008 a 2017.

A infecção pelo HCV foi definida pela positividade no soro do anti-HCV, pela técnica de ELISA, e do HCV RNA, pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). Hepatite C crônica foi definida pela positividade do HCV RNA por mais de seis meses (PAWLOTSKY et al., 2018).

A coleta dos dados foi realizada no período de 1º de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2017 e aconteceu em quatro etapas:

- levantamento dos prontuários médicos para aquisição das informações relativas às características clínicas e aos resultados de exames laboratoriais dos pacientes, além de dados da biópsia hepática (número e data da realização) para posterior revisão. A seguir, foram separadas as amostras de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico de leucócitos periféricos, previamente coletadas e estocadas em freezer a -20 graus Celsius (°C);

- revisão de todas as biópsias hepáticas por patologista experiente que desconhecia as informações clínicas;
- realização de imunoistoquímica para pesquisa da expressão da molécula HLA-E nos tecidos hepáticos analisados;
- realização da pesquisa de polimorfismos do gene *HLA-E*.

3.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com:

- coinfeção pelo HBV;
- coinfeção pelo HIV;
- existência de outras hepatopatias, como hepatite autoimune, doença de Wilson, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária, deficiência de alfa-1 antitripsina e hepatite medicamentosa.

3.4 Seleção dos pacientes

3.4.1 Grupo de pacientes

Foram incluídos 112 pacientes neste estudo.

As características avaliadas foram:

- nome, registro, data de nascimento, sexo, cor de pele: variáveis de identificação do paciente que constavam no prontuário médico fornecido pelo HCFMRP-USP;
- peso [quilogramas (kg)] e altura [metros (m)]: variáveis obtidas do prontuário médico no momento mais próximo da biópsia hepática, antecedendo ou sucedendo seis meses;
- índice de massa corporal (IMC): calculado a partir da fórmula $\text{peso (Kg)} / [\text{altura (m)}]^2$;
- comorbidade: investigadas história médica de doenças e condições clínicas associadas, particularmente a presença de diabetes, tabagismo e etilismo.

- ingestão alcoólica: considerou-se ingestão abusiva quando foi maior que 20 gramas (g)/dia para mulheres ou 30g/dia para homens. A quantidade de álcool foi calculada pela seguinte fórmula: concentração de álcool na bebida (porcentagem - %) x volume ingerido (mililitros – mL) x 0,79/100 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001);
- as variáveis relacionadas à biologia molecular do HCV (genótipo e carga viral) e ao exame laboratorial alanina aminotransferase (ALT) foram obtidas por informações disponíveis no prontuário médico e referem-se ao período de, no máximo, seis meses antes ou após a data da realização da biópsia hepática;
- histologia hepática: variável obtida através da revisão das lâminas de biópsia hepática previamente realizada, conforme a indicação médica, seguindo protocolos nacional e internacional na rotina do Ambulatório de Hepatites do HCFMRP-USP;
- imunoistoquímica para estudar a expressão da molécula HLA-E no tecido hepático: realizada a partir de amostras de fígado armazenadas em blocos de parafina no Serviço de Patologia do HCFMRP-USP, cujos métodos serão descritos a seguir;
- polimorfismos do gene *HLA-E*: pesquisados a partir de amostras de DNA genômico de leucócitos periféricos, previamente coletadas e estocadas, cujos métodos serão descritos a seguir.

3.4.2 Grupo controle

Para comparação dos resultados de imunoistoquímica, foram usados como grupo controle dados de 20 indivíduos sem doença hepática. Trata-se de um grupo de indivíduos que foram a óbito por doença cardiovascular ou por choque séptico, no período de 2012 a 2014, que passaram por necrópsia no HCFMRP-USP e têm material armazenado no Serviço de Patologia deste hospital, sendo oito indivíduos do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com média de idade de 59 anos (variação de 24 a 84 anos), sem antecedentes de doenças hepáticas crônicas. As amostras de tecido hepático desses indivíduos foram revisadas por patologista experiente, cuja análise identificou ausência de atividade inflamatória, fibrose hepática e depósito de gordura.

Para comparação dos resultados dos polimorfismos do gene *HLA-E*, foram

usados como grupo controle dados de 110 indivíduos da mesma região geográfica da população do estudo. Trata-se de um grupo de doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto/SP, sendo 56 indivíduos do sexo feminino e 54 do sexo masculino, com média de idade de 33,6 anos (variando de 18 a 59 anos). Em relação à autoidentificação quanto à cor, quatro se classificaram como da cor amarela, 77 como brancos, um indígena, 21 pardos e sete negros. Esse grupo de indivíduos faz parte do projeto de pesquisa sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Érick C. Castelli, projeto aprovado pelo CEP da Faculdade de Medicina de Botucatu/Universidade de São Paulo, de acordo com o processo n.25696413.7.0000.5407.

3.5 Métodos

3.5.1 Avaliação bioquímica

A análise bioquímica foi realizada no Laboratório Central do HCFMRP-USP. O exame sérico da enzima hepática ALT foi feito por método automatizado enzimático Ultravioleta Cinético – aparelho Konelab.

3.5.2 Biologia molecular do vírus da hepatite C

Deteção HCV RNA quantitativo

A detecção qualitativa e quantitativa do HCV RNA no soro foi realizada através da técnica de PCR, por transcrição reversa do RNA-alvo para produzir o DNA complementar (cDNA), seguida de amplificação do cDNA-alvo por PCR e hibridização de ácidos nucleicos amplificados por sondas oligonucleotídicas específicas e finalmente detecção do DNA amplificado e fixo à sonda por determinação colorimétrica. Foram utilizados *kits* comerciais (Amplicor HCV Test versão 2.0, Roche Molecular Systems, NJ, EUA e HCV Abbott Real Time, Illinois, EUA), com limites de detecção de 50 unidades internacionais (UI)/mL para o teste qualitativo e com limite inferior de 600UI/mL e <12UI/mL (*kits* Amplicor HCV Test e HCV Abbott Real Time, respectivamente) e limite superior de 850 000 UI/mL e 1 000 000 UI/mL (*kits* Amplicor HCV e HCV Abbott Real Time, respectivamente), para o teste quantitativo.

Detecção dos genótipos do HCV

A determinação dos genótipos do HCV foi realizada através de hibridização reversa, utilizando-se o DNA amplificado por PCR da região não traduzida 5' do genoma do HCV. O *kit* comercial HCV *Genotype Assay* (LiPA) (*Bayer Corporation Diagnostics Division, Tarrytown, NY, EUA*) foi utilizado para identificar os genótipos de 1 a 6 e os principais subtipos.

3.5.3 Expressão proteica de HLA-E em biópsias hepáticas

A avaliação da expressão hepática da molécula HLA-E foi realizada em espécimes de fígado incluídos em blocos de parafina, utilizando a técnica de imunoistoquímica. As reações foram realizadas no laboratório de Patologia Celular, do Departamento de Patologia da FMRP-USP.

Cortes de quatro micrômetros de espessura foram feitos nos tecidos parafinados e montados em lâminas com carga e pré-tratadas com Poli L-lisina (*Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig, Germany*). As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos de xilol e álcool (*Synth-Diadema, SP, Brasil*), para a completa desparafinização e posterior hidratação. Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em solução de citrato 10mM (pH 6,0) e submetidos à fervura em panela a vapor, durante 40 minutos a 95°C. Posteriormente, seguia-se o bloqueio da peroxidase endógena, utilizando-se o *kit REVEAL* (*Spring Bioscience Corp., Pleasanton CA, EUA*). Para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato salino (*phosphate buffer solution - PBS*) por três vezes, 5 minutos cada lavagem, e incubadas em solução PBS e soro composto de 5mL de PBS para uma gota de soro normal, por 40 minutos.

As lâminas foram incubadas em temperatura ambiente e em câmara úmida *overnight*, com o anticorpo primário monoclonal anti-HLA-E MEM-E/02 (*EXBIO, Vestec, Praha, Czech Republic*) que reconhece todas as isoformas da molécula HLA-E, na diluição 1:100. Após esse período, realizaram-se lavagens consecutivas e posterior incubação das lâminas com o anticorpo secundário do sistema de detecção *REVEAL* (*Spring Bioscience Corp.*) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens consecutivas com PBS, procedeu-se à revelação da reação, utilizando-se o substrato revelador 3,3 diaminobenzidina (*Betazoid DAB Chromogen Kit – Biocare*

Medical, Concord, CA, EUA) por 5 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida, as reações foram interrompidas com água destilada e as lâminas coradas com Hematoxilina de Mayer por 60 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada, as lâminas foram desidratadas, em baterias de álcool e xilol, e montadas em *Permout* (*Company Fisher Scientific, Hampton, NH, EUA*). Para controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de citotrofoblasto humano do primeiro trimestre de gravidez (expressão constitutiva de HLA-E). Para controle do anticorpo secundário (controle negativo), foram utilizados cortes histológicos de trofoblasto humano, no qual o anticorpo primário (anti-HLA-E) foi substituído por PBS.

A leitura das reações foi feita por meio da visualização microscópica de 10 campos visuais, com aumento de 200x, realizada por um único patologista experiente, sem conhecimento prévio dos dados clínicos. Quando presente, a expressão imunoistoquímica foi visualizada como uma marcação acastanhada. De acordo com a porcentagem de células marcadas, a imunorreatividade ao HLA-E foi estratificada em quatro categorias, conforme o percentual de células que expressavam a molécula HLA-E: marcação ausente (0); expressão leve (1+), expressão em até 25% das células; expressão moderada (2+), 25 a 50% das células e expressão forte (3+), > 50% das células.

As células no tecido hepático que apresentaram marcação positiva para HLA-E foram identificadas de acordo com sua morfologia. Foi aplicado o anticorpo anti-CD68, diluição 1:100 (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA*), para confirmar a identificação de células de Kupffer.

3.5.4 Processamento das amostras biológicas para determinação dos polimorfismos

Extração do material genético

Inicialmente foi realizada a extração do DNA genômico de leucócitos periféricos por *salting out* (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988), com as seguintes etapas:

- separação das células vermelhas;

- utilização de centrifugado (que contém leucócitos periféricos);
- lise da membrana celular e nuclear;
- separação das proteínas;
- precipitação do DNA.

O material foi estocado a -20°C até o momento da realização da pesquisa de cada polimorfismo, conforme descrito a seguir.

3.5.5 Tipificação do gene *HLA-E*

A tipificação do gene *HLA-E* foi feita por meio da amplificação de um fragmento de 5.179 pares de bases (pb), englobando 50 polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism* - SNPs), ao longo das regiões codificadora e 3' UTR.

Reação em Cadeia da Polimerase

A amplificação foi padronizada em volume final de 30µL, contendo as seguintes concentrações finais: 0,3U de Taq DNA polimerase (0,5U/µL, Long® Taq DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 1mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados [dNTPs (GE, Healthcare, Little Chalfont, UK)], 0,25mM de MgCl₂ (25mM, Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), 3X de tampão de PCR com MgCl₂ (PCR Long® buffer 10X, Invitrogen®), 12pmol de cada iniciador (*primer*) - HE01F e HE3UTR.R1 (Tabela 1), cerca de 200ng de DNA genômico e quantidade suficiente de água ultrapura para completar o volume final de 30µL. Foi acrescentado um tubo correspondente ao controle negativo, substituindo-se o DNA por água ultrapura.

Tabela 1 – Iniciadores (*primers*) definidos para amplificação do gene *HLA-E*

	<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
PCR gene <i>HLA-E</i>	HE01F	5-TCCTGGATACTCATGACGCAGACTC-
	HE3UTR.R1	3-5-GGACTCCCTGGGCTTTCTCACCG-3

As amostras foram levadas ao termociclador - Veriti 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), submetendo o DNA genômico a uma pré-incubação (desnaturação inicial) por três minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos incluindo três passos: desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento dos *primers* a 60°C por 30 segundos e extensão a 68°C por seis minutos, e por fim uma extensão final a 68°C por dez minutos, seguida de resfriamento até 4°C.

Análise dos produtos de amplificação

Os produtos amplificados na PCR foram visualizados, utilizando eletroforese em gel de agarose 1%. Os géis foram feitos adicionando 100mL de tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) com 0,7g de agarose (*UltraPure Agarose, Invitrogen®*). Essa solução foi transferida para uma placa-molde e, após a solidificação do gel, as placas foram encaixadas na cuba de eletroforese, contendo o mesmo tampão TAE 1X à temperatura ambiente. Foram aplicadas 4 µL das amostras amplificadas no gel e coradas com 3µL de uma solução contendo 1 µL de corante fluorescente de ácidos nucleicos (*GelRed® Nucleic Acid Gel Stainm, Biotium Inc., Fremont, CA, EUA*) e 2 µL de azul de metileno, para cada amostra de DNA. No primeiro poço, foi colocado o padrão de peso molecular de 1000pb (O'GeneRuler TM 1kb DNA ladder Plus, Fermentas, *Thermo Fisher Scientific®*) para, posteriormente, ser comparado com as bandas amplificadas. A corrida eletroforética foi realizada durante uma hora, e a fonte de eletroforese (*Electrophoresis Power Supply – EPS 600, Biosciences, San Francisco, CA, EUA*) foi fixada na voltagem de 95V. O gel foi posteriormente exposto à luz ultravioleta em transiluminador, e o registro foi digitalizado em sistema de fotodocumentação (Figura 7).

