UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDO CRIVELENTI VILAR

**Expressão do *HLA-G* no tecido hepático de
pacientes coinfectados com HIV/HCV**

Ribeirão Preto

2014

FERNANDO CRIVELENTI VILAR

**Expressão do *HLA-G* no tecido hepático de
pacientes coinfectados com HIV/HCV**

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

Área de Concentração: Clínica Médica
Opção: Investigação Clínica

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

Ribeirão Preto – SP

2014

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.

Vilar, Fernando Crivelenti

Expressão do *HLA-G* no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV. Ribeirão Preto, 2014.

137 p. : Il ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Área de concentração: Clínica Médica. Opção: Investigação Clínica

Orientador: Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca

1. HLA-G, 2. Coinfecção HIV/HCV, 3. Vírus da Hepatite C, 4. HIV, 5. Fibrose hepática

FOLHA DE APROVAÇÃO

VILAR, F.C. Expressão do *HLA-G* no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV.

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

Área de Concentração: Clínica Médica

Opção: Investigação Clínica

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a dois mestres que foram fundamentais na idealização do projeto e na análise das lâminas, respectivamente, **Prof. Dr. José Fernando de Castro Figueiredo** e **Prof. Dr. Sérgio Zucoloto**, que infelizmente não estão mais entre nós. Sobrepondo aos ensinamentos científicos e a relação mestre-aluno estão os exemplos de caráter, sensatez e dedicação à família.

Dedico a minha esposa **Aurélia**, grande incentivadora e companheira, que me deu o maior presente de nossas vidas, a **Isadora**, que nos ensina a cada dia o significado da palavra **AMOR**.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, “que (...) deu seu Filho único, para que todo o que nele crer não pereça” (João 3:16). Obrigado por guiar meus passos.

Aos **meus pais** (João Baptista e Maria Umbelina) e **minha irmã** (Stella), por mostrar que o núcleo familiar é, sem dúvidas, o alicerce para a vida.

Ao **meu padrinho** (Joaquim Antônio), meu primeiro incentivador intelectual, e a **meu tio “Betí”**, que acompanhou somente o início de minha trajetória.

À minha nova/velha família: meus sogro e sogra (**Wilson e Ana**), meus cunhados (**Fernanda, Cláudio e Wilson Junior**) e meus sobrinhos (**Ana Beatriz, Alice e Kaio**), pela paciência dos períodos ausentes durante o doutorado.

Aos professores da Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: **Profa. Dra. Alcyone Artioli Machado**, pelo constante incentivo acadêmico, **Prof. Dr. Benedito Antonio Lopes da Fonseca**, por me “adotar” como seu pós-graduando, **Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**, pelo exemplo de manter as origens, mesmo com sucesso científico, **Prof. Dr. Roberto Martinez**, pelo exemplo de dedicação profissional e familiar, **Prof. Dr. Rodrigo de Carvalho Santana**, pela amizade sincera, **Prof. Dr. Valdes Roberto Bollela**, pela disponibilidade e exatidão das palavras.

Aos **Profs. Drs. Ana de Lourdes Condolo Martinelli e Eduardo Antonio Donadi**, pelas discussões, que foram fundamentais para a confecção deste trabalho.

À **Profa. Dra. Janaina Cristina de Oliveira Crispim**, pelo auxílio na imunohistoquímica e revisões.

Às **Profas. Dras. Ana Paula Moraes Fernandes e Cíntia Almeida Costa**, e à **Luciana Castelar**, pela disponibilidade e colaboração com os polimorfismos do *HLA-G*.

Aos **Médicos Assistentes e Residentes** da Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais, pelo apoio, incentivo e companheirismo do dia a dia.

À **Equipe de Enfermagem** da Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI), pela certeza de poder contar sempre com vocês.

Aos funcionários dos Laboratórios de Virologia, Sorologia e Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Biologia Molecular e Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, e Citometria do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo apoio técnico e realização do genótipo de IL-28.

Aos funcionários da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Adriana e Emerson**, pela paciência e disponibilidade de sempre.

Epígrafe

“Tudo é mais simples do que podemos imaginar e, ao mesmo tempo, mais intrincado do que conseguimos conceber.”

Johann Wolfgang von **Goethe**

Resumo

RESUMO

VILAR, F.C. **Expressão do *HLA-G* no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV**. 2014. 137f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença hepática crônica causada pelo vírus da hepatite C (HCV) tornou-se, nos últimos anos, uma das principais comorbidades dos pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) nos países desenvolvidos. Os pacientes coinfectados com HIV/HCV apresentam uma progressão mais rápida para a cirrose e as suas complicações que os pacientes monoinfectados com HCV. Embora os mecanismos responsáveis por esta evolução não estejam totalmente esclarecidos, a expressão da molécula de HLA-G, um HLA de classe Ib não clássico, que tem propriedades bem reconhecidas na regulação negativa da resposta imune, pode estar relacionada à progressão da doença hepática. Os objetivos deste trabalho foram analisar o perfil de expressão de HLA-G em tecido hepático de pacientes coinfectados HIV/HCV e identificar possíveis variáveis do hospedeiro, do HCV e do HIV que possam estar relacionadas com a expressão de HLA-G na biópsia hepática. Para isso, 57 amostras de biópsia hepática de pacientes coinfectados com HIV/HCV, nas quais a imuno-histoquímica para HLA-G foi realizada, foram analisadas retrospectivamente quanto à expressão desta molécula no tecido hepático. Avaliaram-se também outras características histopatológicas da biópsia como grau de fibrose, atividade inflamatória, deposição de ferro e gordura. Determinou-se o polimorfismo de inserção ou deleção de 14 pares de bases da região 3' não traduzida do exon 8 do gene do *HLA-G*, que está relacionada com a produção de RNA-mensageiro, em 43 destes pacientes, além do polimorfismo de IL-28B, relacionado com a resposta ao tratamento do HCV, em 44 deles. Características bioquímicas e virológicas, tanto do HIV quanto do HCV também foram avaliadas. O genótipo 1 do HCV foi o mais prevalente (87,75%), especialmente o subgenótipo 1a (60%). A expressão do HLA-G foi observada em 38 (66,7%) amostras de fígado, e foi mais frequente em estágios moderados e severos de fibrose do que em estágios mais leves (94,1% x 55%, $P < 0,01$). Não houve relação entre a expressão do HLA-G e os outros parâmetros estudados. Embora a progressão para a cirrose no contexto da coinfecção por HIV/ HCV seja um processo complexo, modulado por muitos factores, a associação da intensidade de fibrose com a expressão do HLA-G pode indicar que a expressão desta proteína desempenha um importante papel nos mecanismos que contribuem para a progressão da doença, por meio da regulação negativa da resposta imune contra o HCV na coinfecção pelo HIV.

Palavras-chave: HLA-G, coinfecção HIV/HCV, vírus da hepatite C, HIV, fibrose hepática

Abstract

ABSTRACT

VILAR, F.C. **Expression of HLA-G of the liver tissue of HIV/HCV coinfectd patients.** 2014. 137f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chronic liver disease induced by hepatitis C virus (HCV) infection has recently become one of the most common comorbidities in patients who are infected with the human immunodeficiency virus (HIV) in developed countries. HIV/HCV coinfectd patients show faster progression to cirrhosis and its complications than the HCV monoinfected patients. Even though the responsible mechanisms for this evolution have not been entirely clarified yet, the expression of the HLA-G molecule, a HLA from the non-classic Ib class, with well-known properties of negatively regulating the immune response, may be related to the liver disease progression. The aims of the present work were to analyze the HLA-G expression profile in the liver micro ambience of HIV/HCV coinfectd patients and to identify possible host factors, HIV or HCV, that may be related to the HLA-G expression on the liver biopsy. For this purpose, 57 liver biopsies of HIV/HCV coinfect patients, in which immunohistochemistry for HLA-G had been performed, were retrospectively analyzed according the HLA-G expression on the hepatic tissue. Other histopathological features in the liver biopsies, such as fibrosis degree, inflammatory activity, iron deposition and fat were also evaluated. The polymorphism of insertion or deletion in 14-base pairs of the 3' non-translated region of exon 8 of the *HLA-G* gene, which is related to the production of HLA-G messenger RNA, was evaluated in 43 of the patients. Also, the polymorphism of IL-28B, related to the response to HCV treatment, was evaluated in 44 of them. Biochemical and virological features of HIV and HCV were also evaluated. The HCV genotype 1 was the most prevalent (87.75%), especially the subgenotype 1a (60%). The expression of HLA-G was observed in 38 (66.7%) samples of the liver biopsies, and it was most frequent in moderate and severe stages of fibrosis than in the mild stages (94.1% x 55%, $P < 0.01$). There was no established relationship between HLA-G and other parameters studied. Although the progression to cirrhosis in the context of HIV/HCV coinfection is a complex process modulated by many factors, the association of HLA-G expression with the intensity of the liver fibrosis may indicate the protein expression play an important role in the mechanisms that contribute to the progression of the disease, through the negative regulation of the immune response against HCV setting of a coinfection with HIV.