Figura 7 – Gel de agarose evidenciando produtos de amplificação (*amplicons*) obtidos na amplificação do gene *HLA-E*

M = Marcador de peso molecular (1kb Plus DNA ladder, Invitrogen®).

Purificação e diluição dos produtos amplificados

Os produtos de amplificação foram purificados, adicionando-se 2µL do *kit* de exonucleases (Illustra™, ExoStar 1-Step, *GE Healthcare*) a 5µL dos *amplicons* em tubos de 300µL. As amostras foram levadas ao termociclador e submetidas a um ciclo de 37°C por 15 minutos e a um ciclo de 80°C por 15 minutos, seguidas de resfriamento a 4°C. Os produtos de amplificação purificados foram quantificados por espectrofotometria (sistema espectrofotométrico *NanoVue™ Plus*, *GE Healthcare*) e diluídos em água ultrapura até atingir as concentrações de 100 ng/µL.

Reação de sequenciamento

Para o sequenciamento do gene *HLA-E*, foram utilizados nove *primers* diferentes (Tabela 2). A reação de sequenciamento para cada um dos *primers* foi realizada individualmente, utilizando 1µL dos *amplicons* purificados e diluídos, acrescidos de 1µL do reagente Big Dye® (*Terminator v3.1 0,25X*, *Applied Biosystems*), 1,5µL do seu respectivo tampão (*BigDye® Terminator Sequencing Buffer 5X*, *Applied Biosystems*), 0,5µL de *primer* e 6µL de água ultrapura, completando um volume final de 10µL em cada reação. As amostras foram levadas ao termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (*Applied Biosystems*) e submetidas às seguintes condições térmicas: 1 ciclo de 96°C por 10 segundos e 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos, seguidos de

resfriamento até 4°C.

Tabela 2 – Iniciadores (*primers*) definidos para o sequenciamento do gene *HLA-E*

	Primers	Sequência
Sequenciamento gene <i>HLA-E</i>	HE03F	5-CACGACTCCCGACTATAAAG-3
	HEER2.R2	5-GTCCCTGGCGCTCCGTGTCTCC-3
	HE532ALL	5-CCTACGACGGCAAGGATTATC-3
	HE01R	5-CCTCTTACCCAGGTGAAGCAGCG-3
	HE45	5-TTTCTGACTCTTCCCCTC-3
	HEE4R	5-CCTCTCCAGAAGGCACCA-3
	HE3UTR.F2	5-GAGGGTGGGGCAGAGGGGAC-3
	HE3UTR.F3	5-CCCCCTTCCTCACACTGACCTGT-3
	HE3UTR.R2	5-CAGCCTGGGAAGGTGAGGGGA-3

Precipitação dos fragmentos sequenciados

A precipitação dos produtos de sequenciamento foi feita adicionando, aos 10µL de reação de sequenciamento, 20µL de etanol 100% gelado e 1µL de NaOAc 3M pH 4,5. Após homogeneização vigorosa, as amostras descansaram por 50 minutos a -20°C, sendo em seguida centrifugadas a 1666xg durante 60 minutos (*Centrifuge 5417C, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha*). Posteriormente, desprezou-se o sobrenadante e adicionaram-se 50µL de etanol a 70% seguido de nova homogeneização e centrifugação a 1666xg por 10 minutos. Uma vez desprezado o sobrenadante, realizou-se o processo de secagem em centrífuga a vácuo (*Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Alemanha*), durante 10 minutos. Por fim, as amostras foram ressuspensas em formamida (*Hi-Di™, Applied Biosystems*).

Sequenciamento

As amostras foram processadas em sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), para a obtenção das sequências nucleotídicas visualizadas por meio de cromatogramas. As sequências dos cromatogramas de cada amostra foram, então, alinhadas com uma sequência genômica padrão, e cada sítio de variação detectado foi anotado individualmente.

Para análise da variabilidade do gene *HLA-E*, foram analisadas as regiões codificadora e 3' UTR do gene *HLA-E*, de acordo com o banco de dados do IPD-IMGT/HLA (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2018) e referências na literatura (CASTELLI et al., 2015; RAMALHO et al., 2017).

3.5.6 Avaliação histológica do fígado

As biópsias hepáticas foram realizadas de acordo com critérios estabelecidos em consensos nacional e internacional, na rotina do Ambulatório de Hepatites do HCFMR-USP. Todas as lâminas foram revisadas por um único patologista experiente, sem conhecimento prévio dos dados clínicos.

Foram utilizadas as colorações hematoxilina-eosina e tricômio de Masson, conforme a rotina do Serviço de Patologia do HCFMRP-USP. As biópsias hepáticas dos pacientes foram revisadas e classificadas, de acordo com a classificação METAVIR (Tabela 3) para avaliação da fibrose hepática (estágios F0 a F4) e da atividade necroinflamatória do parênquima hepático (estágios de A0 a A3) (BEDOSSA; POYNARD, 1996). As biópsias hepáticas do grupo controle também foram revisadas para se certificar de que não havia atividade inflamatória ou depósito de fibrose, uma vez que se tratava de indivíduos sem doença hepática crônica.

Tabela 3 – Classificação histológica METAVIR para análise da fibrose e da atividade inflamatória hepática (BEDOSSA; POYNARD, 1996)

Atividade histológica inflamatória		Fibrose	
A0	ausente	F0	ausente
A1	atividade leve	F1	fibrose portal sem septos
A2	atividade moderada	F2	fibrose portal com raros septos
A3	atividade intensa	F3	numerosos septos sem cirrose
		F4	cirrose

A avaliação da esteatose hepática foi realizada segundo Brunt et al. (1999) que consideram a gordura macrovesicular de acordo com a quantidade de hepatócitos acometidos: grau 0 (esteatose ausente), grau 1 (de 1 a 33%), grau 2 (de 33 a 66%) e grau 3 (superior a 66%).

3.6 Tratamento dos dados e análise estatística

Os dados foram armazenados em um banco, utilizando-se o *software* Microsoft Office Excel 2015-2016.

As variáveis contínuas foram expressas em médias, medianas e desvio-padrão, e as variáveis categóricas foram expressas em porcentagem. Para as comparações quanto às categorias de expressão hepática da molécula HLA-E nos grupos de pacientes e controle, bem como para associação de tal expressão com variáveis clínico-demográficas e histológicas, foram realizados o teste Chi-quadrado (X^2) e o teste X^2 para tendência de associação linear entre essas variáveis. O teste Shapiro-Wilks foi utilizado para testar a normalidade dos cruzamentos das variáveis contínuas. Em todas elas a normalidade foi rejeitada, sendo então aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Foi utilizado o teste de correlação não paramétrico de Spearman para avaliar correlação entre as variáveis contínuas e a expressão de HLA-E.

Foi utilizado o método da regressão logística multivariada com o objetivo de verificar a influência simultânea das variáveis independentes, previamente selecionadas, de acordo com os resultados significativos da análise univariada e dados conhecidos da literatura, sobre as variáveis com influência na progressão de fibrose hepática.

O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A interpretação estatística dos dados foi realizada usando o pacote estatístico para as Ciências Sociais (SPSS) versão 17.0 para Windows.

O teste exato de Fisher bicaudal, implementado em planilha desenvolvida para esta finalidade pelo Prof. Dr. Celso T Mendes Junior, foi utilizado para averiguar a existência de associações entre alelos, genótipos ou haplótipos e um determinado fenótipo. Para determinar a intensidade desta associação, foram realizados o cálculo de *Odds Ratio* (OR) e seu intervalo de confiança (IC) de 95%, empregando-se a

mesma planilha. O valor OR permite quantificar a magnitude da associação entre um alelo/genótipo/haplótipo e determinado fenótipo por meio da razão entre a probabilidade de um indivíduo portador de um determinado alelo/genótipo/haplótipo apresentar uma determinada característica e a probabilidade de um indivíduo portador do mesmo alelo/genótipo/haplótipo não apresentar tal característica. O limite de significância estabelecido foi $\alpha = 0,05$.

A fim de analisar a probabilidade de segregação entre os diferentes sítios polimórficos, foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação (do inglês, *Linkage disequilibrium* - LD) entre os alelos que compõem tais polimorfismos, por meio do programa Haploview® 4.2 (BARRETT et al., 2005). Dada a presença do LD entre os sítios polimórficos, foram inferidos haplótipos por meio do método baseado em coalescência, implementado com o software PHASE v2 (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001), uma vez que a fase gamética é desconhecida. Para essa análise, foram considerados apenas os haplótipos cuja probabilidade foi maior ou igual a 95%. Apenas um haplótipo apresentou inferência abaixo do limite estabelecido, sendo, portanto, excluído. A conversão dos haplótipos em alelos do gene *HLA-E* foi realizada manualmente por meio de consulta aos artigos descritos na literatura (CASTELLI et al., 2015; RAMALHO et al., 2017). Desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados pelo programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

4 RESULTADOS

Foram incluídos 112 pacientes¹ com hepatite C crônica, cadastrados no arquivo médico do HCFMRP-USP nos quais foi possível obter biópsia hepática e amostra de DNA. Foram ainda incluídos dois grupos controles: 20 indivíduos sem doença hepática para comparações nas análises de imunoistoquímica para pesquisa de expressão hepática da molécula HLA-E e 110 indivíduos doadores de sangue, da mesma região geográfica, para comparações em relação aos polimorfismos do gene *HLA-E*.

4.1 Características da população

4.1.1 Características gerais dos pacientes

Cinquenta e sete pacientes (50,9%) eram do sexo masculino e 55 (49,1%), do sexo feminino. De acordo com a cor da pele, foram assim distribuídos: 92/112 (82,1%) brancos, 13/112 (11,6%) mulatos, 6/112 (5,4%) negros e 1/112 (0,9%) amarelos. A média de idade $\pm$ desvio-padrão (DP) na época da biópsia hepática foi de $50,5 \pm 11,1$ anos (variação de 24 a 71 anos). Noventa pacientes (80,4%) não eram diabéticos, 14 (12,5%) tinham o diagnóstico de diabetes, e em 8 (7,1%) essa informação era desconhecida. A avaliação do IMC foi possível em 103 dos pacientes, com média $\pm$ DP de $26,9 \pm 4,6$ Kg/m² (variação de 19 a 44,7 Kg/m²), sendo encontrada a seguinte distribuição: 37,9% dos pacientes com IMC <25 Kg/m², 42,7% entre 25-29,9 Kg/m² e 19,4% com IMC $\geq$ 30 Kg/m².

Quarenta e três em 112 pacientes (38,4%) eram tabagistas, 55/112 (49,1%) negavam tabagismo e 14/112 (12,5%) não apresentaram essa informação no prontuário. Setenta e um pacientes (63,4%) negavam uso de bebida alcoólica, 39 (34,8%) afirmavam ingestão de bebida alcoólica, e em 2 (1,8%) essa informação era desconhecida. O percentual de pacientes que fazia uso de bebida alcoólica foi significativamente maior nos pacientes do sexo masculino em relação ao feminino (47,4% x 21,8%; $P=0,02$). Nos pacientes do sexo masculino, a ingestão alcoólica diária (em gramas) foi ≤ 30 em 18/27 (66,7%) casos e >30 em 9/27 (33,3%) casos. Nas pacientes do sexo feminino, a ingestão alcoólica foi ≤ 20 em 10/12 (83,3%) casos e >20 em 2/12 (16,7%) casos.

¹O banco de dados encontra-se gravado em disco compacto (Apêndice B).

4.1.2 Características laboratoriais dos pacientes

Houve predomínio da infecção pelo genótipo 1, com 77/111 (69,4%) casos, seguido do genótipo 3 com 29/111 (26,1%) e do genótipo 2 com 5/111 (4,5%) dos casos (Figura 8). A avaliação da carga viral foi possível em 106 pacientes, sendo que 30 deles apresentavam RNA HCV positivo (análise qualitativa) e 76 tinham resultado do HCV RNA através do teste quantitativo, com mediana $\pm$ DP de 714 798 $\pm$ 4 109 078 UI/mL.

A identificação do valor sérico da enzima ALT foi possível em 109 dos 112 pacientes, com mediana de 68 UI, valor mínimo de 10 U/L e máximo de 451 U/L.

Figura 8 – Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=111), de acordo com os genótipos do vírus da hepatite C

4.1.3 Características histológicas

Foi realizada revisão de lâmina de biópsia hepática dos 112 pacientes e feita estratificação da fibrose e da atividade inflamatória, de acordo com a classificação METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996). Nenhum paciente apresentou fibrose F0. Quarenta e um pacientes (36,6%) apresentaram fibrose leve (F1), 32 (28,6%), fibrose moderada (F2) e 39 (34,8%), fibrose avançada (F3 + F4) (Figura 9). Em relação à atividade inflamatória, nenhum paciente apresentou atividade inflamatória ausente (A0), 33 pacientes (29,5%) apresentaram atividade inflamatória leve (A1), 49 (43,7%), atividade moderada (A2) e 30 (26,8%), atividade inflamatória intensa (A3) (Figura 10).

A esteatose hepática apresentou a seguinte distribuição: 65 pacientes (58%) não apresentaram depósito de gordura na biópsia hepática, 31 (27,7%) apresentaram esteatose grau 1 e 16 pacientes (14,3%) apresentaram esteatose graus 2 e 3 (Figura 11).

Figura 9 – Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de fibrose hepática

Classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996) - F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3 + F4: inúmeros septos sem ou com cirrose

Figura 10 – Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de atividade inflamatória no fígado

Classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996) - A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa

Figura 11 – Distribuição dos pacientes com hepatite C crônica (n=112), de acordo com o grau de esteatose hepática

Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999) - grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

4.2 Expressão hepática da molécula HLA-E

4.2.1 Características gerais

A expressão hepática da molécula HLA-E foi determinada nos 112 pacientes com hepatite C crônica e em 20 indivíduos sem doença hepática crônica (grupo controle). Quando presente, a expressão imunoistoquímica foi visualizada como uma marcação acastanhada (Figura 12). As células no tecido hepático que apresentaram marcação positiva para HLA-E foram identificadas de acordo com sua morfologia, sendo identificada expressão no citoplasma de hepatócitos e em células de Kupffer (Figura 13, painel A). Foi aplicado o anticorpo anti-CD68 para confirmar a identificação de células de Kupffer (Figura 13, painéis B e C).

Figura 12 – Imunoistoquímica para estudo da expressão da molécula HLA-E em amostras de tecido hepático de indivíduos do grupo controle e de pacientes com hepatite C crônica

Painéis A (aumento de 10x) e B (aumento de 40x): tecido hepático normal – ausência de marcação para HLA-E. Painéis C (aumento de 10x) e D (aumento de 40x): tecido hepático infectado com HCV – marcação para HLA-E de coloração acastanhada.

Figura 13 – Expressão da molécula HLA-E em hepatócitos e em células de Kupffer de amostra de tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica

Painel A: Seta vermelha indica expressão de HLA-E em hepatócito. Seta azul indica expressão de HLA-E em célula de Kupffer. Painel B: células de Kupffer com marcação positiva para HLA-E (coloração acastanhada). Painel C: células de Kupffer identificadas com anticorpo específico anti-CD68 (coloração avermelhada).

Foi identificada expressão da molécula HLA-E em hepatócitos e em células de Kupffer, tanto dos pacientes com HCV quanto dos indivíduos controle. Entretanto, a frequência e o grau de expressão foram significativamente maiores no tecido hepático dos pacientes em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação da expressão da molécula HLA-E entre biópsias hepáticas de pacientes com HCV e de indivíduos do grupo controle

	Expressão HLA-E nos hepatócitos						<i>P</i>	Expressão HLA-E nas células de Kupffer						<i>P</i>
	0*		1+**		2 –3+****		0,008	0*		1+**		2 +***		0,02
	Nº	%	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%	Nº	%	
HCV+ (n=112)	49	43,8	42	37,5	21	18,8		63	56,3	32	28,6	17	15,2	
Controle (n=20)	16	80	04	20	0	0	18	90	02	10	0	0		

HCV+: infecção pelo vírus da hepatite C; N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); ***(2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas) e ****(3+) forte expressão (mais de 50% das células marcadas). Não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer.

4.2.2 Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis clínico-demográficas

Para verificar a influência da expressão de HLA-E na infecção pelo HCV, a sua marcação no fígado foi associada com parâmetros clínico-demográficos, tais como idade, gênero, cor de pele, IMC, diabetes, tabagismo e etilismo (Tabelas 5 e 6). Não houve associação significativa entre tais parâmetros e a expressão de HLA-E nos hepatócitos.

Tabela 5 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas

Variáveis clínico-demográficas		Expressão HLA-E nos hepatócitos						P
		0*		1**		2 - 3+****		
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Idade	< 40 anos (n=22)	14	63,6	05	22,7	03	13,6	0,11
	≥ 40 anos (n=90)	35	38,9	37	41,1	18	20	
Gênero	Masculino (n=57)	26	45,6	18	31,6	13	22,8	0,33
	Feminino (n=55)	23	41,8	24	43,6	08	14,5	
Cor de pele	Branco (n=92)	41	44,6	32	34,8	19	20,7	0,35
	Não brancos (n=20)	08	40	10	50	02	10	
IMC	< 25 (n=39)	24	61,5	11	28,2	04	10,3	0,19
	25-29,9 (n=44)	17	38,6	18	40,9	09	20,5	
	≥ 30 (n=20)	07	35	08	40	05	25	
Diabetes	Sim (n=14)	03	21,4	08	57,1	03	21,4	0,18
	Não (n=90)	42	46,7	31	34,4	17	18,9	
Tabagismo	Sim (n=43)	20	46,5	16	37,2	07	16,3	0,58
	Não (n=55)	23	41,8	20	36,4	12	21,8	
Etilismo	Sim (n=39)	18	46,2	13	33,3	08	20,5	0,74
	Não (n=71)	29	40,8	29	40,8	13	18,3	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25% ou mais de 50% das células marcadas); IMC: índice de massa corporal.

Em relação à associação das variáveis clínico-demográficas com a

expressão de HLA-E em células de Kupffer, identificou-se que o percentual de pacientes do sexo masculino com expressão moderada (2+) de HLA-E em células de Kupffer foi significativamente maior em relação aos pacientes do sexo feminino (22,8% x 7,3%; $P = 0,03$).

Tabela 6 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com variáveis clínico-demográficas

Variáveis clínico-demográficas		Expressão HLA-E nas células de Kupffer						P
		0*		1**		2 ***		
		N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	
Idade	< 40 anos (n=22)	13	59,1	07	31,8	02	9,1	0,67
	≥ 40 anos (n=90)	50	55,6	25	27,8	15	16,7	
Gênero	Masculino (n=57)	26	45,6	18	31,6	13	22,8	0,03
	Feminino (n=55)	37	67,3	14	25,5	04	7,3	
Cor de pele	Branco (n=92)	52	56,5	25	27,2	15	16,3	0,67
	Não-brancos (n=20)	11	55	07	35	02	10	
IMC	< 25 (n=39)	24	61,5	10	25,6	05	12,8	0,96
	25-29,9 (n=44)	24	54,5	12	27,3	08	18,2	
	≥ 30 (n=20)	12	60	05	25	03	15	
Diabetes	Sim (n=14)	09	64,3	01	7,1	04	28,6	0,17
	Não (n=90)	52	57,8	25	27,8	13	14,4	
Tabagismo	Sim (n=43)	25	58,1	13	30,2	05	11,6	0,43
	Não (n=55)	32	58,2	12	21,8	11	20	
Etilismo	Sim (n=39)	20	51,3	14	35,9	05	12,8	0,41
	Não (n=71)	42	59,2	17	23,9	12	16,9	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas); IMC: índice de massa corporal. Não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer.

4.2.3 Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis laboratoriais

As Tabelas 7 a 10 mostram a associação entre o grau de expressão da molécula HLA-E e as variáveis genótipo, ALT e Log HCV RNA.

Não houve associação significativa entre o grau de expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos e os diferentes genótipos do HCV, bem como Log HCV RNA.

As biópsias hepáticas de pacientes com mediana elevada de ALT apresentaram maior grau de expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos ($P=0,001$).

Tabela 7 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com o genótipo do HCV

Variáveis laboratoriais	Expressão HLA-E nos hepatócitos						P
	0*		1**		2 - 3+****		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Genótipo 1 (n=77)	32	41,6	28	36,4	17	22,5	0,42
Genótipo não 1 (n=34)	17	50	13	38,2	04	11,8	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25% ou mais de 50% das células marcadas).

Tabela 8 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a mediana de ALT e a média de Log HCV RNA

Variáveis laboratoriais	Expressão HLA-E nos hepatócitos			P
	0*	1**	2 - 3+****	
	N ^o	N ^o	N ^o	
ALT (mediana)	47	88,5	114,5	0,001 [#]
Log HCV RNA (média)	5,8	5,9	5,7	0,66

N^o = número de indivíduos; *(0) expressão ausente; **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25% ou mais de 50% das células marcadas). [#]Pelo teste *post hoc* de Dunn: expressão HLA-E graus 1 e 2+3 têm valores significativamente superiores à expressão HLA-E grau 0 ($P=0,006$ e $P<0,001$, respectivamente).

Não houve associação significativa entre o grau de expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer e os diferentes genótipos do HCV, bem como Log HCV RNA. As biópsias hepáticas de pacientes com mediana elevada de ALT apresentaram maior grau de expressão da molécula HLA-E, nas células de Kupffer ($P=0,003$).

Tabela 9 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, estratificados de acordo com o genótipo do HCV

Variáveis laboratoriais	Expressão HLA-E nas células de Kupffer						P
	0*		1**		2 ***		
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	
Genótipo 1 (n=77)	41	53,2	22	28,6	14	18,2	0,44
Genótipo não 1 (n=34)	21	61,8	10	29,4	03	8,8	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; *(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); *(2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas). Não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer.

Tabela 10 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a mediana de ALT e a média de Log HCV RNA

Variáveis laboratoriais	Expressão HLA-E nas células de Kupffer			P
	0*	1**	2 ***	
	N ^o	N ^o	N ^o	
ALT (mediana)	54,5	88,5	91	0,003 [#]
Log HCV RNA (média)	5,8	6	5,8	0,53

N^o = número de indivíduos; *(0) expressão ausente; *(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E); *(2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas). Não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. [#]Pelo teste *post hoc* de Dunn: expressão HLA-E graus 1 e 2 têm valores significativamente superiores à expressão HLA-E grau 0 ($P=0,02$ para ambos).

Foi encontrada correlação positiva significativa entre a variável ALT e a expressão de HLA-E nos hepatócitos e nas células de Kupffer, com coeficientes de correlação de 0,41 e 0,33 respectivamente ($P<0,001$ para ambas).

4.2.4 Associação entre a expressão hepática de HLA-E e variáveis histológicas

Para estudar a influência da expressão da molécula HLA-E na progressão da hepatite C crônica, a sua marcação no fígado foi associada com parâmetros histológicos, tais como esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. Verificou-se maior grau de expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, conforme maior gravidade da esteatose, da atividade inflamatória e da fibrose hepática. Esses resultados são ilustrados na forma de Tabelas (11 a 13) e Figuras (14 a 16).

Tabela 11 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nos hepatócitos						P
	0*		1**		2 - 3+****		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Esteatose grau 0 (n=65)	42	64,6	18	27,7	05	7,7	<0,001
Esteatose grau 1 (n=31)	05	16,1	17	54,8	09	29	
Esteatose grau 2+3 (n=16)	02	12,5	07	43,8	07	43,8	

Nº = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente; *(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999): grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

Figura 14 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática

Expressão HLA-E nos hepatócitos: *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999): grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

Tabela 12 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nos hepatócitos						P
	0*		1**		2 - 3+****		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
A1 (n=33)	32	97	01	3	00	00	<0,001
A 2 (n=49)	17	34,7	28	57,1	04	8,2	
A 3 (n=30)	00	00	13	43,3	17	56,7	

Nº = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa.

Figura 15 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática

Expressão HLA-E nos hepatócitos: *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa.

Tabela 13 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nos hepatócitos						P
	0*		1**		2 - 3+****		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
F 1 (n=41)	29	70,7	09	22	03	7,3	<0,001
F 2 (n=32)	17	53,1	13	40,6	02	6,3	
F 3+4 (n=39)	03	7,7	20	51,3	16	41	

Nº = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3+4: inúmeros septos sem ou com cirrose

Figura 16 – Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática

Expressão HLA-E nos hepatócitos: *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), ****(2-3+) expressão moderada a forte (mais de 25 ou mais de 50% das células marcadas); Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3+4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

Foi identificada associação linear significativa entre a variável expressão de HLA-E nos hepatócitos e as variáveis histológicas esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática ($P < 0,001$ para todas as variáveis).

Em relação à expressão da molécula HLA-E na célula de Kupffer, também se verificou maior grau de sua expressão, conforme maior gravidade da esteatose, da atividade inflamatória e da fibrose hepática. Esses resultados são ilustrados na forma de Tabelas (14 a 16) e Figuras (17 a 19).

Tabela 14 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nas células de Kupffer						P
	0*		1**		2 ***		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Esteatose grau 0 (n=65)	48	73,8	13	20	04	6,2	<0,001
Esteatose grau 1 (n=31)	11	35,5	15	48,4	05	16,1	
Esteatose grau 2+3 (n=16)	04	25	04	25	08	50	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas); não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999): grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

Figura 17 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a esteatose hepática

Expressão HLA-E nas células de Kupffer: *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas), não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999): grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

Tabela 15 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nas células de Kupffer						P
	0*		1**		2 ***		
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	
A1 (n=33)	26	78,8	07	21,2	00	00	0,005
A 2 (n=49)	25	51	16	32,7	08	16,3	
A 3 (n=30)	12	40	09	30	09	30	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas), não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa.

Figura 18 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a atividade inflamatória hepática

Expressão HLA-E nas células de Kupffer:*(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas), não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa.

Tabela 16 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática

Variáveis histológicas	Expressão HLA-E nas células de Kupffer						P
	0*		1**		2 ***		
	N ^o	%	N ^o	%	N ^o	%	
F 1 (n=41)	29	70,7	08	19,5	04	9,8	0,06
F 2 (n=32)	19	59,4	09	28,1	04	12,5	
F 3+4 (n=39)	15	38,5	15	38,5	09	23,1	

N^o = número de indivíduos; %: porcentagem; *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas), não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3+4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

Figura 19 – Expressão da molécula HLA-E nas células de Kupffer de pacientes infectados pelo HCV, de acordo com a fibrose hepática

Expressão HLA-E nas células de Kupffer: *(0) expressão ausente, **(1+) expressão leve (menos de 25% das células marcadas para HLA-E), *** (2+) expressão moderada (25-50% das células marcadas), não houve expressão 3+ de HLA-E na célula de Kupffer. Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3+4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

Foi identificada associação linear significativa entre a variável expressão de HLA-E nas células de Kupffer e as variáveis histológicas esteatose ($P<0,001$), atividade inflamatória ($P<0,001$) e fibrose hepática ($P=0,006$).