Key-words: HLA-G, HIV/HCV coinfection, hepatitis C virus, HIV, liver fibrosis

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	76
Tabela 2 -	Características bioquímicas e hematológicas dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	78
Tabela 3 -	Características relacionadas ao HCV e seu tratamento nos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	81
Tabela 4 -	Efeitos da idade, Gama GT no início do tratamento do HCV, grau de fibrose na biópsia hepática, genótipo do HCV, carga viral do HCV pré-tratamento, controle da infecção pelo HIV e expressão do HLA-G na biópsia hepática, na RVS ao tratamento do HCV de pacientes coinfectados HIV/HCV que realizaram tratamento do HCV pelo menos até a 24 ^a semana e que preencheram critérios estatísticos para a análise. HC-FMRP-USP de 2003 a 2006	84
Tabela 5 -	Influência dos genótipos relacionados à IL28B na RVS ao tratamento do HCV de pacientes coinfectados HIV/HCV que realizaram tratamento do HCV pelo menos até a 24 ^a semana. HC-FMRP-USP de 2003 a 2006	84
Tabela 6 -	Características relacionadas ao HIV dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	85
Tabela 7 -	Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos 14pb do HLA-G e da IL28B nos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	87
Tabela 8 -	Distribuição das características histológicas das biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo	88
Tabela 9 -	Intensidade de expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo	90

Tabela 10 -	Variáveis demográficas, relacionadas à resposta ao tratamento do HCV, ao HIV, genéticas e da biópsia hepática e sua possível relação com a expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo	93
Tabela 11 -	Análise das variáveis relacionadas à biópsia hepática e sua relação com a expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo	95
Tabela 12 -	Variáveis demográficas, relacionadas à resposta ao tratamento do HCV, ao HIV, genéticas e da biópsia hepática e sua relação com classificação semiquantitativa da expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo	96

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	História natural da infecção pelo vírus da Hepatite C	35
Figura 2 -	O genoma do HCV e as poliproteínas processadas com suas respectivas funções	36
Figura 3 -	História natural da Infecção pelo HIV sem tratamento específico	39
Figura 4 -	O genoma do HIV e suas principais proteínas	40
Figura 5 -	Aumento da expressão de HLA-G e HLA-E e consequente inibição de células T e NK pela interação destes antígenos de leucócitos G e E com receptores KIR2DL4 e CD94/NKG2A das células NK	44
Figura 6 -	Mecanismos de interação HIV/HCV na evolução natural do HCV e na gênese da fibrose hepática nos coinfectados HIV/HCV	47
Figura 7 -	Fluxograma para seguimento do tratamento da hepatite C crônica nos pacientes coinfectados com HIV, segundo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, do Departamento de Aids, DST e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil, 2013	50
Figura 8 -	Estrutura das isoformas e dos receptores das proteínas do HLA-G. A) Isoformas ligadas a membrana (G1, G2, G3 e G4) e solúveis (G5, G6, G7 e G1 removida) com seus domínios α e β . B) Receptores das proteínas do HLA-G, com a representação dos domínios ligantes, dos receptores intracitoplasmáticos e das células nos quais são expressos	55
Figura 9 -	Funções imunorreguladoras mediadas pelas isoformas HLA-G1 e HLA-G5 mais ativas do HLA-G, células-alvo e receptores	56
Figura 10 -	A presença de 14 pares de base (+14) na região 3`NT do genoma do HLA-G promove a remoção de 92 bases do éxon 8 (-92), gerando um RNAm de HLA-G mais instável.....	57

- Figura 11 -** A) Trofoblasto obtido de placenta proveniente de aborto espontâneo até a 12^a semana de gestação, corado pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos e visualizado em aumento de 20x. As áreas de cor marrom intenso ao redor dos trofoblastos representam a expressão do HLA-G. B) Trofoblasto obtido de placenta proveniente de aborto espontâneo até a 12^a semana de gestação, corado pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos na qual é suprimido o anticorpo anti-HLA-G. Visualizado em aumento de 20x. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010..... 90
- Figura 12 -** Biópsias hepáticas obtidas pela técnica de punção percutânea, no lobo hepático direito, com agulha Tru-cut de 14 Gauge, guiada por ultrassonografia, e coradas pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos. Visualizado em aumento de 20x. A) Ausência de marcação para HLA-G. B) Marcação leve, de até 30% da lâmina (elipse em preto). A seta em preto aponta para hepatócito marcado dentro da área de expressão. C) Marcação moderada, entre 30 a 60% da lâmina. O círculo e a elipse em preto delimitam aproximadamente as áreas onde ocorrem a expressão, e a seta em preto aponta um hepatócito marcado dentro da área de expressão. D) Marcação intensa, ocorrendo em mais de 60% da lâmina. Neste caso os hepatócitos estão marcados difusamente. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010..... 91
- Figura 13 -** Biópsia hepática obtida pela técnica de punção percutânea, no lobo hepático direito, com agulha Tru-cut de 14 Gauge, guiada por ultrassonografia, e corada pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos. Visualizado em aumento de 40x. Seta branca mostra área de fibrose e a seta amarela mostra marcação de um hepatócito para HLA-G, mais intensa nas áreas próximas à fibrose. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010 92

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Distribuição dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo, de acordo com o genótipo do vírus HCV. n, % do total..... 79
- Gráfico 2 -** Distribuição do número absoluto (porcentagem) de pacientes coinfectados HIV/HCV elegíveis para o estudo que foram submetidos ao tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, de acordo com o tempo total de tratamento 80
- Gráfico 3 -** Variação da média da contagem dos linfócitos T CD4+ no início do tratamento do HCV, no 6º mês, ao final do tratamento e seis meses após o final do tratamento, dos pacientes coinfectados HIV/HCV elegíveis para o estudo que foram submetidos ao tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006. Avaliação realizada em 44 pacientes..... 86

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTG	<i>AIDS Clinical Trials Group</i>
AHID	Ambulatório de Hepatites e Imunodeficiências
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	alanina aminotransferase
anti-HCV	anticorpo contra o vírus da hepatite C
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	células apresentadoras de antígenos
APRICOT	<i>AIDS Pegasys Ribavirin International Coinfection Trial</i>
AST	aspartato aminotransferase
ATHOS	programa de apoio a atenção hospitalar/ambulatorial
AZT	Zidovudina
CCR5	c-c receptor de quimiocina tipo 5
cDC	células dendríticas convencionais
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CD4+	presença de <i>cluster of differentiation 4</i>
CD8+	presença de <i>cluster of differentiation 8</i>
CXCR4	c-x-c receptor de quimiocina tipo 4
CEH	células estreladas hepáticas
CHC	carcinoma hepatocelular
DAA	antiviral de ação direta
DC	<i>dendritic cells</i>
D	Deleção
DP	desvio padrão
E	Envelope
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>enzyme linked immune sorbent assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
G	Guanina
Gama GT	gama glutamiltransferase
Hb	Hemoglobina

HbsAg	Antígeno de superfície da hepatite B
HBV	vírus da hepatite B
HC	hospital das clínicas
HC-FMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HCV	vírus da hepatite C
HIV	<i>human immunodeficiency vírus</i>
HLA	antígeno leucocitário humano
HPA	ambulatório de hepatites
HSH	homens que fazem sexo com homens
HTLV-1	Vírus linfotrópico humano 1
I	Inserção
IAH	índice de atividade histológica
IC	intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT	<i>immunoglobulin-like Transcript</i>
IMC	índice de massa corporal
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs;</i>
KIR	<i>killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MEIA	Imunoensaio Enzimático por Micropartículas
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
NK	<i>natural killer</i>
NS	não estrutural
NT	não traduzida
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PB	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pdc	<i>plasmacytoid dendritic cells</i>
PEG-IFN	interferon peguilado
RBV	Ribavirina
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro

RNA-HCV	ácido ribonucleico do vírus da hepatite C
RVF	resposta virológica final no tratamento da hepatite C
RVP	resposta virológica precoce no tratamento da hepatite C
RVR	resposta virológica rápida no tratamento da hepatite C
RVS	resposta virológica sustentada no tratamento da hepatite C
SC	Subcutâneo
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SP	São Paulo
SRA	síndrome retroviral aguda
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	terapia antirretroviral
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TGF β	<i>transforming growth factor</i>
Th	linfócito T <i>helper</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	fator de necrose tumoral
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UDI	usuários de drogas injetáveis
UETDI	Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas
UTR	região não traduzida
3`NT	região 3` não traduzida
14pb	14 pares de base

Lista de Símbolos e Sinais

LISTA DE SÍMBOLOS E SINAIS

°C	graus Celsius
dL	Decilitro
g	Grama
h	Hora
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas
m	Metros
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimol
mL	Mililitros
m ²	metro quadrado
mm ³	milímetros cúbicos
ng	Nanograma
pmol	Picomols
U	Unidades
UI	unidades internacionais
μM	Micromols
μL	Microlitros
V	Volts
®	marca registrada
%	Porcentagem
±	mais ou menos
↑	Aumento
↓	Diminuição
>	Maior
<	Menor
≥	maior ou igual
≤	menor ou igual

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	34
1.1 O vírus da hepatite C	34
1.1.1 Epidemiologia e história natural da hepatite C.....	34
1.1.2 Estrutura do vírus da hepatite C e sua variabilidade genotípica.....	35
1.1.3 Resposta imunológica na infecção pelo HCV	36
1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	38
1.2.1 Epidemiologia e história natural da infecção pelo HIV	38
1.2.2 Estrutura do HIV e variabilidade genotípica	40
1.2.3 Resposta imunológica na infecção pelo HIV	41
1.2.4 Tratamento da infecção pelo HIV	45
1.3 A coinfeção HIV/HCV	45
1.3.1 Epidemiologia da coinfeção HIV/HCV	45
1.3.2 História natural da coinfeção HIV/HCV	46
1.3.3 A fibrose hepática na coinfeção HIV/HCV	47
1.3.4 Tratamento do HCV na coinfeção HIV/HCV.....	49
1.4 O HLA-G.....	52
1.4.1 Definição	52
1.4.2 Estrutura	53
1.4.3 Função	54
1.4.4 Polimorfismo de 14pb da região 3`NT	56
 2 JUSTIFICATIVA.....	 59
 3 OBJETIVOS	 61
3.1 Objetivo Geral	61
3.2 Objetivos específicos	61
 4 PACIENTES E MÉTODOS.....	 63
4.1 Desenho do estudo e considerações éticas	63
4.2 Pacientes	63
4.2.1 Critérios de inclusão	64