4.3 Análise multivariada

Para verificar a influência simultânea das variáveis independentes sobre a gravidade da doença hepática, representada pela fibrose hepática avançada (F3+F4) (BEDOSSA; POYNARD, 1996), foi utilizado o método de regressão logística multivariada. Tais variáveis foram selecionadas de acordo com a análise univariada e com os dados prévios da literatura.

As variáveis utilizadas foram: expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos (essa variável apresentou maior associação com a fibrose hepática no teste X^2 em relação à expressão nas células de Kupffer), esteatose hepática (graus 0, 1, 2+3), idade, sexo, IMC ($<25 \text{ Kg/m}^2$, $25-29,9 \text{ Kg/m}^2$ e $\geq 30 \text{ Kg/m}^2$), diabetes e etilismo.

Na análise multivariada, as variáveis que influenciaram significativamente e simultaneamente a gravidade da doença hepática foram a expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, idade e IMC, de acordo com a Tabela 17. A expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, independente do seu grau, aumentou 16,4 vezes a chance de ter fibrose F3+F4. Em relação à idade, a cada ano a mais na idade, a chance de ter fibrose avançada (F3+F4) aumentou, em média, 12%. O paciente com obesidade (IMC ≥ 30) apresentou 8,2 vezes mais chance de ter fibrose F3 + F4 em relação a quem tem IMC < 25 e 7,8 vezes mais chance de ter fibrose avançada (F3+F4) em relação àquele com sobrepeso (IMC entre 25-29,9).

Tabela 17 – Análise multivariada referente ao papel das variáveis que influenciaram o desenvolvimento da fibrose hepática avançada F3 + F4 (BEDOSSA; POYNARD, 1996) em pacientes com hepatite C crônica

Variáveis	P	OR IC (95%)
Expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos em relação à sua ausência [#]	<0,001	16,40 (3,99 – 67,56)
Idade ^{##}	0,002	1,12 (1,04 – 1,21)
IMC ≥ 30 em relação ao < 25	0,010	8,20 (1,69 – 41,70)
IMC ≥ 30 em relação ao 25-29,9	0,008	7,80 (1,69 – 35,71)

OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; %: porcentagem. [#]A expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, independente do seu grau de expressão, esteve associada à maior probabilidade de fibrose avançada. ^{##}Idade analisada como variável contínua. METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3+4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

4.4 Variabilidade do gene *HLA-E* em pacientes e em indivíduos controles

Para avaliar a variabilidade do gene *HLA-E*, foram analisados 112 pacientes infectados com HCV e 110 indivíduos controles. Foram analisados 50 sítios polimórficos distribuídos ao longo da região codificadora e 3'UTR do gene *HLA-E*, dos quais 13 mostraram-se variáveis. Todos os polimorfismos mostraram estar de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A inferência de haplótipos foi realizada com base nos 13 sítios de variabilidade, observados na população do presente estudo.

Os haplótipos foram convertidos em alelos *HLA-E*, baseando-se nos dados do IMGT/HLA (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2018). Em toda a casuística desta pesquisa, incluindo indivíduos controles e pacientes, foram identificados 14 haplótipos diferentes, quatro deles ainda não descritos na literatura (Tabela 18). A frequência do alelo *HLA-E**01:01:01:03 foi significativamente menor no grupo de pacientes, quando comparada à do grupo controle (OR 0,03; IC 95% 0,00 - 0,58; $P = 0,0001$).

Tabela 18 – Frequência dos haplótipos do gene *HLA-E* nos pacientes com hepatite C crônica e nos indivíduos controles

Haplótipos	Pacientes		Controles	
	n [#]	Frequência (%)	n	Frequência (%)
E*01:01:01:01	115	51,34	107	48,64
E*01:03:02:01	62	27,68	64	29,09
E*01:03:01:01	31	13,84	24	10,91
E*01:01:01:03	0	0	13	5,91
E*01:03:05	9	4,02	5	2,27
E*01:01:01:06	0	0	3	1,36
CAGCGGGG**	2	0,89	0	0
E*01:05	0	0	1	0,45
E*01:03:01:02	0	0	1	0,45
E*01:01:01:04	0	0	1	0,45
E*01:03:02:02	0	0	1	0,45
TAGCGAGC**	1	0,45	0	0
TAGCGGAG**	1	0,45	0	0
TAGTGAGG**	1	0,45	0	0
TOTAL (2n)	222	100	220	100

G: Guanina; C: Citosina; A: Adenina; T: Timina. **Alelos ainda não descritos na literatura ou não oficialmente reconhecidos pelo banco de dados do IMGT/HLA (European Bioinformatics Institute, 2018). % porcentagem. #Dos 112 pacientes avaliados, apenas em 1 a amostra apresentou probabilidade menor que 95% para inferência do haplótipo, sendo, portanto, excluída da análise (total pacientes n=111).

O genótipo GG do polimorfismo +756 G/A (rs1264457) associou-se à maior probabilidade (OR = 2,18) de ocorrência no grupo de pacientes em relação ao controle (IC 95% 1,07 - 4,42; $P = 0,037$), enquanto o genótipo GA desse mesmo sítio polimórfico esteve associado à menor probabilidade (OR = 0,53) de ocorrência no grupo de pacientes em relação ao controle (IC 95% 0,31 - 0,91; $P = 0,023$).

4.5 Associação entre a variabilidade do gene *HLA-E* e a expressão hepática da molécula HLA-E

Realizaram-se análises de possíveis associações entre a diversidade genética do *HLA-E* e a expressão hepática da molécula HLA-E. Foi identificado que o

genótipo TT do polimorfismo +424 T/C (rs1059510) associou-se à menor probabilidade (OR = 0,06) de expressão da molécula HLA-E na célula de Kupffer (IC 95% 0,00 - 1,17; $P=0,009$) em relação à ausência de expressão. O alelo *HLA-E*01:03:05*, por sua vez, esteve associado à maior probabilidade (OR = 4,69) de expressão da molécula HLA-E na célula de Kupffer (IC 95% 0,95 - 23,11; $P = 0,046$), em relação à ausência de expressão. Não foi identificada associação significativa entre os polimorfismos do gene *HLA-E* e a expressão hepática da molécula HLA-E nos hepatócitos.

4.6 Associação entre a variabilidade do gene *HLA-E* e a gravidade da doença hepática

Avaliou-se se havia associação entre os polimorfismos do *HLA-E* e a gravidade da doença hepática, de acordo com os achados histológicos esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. Foi identificada associação significativa entre os polimorfismos +424 T/C (rs1059510), +756 G/A (rs1264457) e +3777 G/A (rs1059655) e os achados histológicos descritos acima (Tabela 19). Em relação à esteatose hepática, identificou-se que o genótipo GA do polimorfismo +756 G/A (rs1264457) associou-se à menor probabilidade de esteatose hepática graus 2+3 (OR = 0,13), em relação à esteatose grau 0 ($P = 0,005$). No que diz respeito à atividade inflamatória e fibrose hepática, foi identificado que o genótipo TT do polimorfismo +424 T/C (rs1059510) associou-se à menor probabilidade (OR = 0,22) de atividade inflamatória moderada/grave em relação à leve ($P = 0,047$) e esteve associado à menor probabilidade (OR = 0,17) de fibrose hepática moderada/grave em relação à fibrose leve ($P = 0,049$). Entretanto, o alelo C do mesmo sítio polimórfico associou-se à maior probabilidade (OR = 2,09) de fibrose moderada/grave em relação à fibrose leve ($P = 0,020$). O genótipo AA do polimorfismo +3777 G/A (rs1059655) associou-se à maior probabilidade (OR = 2,39) de fibrose moderada/grave em relação à fibrose leve ($P = 0,032$), enquanto o alelo G desse mesmo sítio polimórfico esteve associado à menor probabilidade (OR = 0,35) de fibrose moderada em relação à fibrose leve ($P = 0,012$).

Tabela 19 – Associação entre os polimorfismos do gene *HLA-E* e os achados histológicos esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Polimorfismo	Alelo e/ou Genótipo	Associação (grupo 1 vs. grupo 2)	Freq.* grupo 1	Freq.* grupo 2	OR [IC 95%] **	P
+756 G/A (rs1264457)	GA	#Esteatose graus 2+3 vs. grau 0	0,125	0,523	0,13 [0,02 - 0,61]	0,005
	TT	##Atividade inflamatória A2+A3 vs. A1	0,038	0,152	0,22 [0,04 - 0,98]	0,047
+424 T/C (rs1059510)	TT	###Fibrose F2+F3+F4 vs. F1	0,028	0,146	0,17 [0,03-0,88]	0,049
	C	###Fibrose F2+F3+F4 vs. F1	0,775	0,622	2,09 [1,15-3,78]	0,020
+3777 G/A (rs1059655)	AA	###Fibrose F2+F3+F4 vs. F1	0,629	0,415	2,39 [1,08 - 5,25]	0,032
	G	###Fibrose F2 vs. F1	0,145	0,329	0,35 [0,14 - 0,80]	0,012

*Freq. = Frequência de alelos e/ou genótipos nos grupos 1 e 2; **OR = Odds Ratio; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%; #Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al. (1999): grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%. ##Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa. ###Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3-4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

Foi identificada associação entre os haplótipos *E*01:01:01:01* e *E*01:03:02:01* do gene *HLA-E* e as variáveis atividade inflamatória e fibrose hepática, de acordo com a Tabela 20, a seguir. O haplótipo *E*01:01:01:01* associou-se à maior probabilidade (OR = 1,98) de atividade inflamatória moderada em relação à leve ($P = 0,038$). O haplótipo *E*01:03:02:01* esteve associado à menor probabilidade (OR = 0,47) de fibrose avançada/cirrose em relação à fibrose leve ($P = 0,039$). Não houve associação entre os haplótipos identificados e a variável esteatose hepática.

Tabela 20 – Associação entre os haplótipos do gene *HLA-E* e os achados histológicos atividade inflamatória e fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica

Haplótipo	Associação (grupo 1 vs. grupo 2)	Freq.* grupo 1	Freq.* grupo 2	OR [IC 95%] **	P
<i>E*01:01:01:01</i>	#Atividade inflamatória A2 vs. A1	0,594	0,424	1,98 [1,05 - 3,74]	0,038
<i>E*01:03:02:01</i>	##Fibrose F3+F4 vs. F1	0,231	0,388	0,47 [0,23 - 0,94]	0,039

*Freq. = Frequência de alelos e/ou genótipos nos grupos 1 e 2; **OR = Odds Ratio; IC 95% = Intervalo de confiança a 95%; #Atividade inflamatória de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa. ##Fibrose hepática de acordo com a classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996): F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3-4: inúmeros septos sem ou com cirrose.

5 DISCUSSÃO

A hepatite C crônica é um importante problema de saúde pública mundial, com significativa morbimortalidade. Estimativas indicam que enquanto a incidência da infecção pelo HCV tem diminuído no mundo desenvolvido, a mortalidade secundária à infecção vai se elevar nos próximos 20 anos (PETRUZZIELLO et al., 2016; BOLOTIN et al., 2018). A expectativa do aumento da mortalidade está associada à elevação do número de complicações relacionadas à doença avançada, como cirrose hepática descompensada e CHC, o que sinaliza a necessidade de se obter mais conhecimento sobre fatores associados à progressão da doença.

Os fatores que modificam o curso da doença podem estar relacionados ao hospedeiro e ao vírus. Em relação aos fatores do hospedeiro, sabe-se que idade mais avançada no momento da infecção, sexo masculino, coinfeção com HIV ou HBV, imunossupressão, resistência à insulina e esteato-hepatite não alcoólica podem estar associados à progressão acelerada para cirrose hepática, bem como fatores externos, como ingestão etílica excessiva (AHMED et al., 2017). No entanto, ainda há necessidade de se conhecer melhor os fatores relacionados ao vírus e ao sistema imune que influenciam a evolução da hepatite C.

No presente estudo, foram incluídos 112 pacientes com hepatite C crônica, com discreto predomínio do sexo masculino (50,9%). Estudos realizados na mesma área geográfica, desenvolvidos anos atrás, identificaram frequência mais elevada, aproximadamente 78%, de indivíduos do sexo masculino infectados pelo HCV (MARTINELLI; RAMALHO; ZUCOLOTO, 2004; SOUZA, 2011). De acordo com dados recentes do Ministério da Saúde, 58,5% dos casos confirmados de hepatite C ocorreram em indivíduos do sexo masculino, no período de 1999 até 2016. Apesar de o número de casos entre homens ser superior, observou-se ligeira diminuição ao longo dos anos analisados (BRASIL, 2017a), o que está de acordo com os dados encontrados neste estudo.

Na maior parte dos países em que há divulgação de dados epidemiológicos, a prevalência da infecção pelo HCV é maior em homens do que em mulheres (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017). Isso reflete a maior exposição a fatores de risco nesse grupo, como o uso de drogas endovenosas, com compartilhamento de material utilizado na administração das mesmas (SOUZA, 2011; THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017). Na França e na Alemanha, entretanto, as mulheres têm maior taxa de infecção pelo HCV do que os homens. Em ambos os países, as mulheres adquiriram a infecção ao nascimento, ao fim dos anos 1970,

através de contato com sangue ou equipamentos contaminados (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017).

A média de idade na época da biópsia hepática dos pacientes incluídos no estudo foi de 50,5 anos. Em geral, a prevalência da hepatite C aumenta com o avançar da idade, com o pico da prevalência entre 55 e 64 anos, na maior parte das regiões (THRIFT; EL-SERAG; KANWAL, 2017). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2016, as maiores taxas de detecção foram observadas, em ambos os sexos, na faixa etária de 55 a 59 anos. Considerando que a época provável de contato com o vírus seja na juventude (segunda ou terceira década de vida) e que em cerca de 20 a 30 anos a doença possa evoluir para fases avançadas, momento em que os sintomas surgem, entende-se a razão pela qual a média de idade do diagnóstico dos pacientes seja por volta da quinta década de vida.

A informação sobre a cor dos pacientes incluídos foi obtida a partir da sua autoidentificação. Entre os pacientes incluídos, 82,1% se autorreferiram como brancos, 11,6%, como mulatos, 5,4%, como negros e 0,9%, como amarelos. Dados semelhantes foram encontrados por Focaccia et al. (2004), em estudo multicêntrico com 4.966 pacientes brasileiros com infecção crônica pelo HCV, no qual foi observado que 80% dos pacientes eram brancos. A miscigenação racial da população brasileira e a subjetividade da autoclassificação do indivíduo, com potencial divergência interpessoal, podem gerar variações nesses dados epidemiológicos. De acordo com o Ministério da Saúde, houve melhoria no preenchimento da variável raça/cor para os casos de hepatite C, ao longo dos anos. Em 1999, essa informação era conhecida em menos de 30% dos casos notificados. Em 2004, mais de 80% das notificações apresentaram essa informação. Em 2016, 61,3% eram referidos como brancos, 28,8%, pardos, 8,8%, negros, 0,8% era de amarelos e 0,3%, indígenas.

Com relação ao IMC, a média $\pm$ DP encontrada neste estudo foi de $26,9 \pm 4,5$ kg/m². Cerca de 62% dos pacientes apresentavam IMC acima de 25 kg/m². Em estudo multicêntrico realizado no Brasil, 51% dos pacientes apresentaram sobrepeso ou obesidade (FOCACCIA et al., 2004). Em pacientes com concomitante infecção pelo HCV, a obesidade, definida pelo IMC ≥ 30 kg/m², pode participar no desenvolvimento de defeitos na sinalização da insulina, levando à resistência à insulina e subsequente esteatose hepática, que é encontrada em até 50% dos pacientes infectados (JACOBSON et al., 2010). Além disso, a obesidade é fator de risco independente para progressão da fibrose hepática e desenvolvimento da cirrose

(LINGALA; GHANY, 2015).

O genótipo 1 do HCV foi o predominante (69,4%) entre os pacientes avaliados, dado semelhante às casuísticas brasileiras publicadas por Focaccia et al. (2004) e Souza (2011) que identificaram prevalência desse genótipo em 64% dos 4.996 pacientes e em 60,2% dos 239 pacientes estudados. Em levantamento feito por Petruzzello et al. (2016) sobre a distribuição global dos genótipos, foi identificada prevalência de 74,3% do genótipo 1 na América Latina. Nesse mesmo estudo, observou-se que esse genótipo também é o mais prevalente globalmente, e isso pode estar relacionado à associação entre o genótipo 1 e a transmissão do vírus por transfusão sanguínea, situação comum antes da descoberta do HCV em 1989.

Os valores da enzima ALT variaram de mínimo 10 U/L e máximo 451 U/L, com mediana de 68 U/L. De acordo com Lingala e Ghany (2015), cerca de 70% a 80% dos pacientes com hepatite C crônica apresentam níveis elevados de ALT. Em estudos populacionais, valores elevados de ALT associaram-se a maior mortalidade em geral, em particular morte relacionada ao fígado (LINGALA; GHANY, 2015).

A esteatose hepática esteve presente em 42% dos casos, semelhante aos dados de Adinolfi et al., 2001, que a encontraram em 48% (86/180) dos pacientes avaliados. Na infecção crônica pelo HCV, a esteatose é importante cofator na aceleração do desenvolvimento da fibrose e do aumento da atividade necroinflamatória, e tanto os fatores do hospedeiro quanto os virais atuam na patogênese da esteatose em pacientes com hepatite C crônica (ADINOLFI et al., 2001).

A atividade necroinflamatória e a fibrose hepática são as principais características histológicas na hepatite C crônica, sendo fundamental a sua avaliação para a classificação da gravidade da lesão hepática. Essa lesão é caracterizada por infiltrado linfocitário portal, necrose focal e em ponte e degeneração lobular e parece ocorrer devido à resposta imune local, amplificada por acúmulo de células T específicas. A fibrose hepática, que resulta da inflamação crônica, se inicia na região periportal e, com o avanço da doença, leva à distorção da arquitetura hepática (PAWLOTSKY, 2004; SOUZA, 2011).

No presente estudo, a distribuição dos pacientes de acordo com o grau de fibrose hepática foi: F1 em 36,6%, F2 em 28,6%, F3+4 em 34,8%. Optou-se por incluir proporções semelhantes de cada grau de fibrose e avaliar os graus de fibrose 3 e 4 conjuntamente, uma vez que ambos correspondem à fibrose hepática avançada com

manejo clínico semelhante na prática médica. Em relação à atividade necroinflamatória, foi identificada a seguinte distribuição: A1 em 29,5%, A2 em 43,8% e A3 em 26,8%.

Utilizou-se a classificação histológica METAVIR (BEDOSSA; POYNARD, 1996), com quatro estágios de atividade necroinflamatória e de fibrose hepática, conforme descrição anterior, com o objetivo de obter avaliação histológica de acordo com a prática médica, uma vez que essa classificação é uma das mais utilizadas e de mais simples entendimento.

Os pacientes foram, portanto, divididos em três grupos em relação à fibrose hepática: fibrose leve (grau 1) (36,6%), moderada (grau 2) (28,6%) e grave (graus 3 e 4) (34,8%); em relação à atividade necroinflamatória: inflamação leve (grau 1) (29,5%), moderada (grau 2) (43,8%) e grave (grau 3) (26,8%) e em relação à esteatose: ausente (grau 0) (58%), leve (grau 1) (27,7%) e moderada a intensa (graus 2+3) (14,3%). Os graus 2 e 3 de esteatose hepática foram avaliados em conjunto devido à presença de apenas um paciente com classificação grau 3.

Diversas evidências na literatura sugerem que o HCV é capaz de modular a resposta imune, permitindo sua permanência no organismo, e o HLA-E, através da sua capacidade de inibir células NK, pode participar desse processo. Entretanto, são escassos os estudos que tenham analisado a relação entre HLA-E e a gravidade da hepatite C crônica. No presente trabalho, avaliou-se a repercussão clínica do HLA-E na evolução dessa doença infecciosa viral. Para tanto, foi analisada a associação entre a marcação positiva da molécula HLA-E no fígado e as variáveis clínico-demográficas, laboratoriais e histológicas dos pacientes infectados pelo HCV.

Identificou-se expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos e células de Kupffer no tecido hepático, tanto de pacientes quanto de indivíduos controle. Tal expressão foi significativamente maior em fígado derivado de pacientes infectados com HCV, em comparação com indivíduos sem hepatopatia. Apesar de ser amplamente expressa por quase todas as células que também expressam moléculas HLA de classe I clássicas, a expressão da molécula HLA-E ocorre, principalmente, em células endoteliais e células do sistema imune (JOOSTEN; SULLIVAN; OTTENHOFF, 2016), podendo ocorrer tanto no citoplasma quanto na membrana celular (KNUT & ALICE WALLENBERG FOUNDATION, [s. d.]). O HLA-E apresenta baixa expressão em tecidos normais, enquanto, em condições patológicas, como na hepatite C crônica, pode haver regulação positiva de sua expressão e esse parece ser um mecanismo de

defesa pelo qual o HCV escapa da resposta imune via inibição da célula NK.

Nattermann et al. (2005) também observaram maior expressão da molécula HLA-E em amostras de tecido hepático de pacientes com hepatite C crônica, em comparação com indivíduos HCV-negativos. Foi encontrada expressão do HLA-E nas células de Kupffer, células endoteliais sinusoidais, bem como em monócitos CD14 (+) e células dendríticas CD8+3 (+). Os autores identificaram, como um potencial mecanismo subjacente, que o HCV dá origem ao peptídeo HCV core 35-44 que se liga ao HLA-E, estabiliza sua expressão na superfície celular, levando, dessa forma, a prejuízo na ação citotóxica das células NK. Nesse mesmo estudo, foi encontrada diferença significativa com maior expressão do receptor inibitório NKG2A nas células NK de paciente com hepatite C crônica, em comparação com indivíduos não infectados. Não houve diferença significativa em relação à expressão do receptor NKG2C (NATTERMANN et al., 2005).

Para verificar a influência da expressão da molécula HLA-E na infecção pelo HCV, foi avaliada a relação entre a sua marcação no fígado com parâmetros clínico-demográficos tais como idade, sexo, cor de pele, IMC, diabetes, tabagismo e etilismo. De forma inédita, identificou-se associação significativa entre gênero masculino e expressão de HLA-E. A porcentagem de pacientes do sexo masculino com maior expressão de HLA-E na célula de Kupffer foi significativamente maior em relação aos do sexo feminino (22,8% x 7,3% - $P = 0,03$). O gênero influencia o desfecho da infecção crônica pelo HCV, sendo o sexo masculino importante fator associado à progressão da fibrose hepática, aumentando a taxa de fibrose em até 10 vezes, independentemente da idade (WESTBROOK; DUSHEIKO, 2014). Os homens têm maior risco de progressão para doença hepática avançada, cirrose e CHC, quando comparados com mulheres. Diferenças nos hormônios sexuais têm sido propostas para explicar as diferenças de gênero na progressão da doença, níveis mais elevados de testosterona sérica demonstraram estar associados à maior gravidade da fibrose (LINGALA; GHANY, 2015). O sistema imune também pode estar relacionado a esses achados, uma vez que pacientes do sexo masculino apresentaram maior expressão de HLA-E em células de Kupffer, quando comparados às mulheres, como foi observado neste estudo.

Em relação à associação da expressão de HLA-E com variáveis laboratoriais (genótipo, carga viral e ALT), identificou-se que a maior expressão da molécula HLA-E, tanto no hepatócito quanto na célula de Kupffer, esteve associada

de forma significativa com níveis mais elevados de ALT. Alguns estudos demonstraram que níveis elevados de ALT associam-se à progressão da fibrose hepática e até à maior risco de CHC (NUNNARI et al., 2013; LINGALA; GHANY, 2015). Os resultados do presente estudo sugerem que a molécula HLA-E participa desse processo, modulando a resposta imune de forma a contribuir para a persistência da infecção pelo HCV, para a inflamação hepática e maior gravidade da doença.

De forma inédita, verificou-se que a marcação positiva da molécula HLA-E nos hepatócitos e nas células de Kupffer foi associada significativamente com as variáveis histológicas esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. Houve associação linear entre elas, ou seja, à medida que a expressão de HLA-E no tecido hepático aumentou, houve maior grau de esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. O HCV por ação direta ou por ativação da resposta imune leva à esteatose hepática e ao agregado de células inflamatórias com consequente lesão de hepatócitos. As CEHs que são ativadas em resposta a essa lesão levam, em última instância, à formação de fibrose hepática. A molécula HLA-E participa desse mecanismo na medida em que inibe células NK e linfócitos T CD8+, enfraquecendo a resposta imune inata e adaptativa e contribuindo para a persistência do vírus no organismo. Além disso, sabe-se que as células NK têm o papel de antagonizar a formação da fibrose hepática a partir da lise de CEHs ativadas e, uma vez que as células NK estão inibidas pela interação com o HLA-E, as CEHs permanecem ativas exercendo sua ação na fibrogênese.

Para estudar a influência da molécula HLA-E na fibrose hepática independente de outros fatores que sabidamente podem contribuir para a progressão da fibrose, tais como idade, sexo, obesidade, diabetes, etilismo e esteatose hepática, foi realizada análise multivariada. As variáveis que influenciaram significativamente e simultaneamente a gravidade da doença hepática foram expressão da molécula HLA-E nos hepatócitos, independente do seu grau, idade avançada e IMC elevado. Essas variáveis associaram-se a maior probabilidade de fibrose hepática grave. A idade mais avançada à época da infecção e a obesidade são fatores de risco conhecidos para progressão da fibrose hepática na infecção pelo HCV, o que está de acordo com os resultados deste estudo. É importante salientar que, dentre as variáveis estudadas na análise multivariada, a expressão de HLA-E nos hepatócitos foi o fator de maior associação com fibrose hepática avançada. A expressão da molécula HLA-E no

citoplasma de hepatócito, independente do seu grau, aumentou 16,4 vezes a chance de ter fibrose F3+F4. Uma possível explicação seria a interação do HLA-E com o receptor CD94/NKG2A que leva à inibição da célula NK e à persistência da infecção pelo HCV. Com isso, perpetua-se a infecção, com consequente lesão hepática, ativação de CEH e formação de fibrose hepática.