4.2.2 Critérios de exclusão	64
4.3 Métodos	64
4.3.1 Caracterização demográfica dos pacientes	64
4.3.2 Avaliações bioquímicas e hematológicas globais	65
4.3.3 Avaliações relacionadas ao HCV	66
4.3.3.1 Diagnóstico de Hepatite C Crônica	66
4.3.3.2 Detecção quantitativa do RNA-HCV	66
4.3.3.3 Determinação do genótipo do HCV	67
4.3.4 Avaliações relacionadas ao HIV	67
4.3.4.1 Diagnóstico da Infecção pelo HIV	67
4.3.4.2 Quantificação da carga viral do HIV	68
4.3.4.3 Contagem dos linfócitos T CD4+	68
4.3.5 Avaliação de variáveis genéticas dos pacientes	69
4.3.5.1 Extração do DNA	69
4.3.5.2 Processamento das amostras para determinação do genótipo da IL28B	69
4.3.5.3 Processamento das amostras para determinação da Inserção/Deleção dos 14 pares de bases do HLA-G	70
4.3.6 Avaliação da biópsia hepática	71
4.3.6.1 Determinação e avaliação da deposição de ferro no tecido hepático	71
4.3.6.2 Avaliação da esteatose hepática	72
4.3.6.3 Determinação e avaliação da fibrose hepática e do índice de atividade histológica	72
4.3.6.4 Determinação e avaliação da expressão do HLA-G	73
4.3.7 Análise estatística	74
5 RESULTADOS	76
5.1 População de estudo	76
5.1.1 Características demográficas da população de estudo	76
5.1.2 Características bioquímicas e hematológicas da população de estudo	77
5.2 Características relacionadas ao HCV e seu tratamento na população de estudo	78
5.2.1 Resposta Viroológica durante o tratamento do HCV	82
5.2.1.1 Fatores relacionados à Resposta Viroológica Sustentada no tratamento dos pacientes coinfectados HIV/HCV	83
5.3 Características relacionadas ao HIV e seu tratamento na população de estudo	85
5.4 Avaliação das variáveis genéticas da população de estudo	87
5.5 Avaliação da biópsia hepática	88

5.5.1 Hemossiderose, esteatose, fibrose e índice de atividade histológica na biópsia hepática da população de estudo	88
5.5.2 Imuno-histoquímica para HLA-G	89
5.6 Análise comparativa dos fatores que podem estar relacionados à expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas	92
5.6.1 Análise da classificação semiquantitativa da expressão do HLA-G em biópsias hepáticas	95

6 DISCUSSÃO	98
--------------------------	-----------

7 CONCLUSÕES	113
---------------------------	------------

REFERÊNCIAS	115
--------------------------	------------

APÊNDICES.....	132
-----------------------	------------

ANEXOS	135
---------------------	------------

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 O vírus da hepatite C

1.1.1 Epidemiologia e história natural da hepatite C

O vírus da hepatite C (HCV) tem distribuição mundial e sua prevalência vem crescendo nas últimas duas décadas. Estima-se que 170 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas, perfazendo 2,8% da população mundial, sob-risco de desenvolver cirrose ou carcinoma hepatocelular (CHC) como evolução da doença. Tais dados colocam a hepatite C crônica como um dos principais problemas mundiais de saúde pública ⁽¹⁾.

Na América Latina estima-se que 2,5% da população adulta esteja cronicamente infectada pelo HCV ⁽²⁾ e no Brasil esta infecção atinja 1,38% da população entre 10 e 69 anos que vive nas capitais dos estados e no distrito federal ⁽³⁾. Na cidade de Ribeirão Preto – SP a prevalência de anti-HCV em doadores de sangue foi de 1,2% no ano de 2005 ⁽⁴⁾, o que talvez não represente a prevalência real da hepatite C no município, por se tratar de uma população selecionada para o estudo.

O HCV foi identificado em 1989 a partir de um *pool* de plasma de chimpanzés previamente contaminados com soro de pacientes com hepatite crônica não A não B ⁽⁵⁾. Sua transmissão se faz, predominantemente, por via parenteral, por meio de sangue e derivados e material perfuro cortante contaminado ⁽⁶⁾. Esta via de transmissão coloca alguns grupos populacionais, como nos usuários de drogas injetáveis (UDI), entre os de maior prevalência para hepatite crônica C, chegando a atingir 89,8% dos UDI na Tailândia ⁽⁷⁾.

A transmissão sexual do HCV ainda é um tema controverso com frequência não muito bem determinada, ao redor de 2%. Homens que fazem sexo com homens (HSH) aumentam o risco de aquisição sexual da hepatite C, provavelmente por traumatismo causado em relações anais ⁽⁸⁾.

Apesar de conhecidas as formas de transmissão do HCV, 30 a 50% dos pacientes portadores crônicos não possuem fatores de risco e não conseguem identificar com precisão o modo de aquisição do vírus ⁽⁶⁾.

A hepatite C aguda possui resolução espontânea em aproximadamente 15% dos casos e evolui para formas crônicas nos 85% restantes, ambas, na grande maioria, de forma assintomática.

A evolução para formas crônicas pode variar de acordo com o modo de aquisição do vírus e características do hospedeiro ⁽⁹⁾, ocorrendo em menores proporções nas crianças ⁽¹⁰⁾.

A progressão da doença nas formas crônicas ainda divide opiniões: todos os pacientes evoluíram para doença hepática terminal, caso sobrevivessem tempo suficiente, ou apenas um grupo restrito de infectados evoluiria para formas graves da doença hepática ⁽¹¹⁾? Fatores ligados ao hospedeiro, ao vírus e fatores externos, como coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) ou uso de álcool, estão relacionados a esta evolução, mas não são suficientes para explicar a progressão para doença hepática terminal ou CHC ⁽⁹⁾, que pode levar décadas para se desenvolver (figura 1).

Figura 1 – História natural da infecção pelo vírus da Hepatite C (Adaptado de Lauer, G.M.; Walker, B.D. 2001) ⁽¹²⁾ CHC: Carcinoma Hepatocelular

1.1.2 Estrutura do vírus da hepatite C e sua variabilidade genotípica

O HCV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus*, e possui um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples com cerca de 9.600 nucleotídeos. Nesta sequência encontra-se uma fase de leitura aberta (*open reading frame*) que codifica uma poliproteína de 3011 aminoácidos da qual, mediante ação de proteases virais e celulares, originam-se 3 proteínas estruturais (C [capsídeo], E1 e E2 [envelope]) e 7 proteínas não estruturais (NS) a saber: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5N (figura 2). Tais proteínas NS têm ganhado grande destaque nos últimos anos, pois são alvos de drogas antivirais de ação direta (DAA), recentemente liberadas para tratamento da hepatite C ⁽¹³⁾.

Figura 2 – O genoma do HCV e as poliproteínas processadas com suas respectivas funções (Adaptado de Lauer, G.M.; Walker, B.D. 2001) ⁽¹²⁾.

O genoma do HCV possui ainda regiões não traduzidas (*untranslated non-coding region* [UTR]) em suas extremidades 3' e 5', sendo esta última a mais conservada do genoma, importante no processo de replicação viral e na detecção de diferentes genótipos ⁽¹⁴⁾.

A heterogeneidade genética do HCV permitiu identificar até o momento 7 genótipos com pelo menos 30% de divergência em sua sequência, nomeados por algarismos arábicos de 1 a 7, e mais de 50 subtipos com aproximadamente 20% de variabilidade genética, nomeados por letras minúsculas acompanhando o genótipo (1a-c, 2a-c, 3a, etc) ⁽¹³⁾.

A variabilidade genotípica do HCV possui implicações epidemiológicas (com diferentes genótipos predominando em diferentes países e continentes) e terapêuticas (diferentes genótipos com respostas distintas ao tratamento), o que dificulta a existência de vacinas e de um tratamento padrão para este vírus, motivando a pesquisa de DAA ⁽¹³⁾.

1.1.3 Resposta imunológica na infecção pelo HCV

O tecido hepático é composto principalmente por hepatócitos, que correspondem a aproximadamente 80% das células deste órgão. As demais são divididas entre células epiteliais dos ductos biliares (1%), células estreladas (<1%), células do endotélio sinusoidal (10%), macrófagos – que no tecido hepático recebem o nome de células de Kupffer (4%) – e linfócitos (5%) ⁽¹⁵⁾. Os dois últimos grupos celulares são de fundamental importância na resposta imunológica em doenças hepáticas.

Na hepatite C aguda o evento inicial da resposta imune se deve às células *Natural Killer* (NK) que reconhecem o patógeno e contribuem para o controle da replicação viral por

meio de lise dos hepatócitos infectados, produção de citocinas (como interferon gama) inibitórias da replicação viral e ativação de células dendríticas (DCs, do inglês: *Dendritic cells*) e células T. As DCs, por sua vez, têm um papel importante na apresentação de antígenos do HCV, ligando a resposta imune inata à adaptativa (humoral e celular) ⁽¹⁶⁾.

A resposta imune humoral aparece geralmente após sete a oito semanas da infecção aguda, sendo anticorpos contra a proteína NS3 e proteínas do *core* os primeiros a serem detectados ⁽¹⁶⁾.

A resposta imune celular envolvendo linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos T *helper* CD4+ tem um papel fundamental no controle da infecção pelo HCV e a polarização entre resposta *Thelper*1 (Th1) e *Thelper*2 (Th2) parece estar entre os mecanismos principais que levam à cura ou a cronificação do vírus ⁽¹⁷⁾. Pacientes que controlam a infecção pelo HCV possuem uma vigorosa resposta Th1, com produção de Interleucina 2 (IL-2) e interferon gamma (IFN γ), importantes estimuladores da resposta imune antiviral do hospedeiro, incluindo células T citotóxicas e ativação de células NK. Já os pacientes nos quais há a cronificação do HCV ocorre resposta Th2, com produção de IL-4 e IL-10, que aumentam a produção de anticorpos e diminuem a resposta Th1 ⁽¹⁸⁾.

A polarização da resposta Th1 e Th2, como mencionado acima, é um dos principais fatores para a cronificação da infecção pelo HCV. Outros fatores relacionados ao próprio vírus também são importantes no escape ao sistema imune: a proteína estrutural E2 tem a capacidade de se ligar ao receptor CD81 da membrana das células NK, diminuindo a função destas ⁽¹⁸⁾; as proteínas E1 e NS3 diminuem, *in vitro*, a ação das DCs ⁽¹⁶⁾; a heterogeneidade do HCV, principalmente na região responsável pela codificação da proteína E2, torna os anticorpos neutralizantes pouco efetivos ⁽¹⁸⁾. Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos de escape do HCV à resposta imune, os fatores que determinam a polarização da resposta Th1 e Th2 ainda requerem mais estudos ⁽¹⁷⁾.

Nos últimos anos, o antígeno leucocitário humano, não clássico, de classe I - G (HLA-G), inicialmente descrito com a função de conferir ao feto proteção contra resposta imunológica materna sendo para isso expresso em trofoblasto ⁽¹⁹⁾, vem adquirindo importância em outros cenários, incluindo a infecção pelo HCV. Weng e col (2011) demonstraram em 67 pacientes monoinfectados pelo HCV que os níveis séricos de proteínas solúveis do HLA-G (sHLA-G e HLA-G5), além de citocinas estimuladoras da produção destas moléculas (IL-10 e IFN γ), estão dramaticamente aumentados ⁽²⁰⁾. A promoção de mudança no equilíbrio Th1/Th2 para polarização Th2 está entre as funções do HLA-G no

sistema imune ⁽²¹⁾. Assim, o HLA-G pode auxiliar, entre outros fatores, neste padrão de resposta na hepatite C crônica, contribuindo na cronificação da doença.

1.2 O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

1.2.1 Epidemiologia e história natural da infecção pelo HIV

O vírus HIV possui epidemiologia complexa, diversificada e dinâmica. Em 2013 aproximadamente 34 milhões de pessoas viviam com HIV no mundo, com estimativa de que 0,8% da população em idade reprodutiva estivesse infectada pelo vírus, proporção que se mantém estável na última década. O pico de incidência de casos novos de infecção pelo HIV ocorreu em 2001, com 2,4 milhões naquele ano. A instituição de Terapia Antirretroviral (TARV) em determinadas regiões do globo, como na África Subsaariana, fez com que esta incidência diminuísse nos últimos dez anos, mas em regiões e subpopulações específicas ela continua estável ou até aumentando. Esses, entre outros motivos, tornam infecção pelo HIV um importante problema de saúde pública em diversos países ^(22;23).

Essa situação epidemiológica não é diferente na América Latina, que possui uma grande heterogeneidade regional e ocupa o 4º lugar no mundo entre as regiões de maior prevalência do HIV, com aproximadamente 0,5% da população em idade reprodutiva infectada ⁽²⁴⁾. O Brasil, que se destaca regionalmente por ser o país com maior número de pacientes em TARV na América Latina ⁽²⁵⁾, possui por volta de 0,6% da população infectada pelo HIV, número que vem se mantendo estável desde 2004. Entretanto, assim como em outras regiões do mundo, tem havido um aumento da prevalência em grupos populacionais específicos ⁽²⁶⁾. Em Ribeirão Preto – SP não há estudos populacionais publicados a respeito da prevalência da infecção pelo HIV. Até Março de 2012 a cidade havia notificado 6.940 casos de Aids (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome* ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA) e pacientes infectados pelo vírus HIV, com coeficiente de incidência de 30,5 casos/100.000 habitantes no ano de 2011 ⁽²⁷⁾, um pouco maior que o estado de São Paulo, que foi de 21,9 casos/100.000 habitantes para mesmo ano ⁽²⁸⁾.

O HIV foi isolado pela primeira vez em 1983 a partir de linfonodo de paciente com risco para Aids ⁽²⁹⁾, síndrome descrita 2 anos antes nos Estados Unidos ⁽³⁰⁾. As principais vias

de transmissão do vírus (contato sexual e sangue contaminado) já haviam sido descritas por estudos epidemiológicos realizados em 1981 e 1982, antes mesmo do seu isolamento ⁽³¹⁾. A possibilidade de transmissão vertical mãe-filho foi descrita em 1983 ⁽³²⁾. As transmissões sexual e parenteral com sangue contaminado são, em grupos específicos (HSH, profissionais do sexo e UDI), responsáveis pelo aumento do número de casos de HIV em algumas regiões na atualidade ⁽²³⁾.

Independente do modo de aquisição do vírus, 50 a 90% dos casos podem apresentar a Síndrome Retroviral Aguda (SRA), nome que recebe o conjunto de sinais e sintomas inespecíficos desenvolvidos pelo paciente infectado de uma a quatro semanas após o contato com o HIV. É caracterizada por febre, adenomegalia, dores musculares e erupção cutânea, com duração média de 14 a 21 dias e autolimitados, o que dificulta o diagnóstico da infecção neste momento ⁽³³⁾. Após esta fase de intensa atividade do sistema imunológico, o paciente passa para uma latência clínica, sem sintomas de doença ativa. Entretanto o HIV continua a se replicar, não havendo, portanto, latência virológica. A latência clínica pode se estender de 6 meses a mais de 10 anos sem tratamento específico e depende de fatores relacionados ao hospedeiro e ao próprio vírus ⁽³⁴⁾, quando então o paciente passa a apresentar sinais e sintomas que sugerem imunodeficiência ⁽³⁵⁾. A história natural da infecção pelo HIV sem tratamento específico está representada na figura 3.

Figura 3 – História natural da Infecção pelo HIV sem tratamento específico (Adaptado de Fauci, A.S.; Pantaleo, G.; Stanley, S.; Weissman, D. 1996) ⁽³⁵⁾. SRA: Síndrome Retroviral Aguda

1.2.2 Estrutura do HIV e variabilidade genotípica

O HIV pertence à família *Retroviridae*, que tem como material genético RNA, e depende de transcrição reversa por uma enzima DNA polimerase RNA-dependente (chamada de transcriptase reversa) para iniciar seu ciclo de replicação. Esta família é dividida em vários gêneros, entre eles o *Lentivirinae*, que se caracteriza por vírus com longos períodos de latência, no qual o HIV está inserido ⁽³⁶⁾.

O genoma do HIV (figura 4) é composto por 9 genes sendo 3 principais (*gag*, *env* e *pol*), que codificam proteínas estruturais do capsídeo e do envelope viral (p17, p24, p7, gp120 e gp41) e enzimas fundamentais para replicação (p66, p32 e p11) ⁽³⁷⁾. As principais medicações que compõem a Terapia Antirretroviral (TARV) disponível (com exceção do maraviroque) atuam justamente nos produtos e subprodutos destes 3 genes ⁽³⁸⁾. Os outros 6 genes chamados de acessórios, apesar no nome, têm importante função regulatória na replicação do HIV e no escape do vírus ao sistema imunológico ⁽³⁷⁾.

Figura 4 – O genoma do HIV e suas principais proteínas (Adaptado Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 Infection. <http://hivbook.com>) ⁽³⁹⁾. gp: glicoproteína; p: proteína. O número indica o peso molecular em kilodaltons (kD).

A análise filogenética do HIV a partir do genoma de um ancestral comum permitiu classificá-lo em 2 tipos de vírus diferentes, o HIV-1 e o HIV-2. Este último, que possui até 25% de diferença genotípica em relação ao primeiro, é menos transmissível, provoca queda mais lenta de linfócitos TCD4+ e maior tempo de progressão clínica, e sua distribuição é restrita no mundo ⁽⁴⁰⁾. O HIV-1, responsável direto pela pandemia, é subdividido, até o momento, em 4 grupos: M (do inglês *main*, ou principal), N (do inglês *non-M, non-O*), O (do

inglês *outlier*)⁽⁴¹⁾ e P, este último descrito em 2009⁽⁴²⁾. O grupo M possui ainda nove subtipos (de A a K), sendo que o A e o F apresentam variabilidade genotípica, sendo reclassificados em sub-subtipos (A1 a A5 e F1 e F2). Existem ainda formas recombinantes únicas (*URF*, do inglês *unique recombinant form*), originadas de apenas um indivíduo ou grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico, e as formas recombinantes circulantes (*CRF*, do inglês *circulating recombinant form*), identificadas em mais de três indivíduos sem vínculo epidemiológico⁽⁴³⁾, que são formas híbridas de vírus já descritos.

Esta variabilidade genética do HIV-1 é originada, entre outros fatores, pelo *turnover* do vírus, com cerca de 10^{10} vírions produzidos diariamente em um indivíduo sem tratamento específico, e da alta taxa de erros da transcriptase reversa na incorporação de nucleotídeos⁽⁴⁴⁾. O significado clínico deste polimorfismo genético parece estar relacionado com a dificuldade detecção viral em certos testes sorológicos, tempo de evolução para imunodeficiência, resistência a antirretrovirais, desenvolvimento de vacinas e monitoramento de epidemias. As estratégias de tratamento atuais parecem não sofrer influência deste polimorfismo, pois a terapia é eficaz para uma ampla gama de subtipos do HIV⁽⁴⁵⁾.

1.2.3 Resposta imunológica na infecção pelo HIV

O curso da infecção pelo HIV causada por subtipo viral idêntico pode variar, dependendo do hospedeiro⁽⁴⁶⁾. Uma parcela pequena desses consegue controlar o vírus sem o uso de terapia específica (controladores de elite)⁽⁴⁷⁾ e alguns grupos populacionais parecem ser resistentes à infecção pelo HIV apesar da alta exposição e comportamento de risco em áreas de alta prevalência (indivíduos soronegativos altamente expostos)⁽⁴⁸⁾. Essas observações atestam quão extraordinariamente complexas são as relações entre o HIV e o sistema imune humano. Apesar dos controladores de elite e dos indivíduos soronegativos altamente expostos, a grande maioria dos pacientes portadores do HIV sem tratamento sofrerão, ao longo da infecção, disfunção de praticamente todos os elementos do sistema imune, sendo a patogênese desta ocorrência multifatorial⁽⁴⁹⁾.