A seguir, serão discutidos os achados relacionados à variabilidade do gene *HLA-E*. Em toda a casuística, foram identificados 14 diferentes alelos do gene *HLA-E*, sendo os alelos *E** 01:01:01:01 e *E** 01:03:02:01 os de maior frequência, tanto no grupo de pacientes quanto no grupo controle. Veiga-Castelli et al. (2012) estudaram 104 indivíduos saudáveis do Estado de São Paulo, doadores de medula óssea, sendo identificados oito diferentes alelos. Dentre eles, os mais frequentes também foram *E** 01:01:01 (que engloba os alelos *E**01:01:01:01 a *E**01:01:01:03) e *E** 01:03:02:01.

Embora os alelos *E** 01:01:01:01 e *E** 01:03:02:01 tenham sido os mais frequentes tanto nos pacientes quanto nos indivíduos controles, foram observadas diferenças significativas na frequência de determinados alelos entre esses dois grupos. A frequência do alelo *HLA-E**01:01:01:03 foi significativamente maior nos indivíduos controles, quando comparada aos pacientes. O genótipo GG do polimorfismo +756 G/A (rs1264457) associou-se à maior probabilidade de ocorrência no grupo de pacientes em relação ao controle, enquanto o genótipo GA desse mesmo sítio polimórfico associou-se à menor probabilidade de ocorrência nos pacientes em relação aos indivíduos controles.

O gene *HLA-E* apresenta 27 alelos (ou sequências codificadoras) que codificam oito diferentes moléculas (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2018). Dentre elas, duas apresentam maior frequência, conhecidas como *E** 01: 01 (*HLA-E^R*) e *E** 01: 03 (*HLA-E^G*). A primeira é codificada pelos alelos *E**01:01:01:01, *E**01:01:01:02 e *E**01:01:01:03, enquanto a segunda é codificada pelos alelos *E**01:03:01:01, *E**01:03:01:02, *E**01:03:02:01, *E**01:03:02:02, *E**01:03:03, *E**01:03:04 e *E**01:03:05. As proteínas *E**01:01 e *E**01:03, codificadas por esses alelos, são as mais frequentes no mundo, observadas em doenças e em indivíduos normais. Embora os brasileiros representem uma das populações mais miscigenadas no mundo, com importante contribuição de africanos, ameríndios e europeus, pelo menos 97,5% dos alelos *HLA-E* descritos na população do Brasil codificam essas duas proteínas (FELICIO et al., 2014).

Os genes *HLA* de classe I clássicos são altamente polimórficos, com aproximadamente 13.482 alelos descritos, considerando os genes *HLA-A*, *-B* e *-C* juntos (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE, 2018). Essa elevada variabilidade é fundamental para sua função de apresentação de antígenos. Em contrapartida, os genes não clássicos, especificamente o *HLA-E*, apresentam pequena variabilidade de nucleotídeos e de moléculas codificadas. Essa baixa variabilidade está associada ao papel fundamental do *HLA-E* como modulador da resposta imune (VEIGA-CASTELLI et al., 2012).

Foi identificada associação entre determinados haplótipos, genótipos e alelos do gene *HLA-E* e a expressão da molécula *HLA-E* no fígado, bem como associação com a gravidade da doença hepática, representada pelos achados histológicos esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática.

Alguns sítios de variabilidade do gene *HLA-E* podem afetar o prognóstico da doença. O genótipo AA do polimorfismo +3777 G/A (rs1059655), por exemplo, esteve associado à maior probabilidade de fibrose moderada/grave em relação à fibrose hepática leve, enquanto o alelo G do mesmo sítio polimórfico associou-se à menor chance de fibrose moderada em relação à leve. No que diz respeito à esteatose hepática, o genótipo GA do polimorfismo +756 G/A (rs1264457) associou-se à menor probabilidade de esteatose hepática graus 2+3 em relação à esteatose grau 0.

Além dos sítios polimórficos citados acima, destaca-se o genótipo TT do polimorfismo +424 T/C (rs1059510), que se associou à menor probabilidade de expressão da molécula *HLA-E* na célula de Kupffer em relação à ausência de expressão, menor probabilidade de atividade inflamatória moderada/intensa em relação à leve e menor probabilidade de fibrose hepática moderada/grave em relação à fibrose leve. Em contrapartida, o alelo C desse mesmo sítio polimórfico associou-se à maior chance de fibrose moderada/grave em relação à leve. Não foram encontrados estudos avaliando a relação entre os polimorfismos do gene *HLA-E* e a gravidade da doença hepática, como foi feito neste trabalho.

Os resultados deste trabalho sugerem que, em condições patológicas, como na hepatite C crônica, determinados polimorfismos podem alterar o perfil de expressão das moléculas *HLA*, o que reflete na ação das células NK contra as células afetadas, influenciando o desfecho da resposta imune via *HLA-E* e, consequentemente, a gravidade da doença hepática, representada pela esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. A determinação desses polimorfismos pode

ser útil no manejo clínico e na identificação do paciente de risco para progressão para formas mais avançadas da doença.

Nesta análise identificou-se que o alelo $E^* 01:03:05$, que codifica a proteína $E^* 01:03$ (HLA- E^G), esteve associado à maior chance de expressão da molécula HLA-E na célula de Kupffer. Segundo Olieslagers et al. (2017), o SNP (rs1264457, +756) que codifica a diferença de aminoácidos entre as moléculas HLA- $E^* 01:01$ e $E^* 01:03$ está associado à maior afinidade de ligação peptídica e, consequentemente, à maior expressão de HLA- $E^* 01:03$ na superfície celular em comparação com HLA- $E^* 01:01$ (OLIESLAGERS et al., 2017).

O alelo $E^* 01:01:01:01$ associou-se à maior probabilidade de atividade inflamatória moderada em relação à leve. O alelo $E^* 01:03:02:01$ associou-se à menor probabilidade de fibrose avançada em comparação à fibrose leve. Não há na literatura estudos que tenham avaliado diretamente a relação entre os alelos do gene *HLA-E* e achados histológicos associados à maior gravidade da doença, mas há dados que sugerem associação entre determinados alelos com resolução espontânea da doença, bem como com maior chance de resposta ao tratamento.

Schulte et al. (2009) identificaram que o alelo $E^*01:01$ em homozigose, também conhecido como *HLA- E^R /HLA- E^R* , esteve associado à menor expressão hepática da molécula HLA-E e à resolução espontânea da infecção pelo HCV, enquanto o alelo $E^*01:03$ em homozigose (*HLA- E^G /HLA- E^G*) esteve associado aos casos de infecção crônica pelo HCV. Os mecanismos exatos dessa associação não são totalmente definidos, mas entende-se que a expressão da molécula tem papel crucial nesse processo, levando à ativação ou inibição da célula NK e contribuindo para a eliminação ou persistência do vírus no organismo, respectivamente. Além disso, o papel protetor do *HLA- $E^*01:01$* contra a infecção pelo HCV pode ser devido à regulação positiva do receptor inibitório NKG2A associado ao HCV, que torna as células mais vulneráveis à inibição através das interações HLA-E / NKG2A (PRASETYO et al., 2016).

Guzmán-Fulgencio et al. (2013) estudaram a associação entre variantes dos alelos do gene *HLA-E* e a resposta ao tratamento para hepatite C com alfapecuinterferona e ribavirina. Para tanto, foram avaliados 321 pacientes coinfectados com HCV e HIV, virgens de tratamento para HCV, sendo visto que o alelo $E^*01:01$ foi associado à maior chance de resposta virológica sustentada. O estudo da associação entre os polimorfismos do gene *HLA-E* e a resposta ao tratamento não foi

objetivo do presente estudo.

São escassos os estudos na literatura que avaliaram associações entre HLA classe I e gravidade ou desfecho da doença na hepatite C crônica. Patel et al. (2006) estudaram 670 pacientes com hepatite C crônica e verificaram que alelos *HLA-A* em homozigose e alelos *HLA-B* em heterozigose foram preditores de maior taxa de progressão da fibrose hepática. Nesse mesmo estudo, também foi avaliado o alelo *HLA-C*, porém não foram estudados os alelos de classe I não clássicos, que incluem o *HLA-E*.

A lesão hepática na infecção pelo HCV é determinada por uma complexa interação de fatores do hospedeiro, genéticos e virais. Os resultados do presente estudo sugerem que a pesquisa de fatores imunogenéticos, como a expressão hepática da molécula HLA-E e a identificação de determinados polimorfismos e alelos do gene *HLA-E*, pode ter aplicabilidade no manejo clínico dos pacientes, uma vez que auxilia na discriminação daqueles com maior risco de atingir formas avançadas da hepatite C crônica.

6 CONCLUSÃO

Pacientes com hepatite C crônica apresentam maior grau de expressão da molécula HLA-E no tecido hepático, em comparação com indivíduos não infectados, e essa expressão está associada a níveis elevados de transaminases, maior grau de esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. Os fatores que contribuíram para maior risco de fibrose hepática grave, no presente estudo, foram idade avançada, obesidade e expressão da molécula HLA-E no hepatócito.

Além dos fatores ambientais, do hospedeiro e do vírus, fatores imunológicos e genéticos influenciam na suscetibilidade ou proteção à infecção viral, bem como na evolução da doença. Identificou-se que a expressão hepática da molécula HLA-E e alguns sítios de variabilidade do gene *HLA-E* [+424 T/C (rs1059510), +756 G/A (rs1264457) e +3777 G/A (rs1059655)] podem afetar o prognóstico da doença, uma vez que se associaram com risco diferencial de esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática. Diante da expectativa de maior número de complicações relacionadas às formas avançadas da hepatite C crônica nos próximos anos, o conhecimento de fatores imunogenéticos associados à progressão da doença pode ser útil na discriminação dos pacientes com maior risco de evoluir para formas mais graves da infecção pelo HCV.

REFERÊNCIAS²

² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- ADINOLFI, L. E. et al. Steatosis accelerates the progression of liver damage of chronic hepatitis C patients and correlates with specific HCV genotype and visceral obesity. **Hepatology**, Baltimore, v. 33, n. 6, p. 1358-1364, 2001.
- AFDHAL, N. H. The natural history of hepatitis C. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 24 Suppl 2, p. 3-8, 2004.
- AHMED, K. T. et al. Is the 25-year hepatitis C marathon coming to an end to declare victory? **World Journal of Hepatology**, v. 9, n. 21, p. 921-929, 2017.
- AKAMATSU, N.; SUGAWARA, Y. Liver transplantation and hepatitis C. **International Journal of Hepatology**, New York, v. 2012, p. 686135, 2012.
- BARRETT, J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 263-265, 2005.
- BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. **Hepatology**, Baltimore, v. 24, n. 2, p. 289-293, 1996.
- BOLOTIN, S. et al. Population-based estimate of hepatitis C virus prevalence in Ontario, Canada. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 1, e0191184, 2018.
- BORREGO, F. et al. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 187, n. 5, p. 813-818, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Hepatitis Virais 2017**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a. 68 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b. 143 p.
- BRUNT, E. M. et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. **American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 94, n. 9, p. 2467-2474, 1999.
- CAMPIOTTO, S. et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 41-49, 2005.
- CASTELLI, E. C. et al. HLA-E coding and 3' untranslated region variability determined by next-generation sequencing in two West-African population samples. **Human Immunology**, New York, v. 76, n. 12, p. 945-953, 2015.
- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, New York, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989.

CRUX, N. B.; ELAHI, S. Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections? **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 8, p. 832, 2017.

DAVIS, G. L. et al. Aging of hepatitis C virus (HCV)-infected persons in the United States: a multiple cohort model of HCV prevalence and disease progression. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 138, n. 2, p. 513-521, 2010.

DESBOIS, A. C.; CACOUB, P. Diabetes mellitus, insulin resistance and hepatitis C virus infection: A contemporary review. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 23, n. 9, p. 1697-1711, 2017.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 7-18, 2000.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 68, n. 3, p. 369-395, 2011.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. IPD-IMGT/HLA Database. 2018. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>>. Acesso em: 11 set. 2018.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, Oxford, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FASBENDER, F. et al. Natural Killer Cells and Liver Fibrosis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 7, p. 19, 2016.

FELICIO, L. P. et al. Worldwide HLA-E nucleotide and haplotype variability reveals a conserved gene for coding and 3' untranslated regions. **Tissue Antigens**, Oxford, v. 83, n. 2, p. 82-93, 2014.

FOCACCIA, R. et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 8, n. 5, p. 348-355, 2004.

GOLDEN-MASON, L.; ROSEN, H. R. Natural killer cells: multifaceted players with key roles in hepatitis C immunity. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 255, n. 1, p. 68-81, 2013.

GUZMÁN-FULGENCIO, M. et al. HLA-E variants are associated with sustained virological response in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients on hepatitis C virus therapy. **Aids**, v. 27, n. 8, p. 1231-1238, 2013.

HALDAR, D. et al. Mesenchymal stromal cells and liver fibrosis: a complicated relationship. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 30, n. 12, p. 3905-3928, 2016.