O primeiro componente da resposta imune que entra em contato com o HIV provavelmente são as DCs, que se localizam no interior do epitélio escamoso e colunar (células dendríticas convencionais, cDCs), e no sangue periférico e demais tecidos (células dendríticas plasmocitóides, pDCs). A ligação e entrada do HIV às DCs, bem como às outras

células do sistema imune, são mediadas pelo receptor CD4 e por outros receptores de quimiocinas como CCR5 e CXCR4⁽⁵⁰⁾. As funções das DCs em resposta a uma infecção viral em um indivíduo saudável seriam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-15 e IL-18) que estimulariam células NK e a produção de interferons do tipo I (com ação antiviral, estimulação da apresentação de antígenos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) de classe I e recrutamento de células T no sítio de infecção). As células NK, ativadas pelas DCs, produziram $\text{INF}\gamma$, que por sua vez promoveria a maturação das DCs para apresentação de antígenos e estimulariam resposta Th1. Entretanto, na infecção pelo HIV tanto as DCs quanto as células NK têm suas funções primordiais alteradas⁽⁵⁰⁾.

As cDCs têm sua função prejudicada devido à interações virais diretas e mecanismos indiretos, levando inclusive a uma disseminação do vírus. Um exemplo da influência direta de glicoproteínas do HIV na função das cDCs é a ligação da gp120 com a *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN), que em situações normais participa da passagem das cDCs pelo endotélio, na ligação com linfócitos T e reconhecimento de haptenos de patógenos. Ligada à gp120, a DC-SIGN internaliza o HIV em endossomo, deixando-o intacto, enquanto é transportado para linfonodos, onde há grande população de linfócitos T CD4+, contribuindo para a disseminação da infecção⁽⁵⁰⁾. Um mecanismo indireto da disfunção das cDCs pode ser atribuído a produção aumentada de IL-10 (citocina que inibe a produção de elementos essenciais na resposta antiviral, como IL-2 e $\text{INF}\gamma$) por monócitos durante a infecção pelo HIV⁽⁵¹⁾. Esta disfunção cDCs contribui para a ausência de imunidade adaptativa antiviral eficaz. Entretanto, pDCs são ativadas pelo HIV a produzir interferons do tipo I, os quais inibem a replicação viral, mas podem contribuir para morte de células CD4 + T. Este fato decorre da produção de quimiocinas pelas pDCs que atraem células T ao sítio de infecção, fornecendo uma fonte de novas células para a invasão pelo HIV. Assim, as pDCs também têm um efeito deletério durante a infecção pelo HIV⁽⁵⁰⁾.

As funções das células NK descritas acima também sofrem alterações que favorecem a perpetuação da infecção pelo HIV. O mecanismo pelo qual o HIV leva a disfunção das células NK não está claro, podendo estar relacionado com a expressão de HLA específicos na infecção pelo HIV⁽⁵²⁾. O que se sabe é que a responsividade das células NK aos IFN tipo I é menor, e que elas perdem a capacidade de eliminar DCs imaturas. Com o aumento das DCs imaturas há uma diminuição de apresentação de antígenos a células T (que é feito pelas DCs maduras), interferindo na qualidade da resposta imune adaptativa⁽⁵⁰⁾.

Mecanismos intracelulares de resposta à infecção retroviral também estão alterados na infecção pelo HIV. As *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme* (APOBEC) são proteínas do grupo das citidina deaminases que têm como alvo as citosinas, convertendo-as em uracila na fita de DNA ou RNA, bloqueando a replicação viral intracelular. A proteína *vif* do HIV tem a propriedade de se ligar a APOBEC3G diminuindo a expressão das APOBECs e impedindo a ação dessas⁽⁵³⁾.

A resposta TCD8+ específica para o HIV é o principal fator responsável pelo controle da replicação viral nas primeiras semanas de infecção. Essas células liberam perforina e granzima B que induzem a morte de linfócitos T CD4+ infectados pelo HIV, além de secretar citocinas, como IL-2, garantindo a qualidade das respostas CD8+ específicas⁽⁵⁴⁾. Assim, há uma queda da carga viral do HIV após o primeiro mês de infecção estabelecendo o *set point* viral, que é o equilíbrio da carga viral do HIV após a infecção aguda, e tem relação com o tempo de latência clínica, sendo este maior quanto menor o *set point* viral⁽⁵⁵⁾. Entretanto, à medida que a infecção evolui e há persistência de viremia, a resposta TCD8+ vai se exaurindo. Mutações do HIV que afetam a interação e a apresentação de antígenos pelo HLA, o reconhecimento por receptores dos próprios linfócitos T (TCR) e o processamento de epítomos mutantes⁽⁵⁶⁾, *downregulation* do MHC de classe I pela proteína *nef* do HIV⁽⁵⁷⁾, além de uma polarização para resposta Th2 com diminuição do estímulo citotóxico⁽⁵⁸⁾, são alguns dos mecanismos que o HIV encontra para se perpetuar, a despeito da presença dos linfócitos TCD8+.

Contrapondo a vigorosa resposta TCD8+ no início da infecção pelo HIV, a disfunção dos linfócitos TCD4+, tanto quantitativa quanto qualitativa, já acontece precocemente, sendo a principal característica da doença, utilizada até mesmo como controle de tratamento⁽⁵⁹⁾. Isto acontece pois essa célula expressa tanto CD4 quanto CCR5 ou CXCR4, fundamentais para a invasão celular pelo HIV. Devido à morte maciça delas, sua função de células *Thelper* é cada vez mais comprometida, levando inclusive a ineficiência relativa das respostas TCD8+⁽⁵⁴⁾.

A resposta humoral inicial à infecção pelo HIV é essencialmente dirigida a epítomos das glicoproteínas do envelope, que não tem ação neutralizante. O surgimento de anticorpos neutralizantes acontece meses após a infecção⁽⁶⁰⁾, sendo importantes na organização da resposta imune inata, mas não suficiente para eliminação do HIV⁽⁶¹⁾.

Fatores genéticos do próprio hospedeiro relacionados à expressão dos antígenos de leucócitos humanos (HLA) têm ganhado destaque na participação da resposta imune e susceptibilidade ao HIV. Pacientes que expressam HLA-B Bw4-80I na apresentação de antígenos aos receptores *killer cell immunoglobulin-like receptor* (KIR) 3DS1 na superfície de

células NK durante a infecção aguda do HIV são capazes de clarear com mais facilidade a infecção dos linfócitos e retardar a progressão da doença ⁽⁶²⁾. Por outro lado, pacientes que possuem genótipos específicos de HLA-E e HLA-G têm, como fator independente, 12,5 vezes mais risco de adquirir HIV em relações heterossexuais que os pacientes de genótipos distintos a esses ⁽⁶³⁾.

Esse fato pode ser explicado levando em conta o aumento da expressão e da função desses dois antígenos leucocitários humanos de classe Ib não clássicos, HLA-G e HLA-E, no sistema imune durante a infecção pelo HIV. Ao contrário dos HLA-A e -B que possuem sua expressão diminuída na infecção pelo HIV, o HLA-G e -E estão com sua expressão aumentada. Níveis elevados de IL-10 (que estimula a expressão do HLA-G) produzida por monócitos na infecção pelo HIV (estímulo da gp41 do HIV) e a não ligação da proteína *nef* com esse HLA (devido a um domínio citoplasmático com uma cauda menor – vide adiante em HLA-G) permitiriam esse aumento na sua expressão. Já a expressão do HLA-E seria estimulada diretamente pela sequência de aminoácidos 14-22 da proteína p24 do HIV. A função desses dois HLA, entre outras, seria a de inibição da ação das células NK, interagindo com receptores KIR2DL4 e CD94/NKG2A destas células (figura 5). Inibidas, as NK não eliminam as células com menor padrão de expressão de HLA de classe I, que por sua vez não estimulam suficientemente os linfócitos T CD8+, levando a um prejuízo da resposta citotóxica ⁽⁵²⁾.

Figura 5 – Aumento da expressão de HLA-G e HLA-E e consequente inibição de células T e NK pela interação destes antígenos de leucócitos G e E com receptores KIR2DL4 e CD94/NKG2A das células NK. (Adaptado de Piyush Tripathi and Suraksha Agrawal, 2007) ⁽⁵²⁾. HLA: antígenos de leucócitos humanos; IL: interleucina; KIR: *killer cell immunoglobulin-like receptor*; NK: *natural killer*.

Assim, há evidências relevantes da participação de HLA na modulação da infecção pelo HIV ⁽⁶⁴⁾.

1.2.4 Tratamento da infecção pelo HIV

A terapia antirretroviral modificou sobremaneira a mortalidade dos pacientes portadores de HIV ⁽⁶⁵⁾. Ela é a única opção para a grande maioria dos infectados reduzir a viremia plasmática de HIV, resgatar e conservar o sistema imunológico, reduzir a progressão clínica e a mortalidade relacionada à AIDS, e deve ser iniciada o quanto antes⁽⁶⁶⁾. Segundo o Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos do Ministério da Saúde (2013), a terapia antirretroviral está indicada a todo indivíduo portador do HIV com contagem de células TCD4+ menor ou igual a 500 células/mm³ ⁽⁶⁷⁾.

A primeira droga liberada para o tratamento de pacientes portadores do HIV foi a Zidovudina (AZT) em 1987. Somente em 1995, com a liberação de uma segunda classe de drogas antirretrovirais, os inibidores de protease, a terapia antirretroviral se tornou altamente eficaz. A partir de então, a combinação de duas drogas da classe dos inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (da qual o AZT faz parte) com uma droga de outra classe passou a ser chamado de *HAART* (do inglês, *highly active antiretroviral therapy*), trazendo impacto na sobrevida ^(65;68). O Brasil dispõe hoje de representantes das seis classes de antirretrovirais disponíveis no mundo. Como a composição da TARV bem como suas indicações e contraindicações específicas não são foco deste trabalho, para maiores detalhes consultar o Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos do Ministério da Saúde (2013)⁽⁶⁷⁾.

Apesar da eficácia da *HAART*, a interação entre drogas limita o tratamento de doenças que se associam ao HIV, como é o caso do HCV, por potencializar efeitos colaterais ^(69;70).

1.3 A coinfeção HIV/HCV

1.3.1 Epidemiologia da coinfeção HIV/HCV

A coinfeção pelos vírus HCV e HIV ganhou importância após a instituição da *HAART* para o tratamento do HIV. Em áreas onde esse tratamento é disponível, a doença hepática terminal causada pelo HCV tornou-se a principal causa de mortalidade entre os pacientes portadores do HIV ^(71;72).

A distribuição da coinfeção HIV/HCV é mundial e possui prevalência muito variável, dependendo, principalmente, do fator de risco comum para aquisição das infecções. Em pacientes UDI a prevalência de anti-HCV nos portadores de HIV pode chegar a 95% e em HSH pode variar de 1 a 12% ⁽⁷³⁾. No Brasil, diversos estudos regionais avaliaram a prevalência de portadores de HCV entre os pacientes com HIV, com números que variam de 4,1 a 53,8% ⁽⁷⁴⁾. Em Ribeirão Preto – SP, um estudo desenvolvido em nossa Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas (UETDI) no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP), mostrou prevalência de 16,1% de coinfeção com HCV em 701 pacientes portadores de HIV avaliados ⁽⁷⁵⁾.

1.3.2 História natural da coinfeção HIV/HCV

A infecção aguda pelo HCV, como descrito anteriormente, leva à cronificação cerca de 85% dos pacientes ⁽⁹⁾. Quando esta infecção ocorre em pacientes portadores do HIV, pelo menos 90% deles adquirirão a hepatite C crônica. A presença do HIV ainda aumenta risco de se adquirir HCV em relações heterossexuais e na transmissão vertical mãe-filho, que é baixo nos monoinfectados com vírus C ⁽⁷⁶⁾.

A presença do HCV parece não ter grande influência na história natural do HIV. Há controvérsia entre alguns estudos que, de um lado, apontaram um menor ganho de linfócitos T CD4+ nos pacientes coinfectados com HCV após a introdução da HAART ⁽⁷⁷⁾ e, de outro, não encontram tal diferença ⁽⁷⁸⁾. O que parece haver nos pacientes coinfectados é uma ativação ainda maior do sistema imune, que já ocorre nos monoinfectados pelo HIV ^(79;80). Caso o tratamento antirretroviral para o HIV não seja feito precocemente, a coinfeção poderá aumentar a velocidade de queda dos linfócitos T CD4+ ⁽⁸¹⁾.

O maior impacto da coinfeção HIV/HCV é, sem dúvidas, na evolução da hepatite C crônica. Em vigência da coinfeção há maior carga viral do HCV, risco duas vezes maior de evolução para cirrose em até um terço do tempo e seis vezes maior para doença hepática terminal em metade do tempo, maior evolução dos graus de fibrose hepática e redução na resposta ao tratamento do HCV baseado em IFN ^(76;82-85), quando comparados a monoinfectados pelo vírus da hepatite C.

A fisiopatogenia da maioria dessas interações negativas do HIV na evolução natural da hepatite C crônica pode ser explicada a partir da intersecção das respostas imunológicas a esse

vírus e ao HCV descritas anteriormente (figura 6). Na infecção pelo HIV, as células NK, responsáveis pela resposta inicial ao HCV, e as DCs, responsáveis pela apresentação de antígenos ⁽¹⁶⁾, possuem suas funções completamente alteradas ^(50;51), explicando a maior cronificação da infecção aguda pelo HCV em pacientes com HIV. Além disso, há uma polarização da resposta imune na forma Th2 ⁽⁵⁸⁾, o que diminuiria a resposta a infecções virais no hospedeiro, contribuindo para a cronificação do HCV e a diminuição da resposta terapêutica ⁽⁷⁶⁾.

Figura 6 – Mecanismos de interação HIV/HCV na evolução natural do HCV e na gênese da fibrose hepática nos coinfectados HIV/HCV. (Adaptado de Rotman,Y.; Liang,T.J.; 2009) ⁽⁸⁶⁾. DC: do inglês, *Dendritic cells*; Cel B: linfócito B; Cel T: linfócito T; LPS: lipopolissacarídeo; MHC: do inglês, *major histocompatibility complex*; NK: do inglês, *natural killer*.

1.3.3 A fibrose hepática na coinfeção HIV/HCV

O ponto mais intrigante em relação à interação negativa da infecção pelo HIV na evolução natural do HCV é a fibrose hepática. A fibrose hepática é a característica histopatológica de maior valor prognóstico e importante preditor de evolução da doença

hepática na hepatite crônica, com participação na patogenia da doença hepática terminal, não somente nas de etiologia viral ⁽⁸⁷⁾. Na coinfeção HIV/HCV, graus mais avançados de fibrose acontecem com o dobro da frequência que nos monoinfectados com HCV e o tempo para a evolução da cirrose é até três vezes mais rápido ^(83;84).

A progressão acelerada da fibrose hepática nos pacientes coinfectados ainda não é totalmente esclarecida, existindo várias propostas para explicar este complexo mecanismo (figura 6). Essas hipóteses incluem ativação imune no microambiente hepático causada pela translocação bacteriana presente nos coinfectados ⁽⁸⁸⁾, alterações imunológicas causadas pelo próprio HIV ⁽⁷⁶⁾ e efeito viral direto do HIV em hepatócitos e, principalmente, em células estreladas hepáticas (que nas doenças hepáticas crônicas assumem um fenótipo de miofibroblastos altamente ativos, desempenhando um papel central na fibrogênese hepática, sendo uma das principais produtoras da matriz extracelular) ^(89;90).

Nos estágios iniciais da infecção pelo HIV há uma rápida replicação viral em tecido linfóide intestinal. Neste local o HIV se replicaria em linfócitos T CD4+ que expressam CCR5. Assim, a população linfocitária intestinal é depletada nos primeiros meses da infecção, causando desorganização da resposta imune local, o que permite translocação bacteriana ⁽⁹¹⁾. A presença de antígenos bacterianos no sangue, principalmente o lipopolissacáride (LPS) de membrana de bactérias Gram negativas, afeta diretamente células de Kupffer, que são estimuladas, via *Toll-like receptor* (TLR) 4, a produzir citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas como fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, *tumor necrosis factor*) α , IL-1, IL-6 e IL-12 ⁽⁸⁸⁾.

O mecanismo de ação do efeito direto do HIV na gênese da fibrose hepática baseia-se na infectividade deste vírus em hepatócitos e células estreladas ativadas. Nos hepatócitos a replicação do HIV, que é baixa, causaria a apoptose destas células com liberação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas ^(90;92). A interação da gp120 do HIV com o receptor CXCR4 na membrana de hepatócitos também causa apoptose destas células, sem mesmo estarem infectadas pelo HIV ⁽⁹³⁾. As células estreladas hepáticas (CEH), quando ativadas por um processo inflamatório hepático, como infecção viral ou uso de bebida alcoólica, expressam CCR5 e CXCR4, passando a ser susceptíveis à infecção pelo HIV. A replicação viral no interior das células estreladas induz a expressão de colágeno I e a secreção de *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), um potente quimioatraente de monócitos e linfócitos, que, além de atrair essas células para o microambiente hepático, perpetuaria a sua própria ativação, contribuindo para o agravamento da fibrose nos coinfectados ⁽⁹⁰⁾.

Recentemente um estudo francês trouxe mais um dado em relação à gênese da fibrose hepática. A expressão de HLA-G em mastócitos estaria associada à indução de fibrose em

pacientes monoinfectados por HCV. Inicialmente a expressão de HLA-G foi identificada por imuno-histoquímica de biópsia hepática, como presente somente em áreas contendo fibrose. Por meio de imunofluorescência dupla, mastócitos foram identificados como sendo as células nas quais a expressão de HLA-G ocorreu. Posteriormente, em cultura de mastócitos humanos da linhagem HMC1.1 estimulados por IFN- α (que induz a expressão de HLA-G), foi determinada por PCR em tempo real a cinética do perfil de expressão de citocinas dessas células. Como resultado final foi proposta uma alça autócrina (a produção de fatores de crescimento e citocinas por uma determinada célula para os quais ela mesma possui receptores, permitindo assim a própria estimulação) baseada em mastócitos e expressão do HLA-G na gênese da fibrose hepática em pacientes monoinfectados com HCV ⁽⁹⁴⁾. A expressão do HLA-G em biópsia hepática de pacientes coinfectados HIV/HCV nunca havia sido estudada até o momento.

1.3.4 Tratamento do HCV na coinfecção HIV/HCV

O tratamento do HCV em pacientes coinfectados pelo HIV, tendo em vista as possíveis complicações relacionadas à progressão da doença hepática, conforme apresentado anteriormente, deve ser iniciado o mais precocemente possível ⁽⁹⁵⁾.

O objetivo principal do tratamento é a eliminação definitiva do HCV, interrompendo a evolução para cirrose e suas complicações ⁽⁹⁵⁾.

No Brasil, a avaliação prévia da infecção pelo HIV deve ser feita antes do início do tratamento do HCV. Esse será iniciado caso o paciente apresente contagem de linfócitos T CD4+ acima de 500 células/mm³, sem necessidade da TARV para HIV. Caso a contagem de células CD4+ for menor que 500 células/mm³, a terapia para o HIV deve ser iniciada, estabilizada, e a partir de então, o tratamento do HCV deve ser preconizado. O esquema recomendado e distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro para o tratamento da hepatite C crônica em pacientes coinfectados HIV/HCV, independentemente do genótipo do HCV, é o Interferon Peguilado (PEG-IFN) associado à Ribavirina (RBV) durante 48 semanas, nas seguintes doses: PEG-IFN alfa-2a, 180 microgramas (mcg), subcutâneo (SC), 1 vez por semana ou PEG-IFN alfa-2b, 1,5 mcg/kg, SC, 1 vez por semana, ambos associados à RBV 15 mg/kg/dia, VO (dose diária dividida de 12 em 12 horas) ⁽⁶⁷⁾.