- HEIM, M. H.; THIMME, R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. **Journal of Hepatology**, v. 61, n. 1 Suppl, p. S14-25, 2014.
- HOWELL, W. M.; CARTER, V.; CLARK, B. The HLA system: immunobiology, HLA typing, antibody screening and crossmatching techniques. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 63, n. 5, p. 387-390, 2010.
- ISHII, S.; KOZIEL, M. J. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. **Clinical immunology**, Orlando, v. 128, n. 2, p. 133-147, 2008.
- JACOBSON, I. M. et al. Manifestations of chronic hepatitis C virus infection beyond the liver. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Philadelphia, v. 8, n. 12, p. 1017-1029, 2010.
- JOOSTEN, S. A.; SULLIVAN, L. C.; OTTENHOFF, T. H. Characteristics of HLA-E Restricted T-Cell Responses and Their Role in Infectious Diseases. **Journal of Immunology Research**, Cairo, v. 2016, p. 2695396, 2016.
- KAPLAN, D. E. Immunopathogenesis of Hepatitis C Virus Infection. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 44, n. 4, p. 735-760, 2015.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system. First of two parts. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000.
- KNUT & ALICE WALLENBERG FOUNDATION. The Human Protein Atlas. [s. d.]. Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org>>. Acesso em: 11 set. 2018.
- LINGALA, S.; GHANY, M. G. Natural History of Hepatitis C. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 44, n. 4, p. 717-734, 2015.
- MARCELLIN, P.; ASSELAH, T.; BOYER, N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. **Hepatology**, Baltimore, v. 36, n. 5, Suppl 1, p. S47-S56, 2002.
- MARTINELLI, A. L.; RAMALHO, L. N.; ZUCOLOTO, S. Hepatic stellate cells in hepatitis C patients: relationship with liver iron deposits and severity of liver disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Melbourne, v. 19, n. 1, p. 91-98, 2004.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- NATTERMANN, J. et al. The HLA-A2 restricted T cell epitope HCV core 35-44 stabilizes HLA-E expression and inhibits cytotoxicity mediated by natural killer cells. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 166, n. 2, p. 443-453, 2005.
- NATTERMANN, J. et al. Surface expression and cytotoxic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. **Gut**, London, v. 55, n. 6, p. 869-877,

2006.

NUNNARI, G.; PINZONE, M. R.; CACOPARDO, B. Lack of clinical and histological progression of chronic hepatitis C in individuals with true persistently normal ALT: the result of a 17-year follow-up. **Journal of Viral Hepatitis**, Oxford, v. 20, n. 4, p. e131-137, 2013.

OLIESLAGERS, T. I. et al. New insights in HLA-E polymorphism by refined analysis of the full-length gene. **HLA**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 143-149, 2017.

ORTEGA-PRIETO, A. M.; DORNER, M. Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection. **Vaccines**, Basel, v. 5, n. 3, p. e24, 2017.

PASSOS, A. D. C. et al. Hepatitis C among former athletes: association with the use of injectable stimulants in the past. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, p. 809-812, 2008.

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

PAWLOTSKY, J. et al. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 69, n. 2, p. 461-511, 2018.

PAWLOTSKY, J. M. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 96-102, 2004.

PETRUZZIELLO, A. et al. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An update of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 22, n. 34, p. 7824-7840, 2016.

PRASETYO, A. A. et al. Human Leukocyte Antigen-E Alleles are Associated with Hepatitis C Virus, Torque Teno Virus, and Toxoplasma Co-infections but are not Associated with Hepatitis B Virus, Hepatitis D Virus, and GB Virus C Co-infections in Human Immunodeficiency Virus Patients. **Journal of Global Infectious Diseases**, Mumbai, v. 8, n. 2, p. 75-81, 2016.

RAMALHO, J. et al. HLA-E regulatory and coding region variability and haplotypes in a Brazilian population sample. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 91, p. 173-184, 2017.

REID, M.; PRICE, J. C.; TIEN, P. C. Hepatitis C Virus Infection in the Older Patient. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 31, n. 4, p. 827-838, 2017.

SCHULTE, D. et al. The HLA-E(R)/HLA-E(R) genotype affects the natural course of hepatitis C virus (HCV) infection and is associated with HLA-E-restricted recognition of an HCV-derived peptide by interferon-gamma-secreting human CD8(+) T cells. **Journal of Infectious Diseases**, Philadelphia, v. 200, n. 9, p. 1397-1401, 2009.

SILVA, L. K. et al. Prevalence of hepatitis C virus (HCV) infection and HCV

genotypes of hemodialysis patients in Salvador, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 5, p. 595-602, 2006.

SOUZA, F. F. **Papel dos polimorfismos -238A/G e -308A/G do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), -137 C/G e -607 C/A da interleucina-18 (IL-18), +874 A/T do interferon-gama (IFN-γ) e dos 14 pares de bases D/I do HLA-G na progressão da fibrose hepática em pacientes com hepatite C crônica**. 2011. 176p. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human genetics**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 978-89, 2001.

TAKEHARA, T.; HAYASHI, N. Natural killer cells in hepatitis C virus infection: from innate immunity to adaptive immunity. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Philadelphia, v. 3, n. 10, Suppl 2, p. S78-S81, 2005.

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

THRIFT, A. P.; EL-SERAG, H. B.; KANWAL, F. Global epidemiology and burden of HCV infection and HCV-related disease. **Nature reviews. Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 14, n. 2, p. 122-132, 2017.

VEIGA-CASTELLI, L. C. et al. Non-classical HLA-E gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 79, n. 1, p. 15-24, 2012.

WADA, H. et al. The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 34, n. 1, p. 81-90, 2004.

WANG, L. S.; D'SOUZA, L. S.; JACOBSON, I. M. Hepatitis C-A clinical review. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 88, n. 11, p. 1844-1855, 2016.

WEDEMEYER, H. Hepatitis C. In: _____ (Ed.). **Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease**. 10^a ed. London: Elsevier Health Sciences, 2016. cap. 80,

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 61, n. 1, Suppl, p. S58-S68, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Brief Intervention For Hazardous and Harmful Drinking. A Manual for Use in Primary Care**. DEPENDENCE, D. O. M. H. A. S. World Health Organization: Genebra, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Hepatitis Report, 2017**. World Health Organization: Geneva, 2017.

YOON, J. C. et al. Natural killer cells in hepatitis C: Current progress. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 22, n. 4, p. 1449-1460, 2016.

ZHENG, H. et al. Human leukocyte antigen-E alleles and expression in patients with serous ovarian cancer. **Cancer Science**, Oxford, v. 106, n. 5, p. 522-528, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas com as frequências alélicas e genotípicas dos treze sítios de variabilidade do gene *HLA-E*, distribuídas em categorias segundo graus de esteatose, atividade inflamatória e fibrose hepática.

Frequências alélicas e genotípicas dos treze sítios de variabilidade do gene *HLA-E*, distribuídas em categorias segundo o grau de esteatose hepática

Sítio de variabilidade		Grau 0* n ^o =65	Grau 1* n ^o =31	Grau 2+3* n ^o =16
-113 T/C (rs141224659)	T/T	0,9846	1,0000	0,9375
	T/C	0,0154	0,0000	0,0625
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	T	0,9923	1,0000	0,9688
	C	0,0077	0,0000	0,0313
-104 A/G (rs61356961)	A/A	0,9538	0,8387	0,8750
	A/G	0,0462	0,1613	0,1250
	G/G	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9769	0,9194	0,9375
	G	0,0231	0,0806	0,0625
-26 G/T (rs76971248)	G/G	0,9692	1,0000	1,0000
	G/T	0,0308	0,0000	0,0000
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9846	1,0000	1,0000
	T	0,0154	0,0000	0,0000
+424 T/C (rs1059510)	T/T	0,0923	0,0323	0,0625
	T/C	0,4923	0,3548	0,2500
	C/C	0,4154	0,6129	0,6875
	T	0,3385	0,2097	0,1875
	C	0,6615	0,7903	0,8125
+756 G/A (rs1264457)	G/G	0,2154	0,1935	0,4375
	G/A	0,5231	0,5161	0,1250
	A/A	0,2615	0,2903	0,4375
	G	0,4769	0,4516	0,5000
	A	0,5231	0,5484	0,5000
+1014 T/A (rs41265828)	T/T	0,9846	1,0000	0,9375
	T/A	0,0154	0,0000	0,0625
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	T	0,9923	1,0000	0,9688
	A	0,0077	0,0000	0,0313
+1322 G/A (rs116563630)	G/G	1,0000	0,9355	1,0000
	G/A	0,0000	0,0645	0,0000
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	1,0000	0,9677	1,0000
	A	0,0000	0,0323	0,0000
+1625 G/C (rs11548296)	G/G	0,9385	0,8710	0,8750
	G/C	0,0615	0,1290	0,1250
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9692	0,9355	0,9375
	C	0,0308	0,0645	0,0625
+3468 A/C (rs74295295)	A/A	0,9538	1,0000	0,9375
	A/C	0,0462	0,0000	0,0625
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9769	1,0000	0,9688
	C	0,0231	0,0000	0,0313
+3634 G/A (rs17195376)	G/G	0,9385	0,9677	0,9375
	G/A	0,0615	0,0323	0,0625
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000

Conclusão

Sítio de variabilidade		Grau 0* n ⁿ =65	Grau 1* n ⁿ =31	Grau 2+3* n ⁿ =16
+3634 G/A (rs17195376)	G	0,9692	0,9839	0,9688
	A	0,0308	0,0161	0,0313
+3777 G/A (rs1059655)	G/G	0,0781	0,0323	0,0000
	G/A	0,4375	0,3548	0,3125
	A/A	0,4844	0,6129	0,6875
	G	0,2969	0,2097	0,1563
	A	0,7031	0,7903	0,8438
+4297 G/A (rs9283)	G/G	0,9385	0,9677	0,9375
	G/A	0,0615	0,0323	0,0625
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9692	0,9839	0,9688
	A	0,0308	0,0161	0,0313
+4420 C/T (rs566930407)	C/C	0,9692	1,0000	0,9375
	C/T	0,0308	0,0000	0,0625
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	C	0,9846	1,0000	0,9688
	T	0,0154	0,0000	0,0313

G: Guanina; C: citosina; A: Adenina; T: Timina. nⁿ= número de indivíduos. *Esteatose hepática de acordo com a classificação de Brunt et al., (1999) - grau 0: esteatose ausente, grau 1: esteatose de 1 a 33%, grau 2: de 33 a 66%, grau 3: superior a 66%.

Frequências alélicas e genotípicas dos treze sítios de variabilidade do gene *HLA-E*, distribuídas em categorias segundo a atividade inflamatória hepática

Sítio de variabilidade		A1* n ⁿ =33	A2* n ⁿ =49	A3* n ⁿ =30
-113 T/C (rs141224659)	T/T	0,9697	1,0000	0,9667
	T/C	0,0303	0,0000	0,0333
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	T	0,9848	1,0000	0,9833
	C	0,0152	0,0000	0,0167
-104 A/G (rs61356961)	A/A	0,9091	0,9184	0,9000
	A/G	0,0909	0,0816	0,1000
	G/G	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9545	0,9592	0,9500
	G	0,0455	0,0408	0,0500
-26 G/T (rs76971248)	G/G	0,9394	1,0000	1,0000
	G/T	0,0606	0,0000	0,0000
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9697	1,0000	1,0000
	T	0,0303	0,0000	0,0000
+424 T/C (rs1059510)	T/T	0,1515	0,0204	0,0667
	T/C	0,4242	0,4694	0,3333
	C/C	0,4242	0,5102	0,6000
	T	0,3636	0,2551	0,2333
	C	0,6364	0,7449	0,7667
+756 G/A (rs1264457)	G/G	0,3333	0,1633	0,2667
	G/A	0,4242	0,4898	0,4667
	A/A	0,2424	0,3469	0,2667
	G	0,5455	0,4082	0,5000
	A	0,4545	0,5918	0,5000

Conclusão				
Sítio de variabilidade		A1*	A2*	A3*
		n ⁿ =33	n ⁿ =49	n ⁿ =30
+1014 T/A (rs41265828)	T/T	1,0000	0,9796	0,9667
	T/A	0,0000	0,0204	0,0333
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	T	1,0000	0,9898	0,9833
	A	0,0000	0,0102	0,0167
+1322 G/A (rs116563630)	G/G	1,0000	1,0000	0,9333
	G/A	0,0000	0,0000	0,0667
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	1,0000	1,0000	0,9667
	A	0,0000	0,0000	0,0333
+1625 G/C (rs11548296)	G/G	0,8788	0,9388	0,9000
	G/C	0,1212	0,0612	0,1000
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9394	0,9694	0,9500
	C	0,0606	0,0306	0,0500
+3468 A/C (rs74295295)	A/A	0,9394	0,9796	0,9667
	A/C	0,0606	0,0204	0,0333
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9697	0,9898	0,9833
	C	0,0303	0,0102	0,0167
+3634 G/A (rs17195376)	G/G	0,9091	0,9592	0,9667
	G/A	0,0909	0,0408	0,0333
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9545	0,9796	0,9833
	A	0,0455	0,0204	0,0167
+3777 G/A (rs1059655)	G/G	0,0606	0,0208	0,1000
	G/A	0,4545	0,4375	0,2667
	A/A	0,4848	0,5417	0,6333
	G	0,2879	0,2396	0,2333
	A	0,7121	0,7604	0,7667
+4297 G/A (rs9283)	G/G	0,9091	0,9592	0,9667
	G/A	0,0909	0,0408	0,0333
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9545	0,9796	0,9833
	A	0,0455	0,0204	0,0167
+4420 C/T (rs566930407)	C/C	0,9697	0,9796	0,9667
	C/T	0,0303	0,0204	0,0333
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	C	0,9848	0,9898	0,9833
	T	0,0152	0,0102	0,0167