Em 2011 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou a comercialização de duas novas drogas antivirais de ação direta (DAA's) contra o HCV. Trata-se de inibidores da protease NS3/4A do HCV, que se ligam de maneira covalente, embora reversível, a esta enzima, que é uma serina protease essencial na replicação do vírus. Sua utilização deve ser feita em esquemas contendo PEG-IFN + RBV e, a partir de 2012, foram incorporados no SUS para o tratamento de pacientes mono infectados pelo HCV de genótipo 1. No país ainda não estão liberados para o tratamento de pacientes coinfetados com HIV, além do que, a interação destas drogas com medicamentos antirretrovirais é importante, exigindo estudos de eficácia e interação entre eles ⁽⁹⁶⁾.

De acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, do Departamento de Aids, DST e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil (2011), o tratamento do HCV na coinfeção pelo HIV deve ser realizado conforme a figura 7 ⁽⁹⁷⁾.

Figura 7 – Fluxograma para seguimento do tratamento da hepatite C crônica nos pacientes coinfetados com HIV, segundo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções, do Departamento de Aids, DST e Hepatites Virais do Ministério da Saúde do Brasil, 2013 ⁽⁹⁷⁾. RVP: resposta parcial precoce

A avaliação da eficácia ao tratamento, conforme mostrado na figura 7, obedece a períodos específicos durante o mesmo e possui algumas definições, que implicam no prognóstico da resposta final e até mesmo na suspensão da terapia ⁽⁹⁷⁾:

- 1- Resposta Viroológica Rápida (RVR): definida como a carga viral do HCV indetectável (abaixo do limite inferior do método de detecção) na 4ª semana de tratamento (este parâmetro é um bom preditor (cerca de 90%) de resposta virológica sustentada ⁽⁹⁸⁾ – vide adiante – e pode contribuir para possível redução do tempo de tratamento, entretanto não é recomendado pelo protocolo na avaliação do tratamento dos pacientes coinfectados HIV/HCV no Brasil);
- 2- Resposta Viroológica Precoce (RVP): definida como a queda de pelo menos duas escalas logarítmicas (2 Log) ou 100 vezes o valor da carga viral do HCV pré-tratamento (RVP parcial), ou a sua indetecção na 12ª semana de tratamento (RVP total);
- 3- Respondedor lento: definido como o indivíduo que apresenta RVP parcial e o RNA-HCV é indetectável na 24ª semana de tratamento;
- 4- Não Respondedor parcial: definido como o indivíduo que apresenta RVP parcial e o RNA-HCV é detectável na 24ª semana de tratamento;
- 5- A Resposta Viroológica ao Fim do Tratamento (RVF): corresponde ao RNA-HCV indetectável ao final do tratamento;
- 6- Resposta Viroológica Sustentada (RVS): corresponde ao RNA-HCV negativo na 24ª semana após o final do tratamento;
- 7- Nulo de Resposta: indivíduo que não apresenta pelo menos RVP (queda de pelo menos 2 Log do valor da carga viral pré-tratamento na 12ª semana de tratamento);
- 8-Recidiva virológica (recidivantes): definida como carga viral detectável 24 semana após o final do tratamento em pacientes que obtiveram RVS.

A resposta ao tratamento do HCV em pacientes coinfectados com o HIV apresenta menores taxas de RVS em relação a pacientes monoinfectados com HCV ^(99;100). Alguns fatores do hospedeiro e do próprio vírus da hepatite C podem predizer a resposta terapêutica no tratamento do HCV com Peg-IFN + RBV tanto em pacientes mono como coinfectados. São eles ^(101;102):

- Genótipo do HCV: melhor resposta ao tratamento obtida em pacientes portadores de vírus com genótipo 2 e 3 em detrimento ao 1 e 4;
- Carga viral do HCV no início do tratamento: pacientes com carga viral menor que 600.000 UI/mL possuem melhor resposta ao tratamento que os pacientes com carga viral acima deste valor;

- Fibrose hepática pré-tratamento: graus mais avançados de fibrose (3 e 4) possuem menor resposta ao tratamento em relação a graus 1 ou 2;
- Genótipo da IL28B: um polimorfismo simples de nucleotídeo (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphism*), isto é, a variação na sequência do DNA que afeta somente uma base no genoma, relacionada ao gene de *IL28B*, localizada no cromossomo 19 (19q13), é um preditor independente da RVS. O gene da *IL28B*, quando expresso, codifica a interleucina 28, também conhecida como IFN lambda. Um SNP (rs1297860) localizado próximo a este gene é preditor independente da RVS ao tratamento do HCV tanto em pacientes mono como coinfectados com HIV. Pacientes que possuem citosina nos dois cromossomos no SNP rs1297860, sendo portanto genótipo C/C, apresentam 75% de chance de obtenção de RSV ao tratamento do HCV, enquanto em pacientes que possuem uma ou duas timinas, sendo portanto genótipos C/T ou T/T, esta chance cai para 38% ⁽¹⁰²⁾. Esta é mais uma prova de que fatores genéticos estão ligados a variações individuais de resposta farmacológica e imunológica a doenças ^(103;104).

1.4 O HLA-G

1.4.1 Definição

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *major histocompatibility complex*) é um conjunto de genes encontrados em todos os vertebrados e que no ser humano recebe o nome de HLA (do inglês, *Human Leukocyte Antigens* ou antígenos de leucócitos humanos), por terem sido descritos inicialmente em leucócitos ⁽¹⁰⁵⁾. É o conjunto de genes mais polimórfico do genoma humano, localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21), e possui como papel principal a expressão de moléculas que regulam a resposta imune ⁽¹⁰⁶⁾.

Os genes do *HLA* são didaticamente divididos em classes I, II e III, correspondente a 3 regiões, de acordo com suas localizações no cromossomo 6. As moléculas codificadas por estes genes, que também recebem esta subdivisão, genericamente apresentam em comum 3 porções: uma citosólica, em contato com o interior da célula, outra transmembrana, que a

mantém acoplada à membrana celular, e a terceira, maior e mais variável delas, extracelular, responsável por desempenhar a função principal da molécula, a apresentação de peptídeos às células de defesa. A porção extracelular das moléculas de HLA são heterodímeras, isto é, compostas por quatro cadeias distintas, que podem ser α e/ou β , com composição específica para cada classe ⁽¹⁰⁶⁾.

A função das moléculas de HLA de classe I, subdivididas em -A, -B e -C, e expressas na superfície de quase todas as células nucleadas, é a apresentação de peptídeos endógenos sintetizados dentro das células alvo (ou proteínas virais expressas na membrana dessas) para as células T CD8+. As moléculas de classe II, subdivididas em -DR, -DP e -DQ, e expressas em linfócitos B, células apresentadoras de antígenos (monócitos, macrófagos e DCs) e linfócitos T ativados, têm como função a apresentação de peptídeos exógenos para as células CD4+. A região de classe III do HLA não codifica moléculas HLA específicas, mas contém genes do sistema complemento, TNFs e outros ⁽¹⁰⁶⁾.

Na região dos genes *HLA* de classe I, além dos clássicos -A, -B e -C, que recebem o nome de Ia, existem genes chamados não clássicos, denominados Ib, representados pelos *HLA-E*, -F, -G, *HFE* e *MIC*. Entre eles o *HLA-G* tem merecido destaque pelo grande número de publicações a respeito desta molécula nos últimos anos ⁽¹⁰⁷⁾.

1.4.2 Estrutura

As moléculas de HLA-G possuem estrutura semelhante às outras proteínas do HLA-I (-A, -B e -C), mas algumas diferenças importantes atribuem a elas a classificação de não clássicas: apresentam um polimorfismo alélico limitado, uma única região promotora, podem permanecer por longos períodos expressas na membrana (por uma expressão truncada, curta, de sua porção citoplasmática) e, em condições normais, têm distribuição restrita a alguns tecidos ⁽¹⁰⁸⁾.

A expressão do *HLA-G* codifica um único transcrito primário de RNA mensageiro que origina, via *splicing*, sete isoformas de proteínas, das quais quatro (G1, G2, G3 e G4) são ligadas a membrana e três (G5, G6 e G7) são solúveis. A proteína de membrana G1 pode sofrer remoção da parede celular e ser liberada como molécula solúvel (figura 8A). As proteínas HLA-G1 removida da membrana (sHLA-G1) e a solúvel HLA-G5 são consideradas as mais importantes, por ser as isoformas mais ativas funcionalmente ⁽¹⁰⁸⁾.

1.4.3 Função

As funções dessas moléculas são outra característica que as torna não clássicas em relação às moléculas do HLA de classe I. As isoformas do HLA-G tem função imunossupressora no sistema imune: inibem atividade e são mediadoras de apoptose de linfócitos T CD8+ e NK, inibem a proliferação de células CD4+ e dirigem as mesmas para um perfil de imunossupressão, inibem a apresentação de células e a diferenciação de células B, promovem a mudança das células Th1/Th2 para o polo Th2 e induzem células T reguladoras (figura 9). Para desempenhar todas essas funções, as moléculas de HLA-G dependem da interação específica com receptores inibitórios ILT-2, ILT-4 e KIR2DL4 expressos nas células do sistema imune⁽¹⁰⁸⁾ (figura 8B). Além disso, a expressão de HLA-G é aumentada por interleucinas anti-inflamatórias como a IL-10⁽¹⁰⁹⁾.

Além da ligação das moléculas de HLA-G aos receptores inibitórios de membrana das células do sistema imune, elas podem exercer sua função imunomoduladora, e de forma prolongada, em células que não expressam estes receptores. Por meio de um mecanismo chamado trogocitose, células que não expressam HLA-G recebem pequenos fragmentos de membrana contendo esta molécula e passam a ser imunomoduladas⁽¹¹⁰⁾.