G: Guanina; C: citosina; A: Adenina; T: Timina. nⁿ= número de indivíduos. *Classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996) - A1: atividade inflamatória leve, A2: atividade moderada, A3: atividade intensa

Frequências alélicas e genotípicas dos treze sítios de variabilidade do gene *HLA-E*, distribuídas em categorias segundo a fibrose hepática

Sítio de variabilidade		F1* n ^o =41	F2* n ^o =32	F3+4* n ^o = 39
-113 T/C (rs141224659)	T/T	0,9756	1,0000	0,9744
	T/C	0,0244	0,0000	0,0256
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	T	0,9878	1,0000	0,9872
	C	0,0122	0,0000	0,0128
-104 A/G (rs61356961)	A/A	0,9024	0,9375	0,8974
	A/G	0,0976	0,0625	0,1026
	G/G	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9512	0,9688	0,9487
	G	0,0488	0,0313	0,0513
-26 G/T (rs76971248)	G/G	0,9756	0,9688	1,0000
	G/T	0,0244	0,0313	0,0000
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9878	0,9844	1,0000
	T	0,0122	0,0156	0,0000
+424 T/C (rs1059510)	T/T	0,1463	0,0000	0,0513
	T/C	0,4634	0,4375	0,3590
	C/C	0,3902	0,5625	0,5897
	T	0,3780	0,2188	0,2308
	C	0,6220	0,7813	0,7692
+756 G/A (rs1264457)	G/G	0,3171	0,1250	0,2564
	G/A	0,4634	0,5313	0,4103
	A/A	0,2195	0,3438	0,3333
	G	0,5488	0,3906	0,4615
	A	0,4512	0,6094	0,5385
+1014 T/A (rs41265828)	T/T	0,9756	1,0000	0,9744
	T/A	0,0244	0,0000	0,0256
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	T	0,9878	1,0000	0,9872
	A	0,0122	0,0000	0,0128
+1322 G/A (rs116563630)	G/G	1,0000	0,9688	0,9744
	G/A	0,0000	0,0313	0,0256
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	1,0000	0,9844	0,9872
	A	0,0000	0,0156	0,0128
+1625 G/C (rs11548296)	G/G	0,9024	0,9375	0,8974
	G/C	0,0976	0,0625	0,1026
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9512	0,9688	0,9487
	C	0,0488	0,0313	0,0513
+3468 A/C (rs74295295)	A/A	0,9756	0,9688	0,9487
	A/C	0,0244	0,0313	0,0513
	C/C	0,0000	0,0000	0,0000
	A	0,9878	0,9844	0,9744
	C	0,0122	0,0156	0,0256
+3634 G/A (rs17195376)	G/G	0,9268	0,9063	1,0000
	G/A	0,0732	0,0938	0,0000
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9634	0,9531	1,0000
	A	0,0366	0,0469	0,0000
+3777 G/A (rs1059655)	G/G	0,0732	0,0000	0,0769
	G/A	0,5122	0,2903	0,3590
	A/A	0,4146	0,7097	0,5641
	G	0,3293	0,1452	0,2564

Conclusão

Sítio de variabilidade		F1* n ^o =41	F2* n ^o =32	F3+4* n ^o = 39
+3777 G/A (rs1059655)	A	0,6707	0,8548	0,7436
+4297 G/A (rs9283)	G/G	0,9268	0,9063	1,0000
	G/A	0,0732	0,0938	0,0000
	A/A	0,0000	0,0000	0,0000
	G	0,9634	0,9531	1,0000
	A	0,0366	0,0469	0,0000
+4420 C/T (rs566930407)	C/C	1,0000	0,9688	0,9487
	C/T	0,0000	0,0313	0,0513
	T/T	0,0000	0,0000	0,0000
	C	1,0000	0,9844	0,9744
	T	0,0000	0,0156	0,0256

G: Guanina; C: citosina; A: Adenina; T: Timina. n^o= número de indivíduos. *Classificação METAVIR (Bedossa; Poynard, 1996) - F1: fibrose portal sem septos, F2: fibrose portal com raros septos, F3 + F4: inúmeros septos sem ou com cirrose

APÊNDICE B - O banco de dados encontra-se gravado em disco compacto.

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2014

Ofício nº 4222/2014
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **“PAPEL DO SISTEMA HLA-E NA INFECÇÃO VIRAL E NA GRAVIDADE DA DOENÇA HEPÁTICA DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 398ª Reunião Ordinária realizada em 10/11/2014 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Pacientes com Hepatite C crônica – versão 1.0, de 09/09/2014** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controles saudáveis – versão 1.0, de 09/09/2014**.

Foram aprovados também, o **“Biorrepositório de amostras de indivíduos saudáveis”**, bem como o **Termo de Consentimento para guarda de material biológico-controles saudáveis** e o **“Biorrepositório de amostras de pacientes com doença hepática crônica pelo vírus da Hepatite C”**, bem como o **Termo de Consentimento para guarda de material biológico-pacientes com Hepatite C crônica**, de acordo com o Processo HCRP nº 13812/2014.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
ROBERTA CHAVES ARAÚJO
PROFª.DRª. ANA DE LOURDES CANDOLO MARTINELLI(Orientadora)
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733;IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B

excelência desde 1956

Ribeirão Preto, 09 de setembro de 2014

Ilma. Sra.
Dra. Marcia Guimarães Villanova
MD Presidente do Comitê de Ética
Hospital das Clínicas da FMRPUSP

Senhora Coordenadora,

Referente ao projeto de pesquisa **“PAPEL DO SISTEMA HLA-E NA INFECÇÃO VIRAL E NA GRAVIDADE DA DOENÇA HEPÁTICA DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA”** solicitamos apreciação quanto a possibilidade de dispensa do TCLE para o grupo de pacientes com hepatite C crônica.

Trata-se de um estudo no qual pretendemos utilizar cento de vinte (120) amostras de fígado congelado, provenientes de biópsias hepáticas realizadas conforme rotina de acompanhamento clínico de pacientes que foram seguidos ou estão em acompanhamento no Ambulatório de Hepatites do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP- USP).

Para a instituição de terapêutica adequada, a rotina de acompanhamento clínico desses pacientes prevê a realização de biópsia hepática. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido no momento da biópsia, autorizando a guarda de material biológico no serviço (amostra de tecido hepático, plasma, soro e DNA). Será feita tentativa de contato com esses pacientes e aplicado termo de consentimento, solicitando a autorização para coleta de dados dos prontuários, coleta de resultado de exames laboratoriais e de biópsia, além de autorização do uso do material biológico para a presente pesquisa. Solicitamos a criação de um biorrepositório ligado a esse projeto de pesquisa.

Não está prevista nenhuma intervenção ou procedimento adicional. Como o material a ser estudado encontra-se arquivado no Laboratório de Gastroenterologia do HCFMRP-USP e como se prevê dificuldades em localizar todos os pacientes, solicita-se a dispensa do TCLE para aqueles pacientes em que não se consiga obter contato.

Os pesquisadores garantem o sigilo e a confidencialidade dos dados do sujeito de pesquisa. Os dados obtidos a partir do material biológico serão utilizados apenas para os fins propostos no estudo.

Atenciosamente,

Roberta Chaves Araújo

Pesquisadora Responsável (pós-graduanda)

Prof. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli
Docente e orientadora

ANEXO C

excelência desde 1956

Ribeirão Preto, 09 de setembro de 2014

Ilma. Sra.
Dra. Marcia Guimarães Villanova
MD Presidente do Comitê de Ética
Hospital das Clínicas da FMRPUSP

Senhora Coordenadora,

Referente ao projeto de pesquisa “PAPEL DO SISTEMA HLA-E NA INFECÇÃO VIRAL E NA GRAVIDADE DA DOENÇA HEPÁTICA DE PACIENTES COM HEPATITE C CRÔNICA” solicitamos apreciação quanto a possibilidade de dispensa do TCLE para o grupo controle (necropsia).

Trata-se de um estudo no qual pretendemos utilizar vinte (20) blocos de parafina contendo tecido hepático, provenientes de necropsias, arquivados no Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Não está prevista nenhuma intervenção ou procedimento adicional. Como o material a ser estudado encontra-se arquivado no Setor de Patologia e como se prevê dificuldades em localizar os familiares ou representantes legais dos pacientes, solicita-se a dispensa do TCLE.

Os pesquisadores garantem o sigilo e a confidencialidade dos dados do sujeito de pesquisa. Os dados obtidos a partir do material de fígado serão utilizados apenas para os fins propostos no estudo.

Atenciosamente,

Roberta Chaves Araújo
Roberta Chaves Araújo
Pesquisadora Responsável (pós-graduanda)

Ana de Lourdes Candolo Martinelli
Profa. Dra. Ana de Lourdes Candolo Martinelli
Docente e orientadora

Ciente: *Luciano Nader Serafini*
Prof. Dr. Luciano Nader Serafini
Chefe do Depto. de Patologia da FMRP-USP

ANEXO D

9/12/2018 E-mail de Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP - 2563563: Your manuscript has been accepted

ROBERTA CHAVES ARAUJO <rcaraujo@hcrp.usp.br>

2563563: Your manuscript has been accepted

Xiaojun Chen <jir@hindawi.com>

24 de abril de 2018 05:59

Responder a: norhan.abdelmajeed@hindawi.com

Para: rcaraujo@hcrp.usp.br

Cc: chenxiaojun0201@126.com, diasfc@gmail.com, brunabertol@usp.br, dms@fmrp.usp.br, lramalho@fmrp.usp.br, eadonadi@fmrp.usp.br, adicmart@gmail.com, andrezacteixeira@gmail.com, fernanda.fernandes.souza2011@gmail.com, marciagvillanova@gmail.com, phaccpn@gmail.com

Dear Dr. Araújo,

The review process of Research Article 2563563 titled "Liver HLA-E expression is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C" by Roberta Araújo, Fabrício C. Dias, Bruna Bertol, Deisy Mara da Silva, Leandra N. Z. Ramalho, Eduardo Antonio Donadi, Ana Martinelli, Andreza Correa Teixeira, Fernanda F. Souza, Márcia G. Villanova and Patrícia H. Almeida submitted to Journal of Immunology Research has been completed. I am pleased to inform you that your manuscript has now been accepted for publication in the journal.

The special issue for which the paper is being processed is
"Differentiation and Function of T Cell Subsets in Infectious Diseases"

The publication process of your manuscript will be initiated upon the receipt of electronic files. Please log in to the Manuscript Tracking System at the link below using your username and password, and upload the electronic files of your final accepted version within the next 2-3 days.

<http://mts.hindawi.com/author/2563563/upload.files/>

The electronic files should include the following:

- 1- Source file of the final accepted manuscript (Word or TeX/LaTeX).
- 2- PDF file of the final accepted manuscript.
- 3- Editable figure files (each figure in a separate EPS/PostScript/Word file) if any, taking into consideration that TIFF, JPG, JPEG, BMP formats are not editable.

Thank you again for submitting your manuscript to Journal of Immunology Research.

Best regards,

Xiaojun Chen
chenxiaojun@njmu.edu.cn

ANEXO E

Journal of Immunology Research

Article title: Liver HLA-E expression is associated with severity of liver disease in chronic hepatitis C

Roberta C. Araújo¹, Fabricio C. Dias⁴, Bruna C. Bertol⁴, Deisy M. Silva³, Patrícia H. Almeida⁴, Andreza C. Teixeira¹, Fernanda F. Souza¹, Márcia G. Villanova¹, Leandra N. Z. Ramalho³, Eduardo A. Donadi², Ana L. C. Martinelli¹

¹Gastroenterology Division, ²Immunology Division, ³Pathology Department, University of Sao Paulo at Ribeirao Preto Medical School, post code: 14048-900 - Ribeirao Preto, Sao Paulo – Brazil.

⁴University of Sao Paulo at Ribeirao Preto Medical School, post code: 14048-900 - Ribeirao Preto, Sao Paulo – Brazil.

Correspondence should be addressed to Roberta C. Araújo, rcaraujo@hcrp.usp.br

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) can escape from innate and adaptive immunity, making the immune response ineffective. Human leukocyte antigen E (HLA-E) might regulate the antiviral function of immune response and contribute to the persistence of HCV and the severity of liver disease. This study aimed to evaluate the expression of HLA-E in the liver and its association with the severity of liver disease in HCV patients. We performed a retrospective analysis of liver biopsies from 125 HCV patients and from 20 control subjects without liver disease. Liver

biopsies were reviewed and classified according to severity of fibrosis and inflammatory activity. The pathologist assessed the magnitude of HLA-E expression in a semiquantitative way, attributing scores from 0 to 3. Immunohistochemistry showed positive for HLA-E in hepatocyte and Kupffer cells. The rate of HLA-E positivity in hepatocytes and Kupffer cells was significantly higher in HCV patients compared to controls. The liver samples classified as severe fibrosis and necroinflammatory activity presented greater expression of HLA-E on Kupffer cells and hepatocytes, with a significant linear association. It indicates that HLA-E expression may have an immunomodulatory effect and a possible role in the severity of liver disease in chronic hepatitis C.

Key words: hepatitis C, HLA-E, innate immunity, liver fibrosis, NK cell.