A modulação para imunossupressão das moléculas do HLA-G tem sido demonstrada na manutenção da infecção por determinados vírus humanos. Seu papel na infecção pelo HIV e HCV já foi descrito anteriormente. Na infecção pelo Citomegalovírus humano (CMV), por meio do aumento nos níveis de IL-10, a expressão de HLA-G na membrana das células do hospedeiro está estimulada impedindo o reconhecimento da célula infectada e a ação de NK, causando a evasão do sistema imune e perpetuando a infecção em hospedeiros imunocomprometidos⁽¹¹¹⁾. A expressão de HLA-G1 e HLA-G5 está aumentada em neurônios infectados pelo Herpes vírus simplex e pelo vírus da Raiva, conferindo a estas células proteção contra células NK e perpetuando a infecção. O estímulo que aumenta a expressão do HLA-G nestas duas doenças virais não é bem conhecido⁽¹¹²⁾. O vírus da Influenza A também aumenta a expressão de HLA-G em células do epitélio alveolar do pulmão do hospedeiro contribuindo para a gravidade desta infecção⁽¹¹³⁾. Além do papel de HLA-G em infecções, a relação dessa molécula com diversas outras situações (transplante de órgãos) e doenças como câncer, hemorragia intracerebral, doenças inflamatórias intestinais, doenças autoimunes, doenças de pele e asma, vem sendo estudada⁽¹⁰⁸⁾.

A)

B)

Figura 8 – Estrutura das isoformas e dos receptores das proteínas do HLA-G. A) Isoformas ligadas a membrana (G1, G2, G3 e G4) e solúveis (G5, G6, G7 e G1 removida) com seus domínios α e β . B) Receptores das proteínas do HLA-G, com a representação dos domínios ligantes, dos receptores intracitoplasmáticos e das células nos quais são expressos. (Adaptado de Menier, C.; Rouas-Freiss, N; Corosella, E.D. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2008) ⁽¹¹⁴⁾.

DC: células dendríticas; ILT: *immunoglobulin-Like Transcript*; ITIM: *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*; KIR: *Killer cell immunoglobulin-like receptor*; NK: *Natural killer*; Ig-Like: *Imunoglobulina-like*;

Em última análise, a função de imunomodulação das moléculas de HLA-G exerce papéis dicotômicos de acordo com o tecido e a situação em que são expressas. Sua presença é fundamental para a manutenção do feto na imunotolerância com a mãe e de um órgão transplantado no receptor, e por outro lado contribui para a perpetuação de infecções virais crônicas e neoplasias ⁽¹¹⁵⁾. Os níveis séricos de produção e a estabilidade das moléculas solúveis, bem como a atividade das células em relação à magnitude de produção das isoformas de membrana podem ser modulados por polimorfismos do gene *HLA-G*, que também estão correlacionados como fatores independentes à susceptibilidade a infecções e doenças inflamatórias ⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾.

Figura 9 – Funções imunorreguladoras mediadas pelas isoformas HLA-G1 e HLA-G5 mais ativas do HLA-G, células-alvo e receptores. (Adaptado de Brenol, C.V., et al, 2012) ⁽¹¹⁹⁾. APC: do inglês, *antigen presenting cell*

1.4.4 Polimorfismo de 14pb da região 3'NT

Na molécula do HLA-G, o éxon 7 está sempre ausente do RNA mensageiro maduro devido a existência de um códon de parada na leitura do éxon 6. Assim o éxon 8 nunca é traduzido, sendo considerado como a região 3' não traduzida (3'NT) do RNA maduro. Esta região contém vários elementos regulatórios e sítios polimórficos que podem influenciar na transcrição e tradução de proteínas ^(118;120).

Dentre os diversos sítios polimórficos que podem influenciar na expressão e estabilidade das moléculas de RNAm do HLA-G, existe um polimorfismo de 14 pares de base (14pb) na região 3'NT que está bem determinado. Alelos que apresentam a inserção (I) destes 14pb na região 3'NT do HLA-G sofrem *splicing* alternativo no RNA mensageiro, com remoção de 92 bases do éxon 8, resultando em um transcrito mais instável e que pode influenciar na produção das proteínas do HLA-G (figura 10) ⁽¹²¹⁾.

Figura 10 – A presença de 14 pares de base (+14) na região 3`NT do genoma do HLA-G promove a remoção de 92 bases do éxon 8 (-92), gerando um RNAm de HLA-G mais instável. (Adaptado de Rousseau, P. et al, 2003) ⁽¹²¹⁾ Ex: éxon

A deleção (D) e a inserção (I) dos 14pb da região 3`NT do HLA-G foi relacionada a susceptibilidade e características virológicas de algumas doenças infecciosas em estudos prévios. Pacientes com genótipo D/D e o alelo D possuem menor risco de transmissão vertical do HIV-1 ⁽¹²²⁾, enquanto a presença de I/I nas trabalhadoras do sexo da República de Benin foi fator de risco independente para aquisição da infecção ⁽¹²³⁾, ambos pela redução da expressão de formas solúveis do HLA-G. Em relação ao HCV, alguns autores observaram que o genótipo D/D foi fator de risco para transmissão vertical desse vírus ⁽¹²⁴⁾, enquanto outros não mostraram associação entre 14pb da região 3`NT do HLA-G e infecção pelo HCV em pacientes com anemia falciforme ⁽¹²⁵⁾. Em pacientes com infecção pelo Vírus T-linfotrófico humano do tipo 1 (HTLV-1, do inglês *human T-lymphotropic vírus tipe 1*) o genótipo I/I tem menor carga proviral de HTLV-1 quando comparado a pacientes que apresentam I/D e D/D, justificando que a inserção, por produzir um transcrito de HLA-G com menor estabilidade, influenciaria nas isoformas finais da molécula do HLA-G. Assim, com uma menor função de imunossupressão, pacientes teriam função preservada de células NK e T citotóxicas, levando a uma menor carga viral do HTLV1 ⁽¹¹⁷⁾.

Recentemente, Martelli-Palomino et al avaliaram os níveis de HLA-G solúvel e sua relação com polimorfismos da região 3`NT em pacientes brasileiros e franceses. Indivíduos que apresentavam 14pb D/D mostravam altos níveis de HLA-G solúveis comparados aos de genótipo 14pb I/I <sup>(126)</sup>. A influência do polimorfismo da região 3`NT na expressão tecidual hepática de proteínas do HLA-G ainda não foi estudada.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A hepatite C crônica e a infecção pelo HIV são dois agravos de distribuição mundial e de grande importância para a saúde pública. Além de possuírem caráter crônico, com longos períodos de evolução, compartilham de mecanismos de transmissão comuns, que faz da coinfeção uma associação frequente, podendo chegar até 90% em grupos populacionais específicos. Nos pacientes coinfectados, a evolução natural do HCV é alterada sobremaneira, diminuindo o tempo e aumentando a proporção de pacientes com doença hepática terminal. A rápida evolução da fibrose hepática é a principal alteração histológica responsável por esse desfecho desfavorável da infecção pelo HCV nos pacientes portadores do HIV. Sabe-se que fatores envolvidos com a resposta imune do hospedeiro são relacionados com a gênese da fibrose hepática. Sendo assim, potenciais biomarcadores estão sendo estudados para melhor entendimento dessa fisiopatogenia. Recentemente, a molécula imunorreguladora HLA-G foi correlacionada com a fibrose hepática em pacientes monoinfectados pelo HCV.

Em pacientes coinfectados HIV/HCV não há estudos na literatura que comprovem o papel da expressão do HLA-G no micro ambiente hepático, tampouco relacionam fatores do hospedeiro, do HCV e do HIV que possam contribuir para expressão desse HLA. Assim, investigar a expressão dessa molécula em pacientes coinfectados torna-se relevante.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a expressão de HLA-G na biópsia hepática de pacientes coinfectados com HIV/HCV.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar possíveis associações entre variáveis do hospedeiro, do HCV e do HIV que se relacionem com a expressão do HLA-G no tecido hepático;
- Verificar se a expressão do HLA-G na biópsia hepática de pacientes coinfectados HIV/HCV se relaciona com outros elementos da histologia;
- Verificar se a expressão do HLA-G é fator independente de Resposta Viroológica Sustentada ao tratamento da hepatite C em pacientes coinfectados HIV/HCV;
- Verificar se o polimorfismo de D/I de 14pb da região 3`NT do *HLA-G* influencia na expressão destas moléculas em tecido hepático de pacientes coinfectados HIV/HCV.

Pacientes e métodos

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e considerações éticas

O presente estudo é retrospectivo e transversal na avaliação das características clínicas, laboratoriais e histológica dos pacientes.

O desenvolvimento deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) em sua 309ª Reunião Ordinária realizada no dia 07 de Junho de 2010 sob o número 4916/2010 (Anexo A). O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi dispensado uma vez que se trata de estudo retrospectivo no qual, tanto o material genético quanto a biópsia hepática utilizados, já possuem consentimento prévio para uso em pesquisa e armazenamento por meio do “Banco de Amostras de DNA 1 Laboratório Multidisciplinar”, aprovado e registrado no Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP, com processo nº 3146/2003, sob a responsabilidade da Profa Dra Ana Martinelli (Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP). A todos os pacientes submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP é proposta a cessão de parte da biópsia hepática e material genético para pesquisas futuras. Em caso de aceite, o mesmo assina TCLE do qual a dispensa para o atual trabalho é atrelada.

4.2 Pacientes

Cinquenta e sete pacientes adultos, de ambos os sexos, que tenham sido seguidos ou que mantêm seguimento nos Ambulatórios de Hepatites (HPA) e Hepatites e Imunodeficiência (AHID) do HC-FMRP-USP e submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no período de 2003 a 2006 foram selecionados para este estudo. Esses pacientes possuíam em blocos de parafina as biópsias passíveis de análise armazenadas no arquivo do Serviço de Patologia (SERPAT) do HC-FMRP-USP, preencheram os critérios de inclusão e não possuíam critérios de exclusão abaixo, sendo essa a casuística final do estudo.

4.2.1 Critérios de inclusão

- positividade para anti-HIV determinada pelo método sorológico ELISA;
- positividade para anti-HCV determinada pelo método sorológico ELISA e confirmada por PCR RNA-HCV em teste qualitativo;
- negatividade para antígeno de superfície da hepatite B (HbsAg negativo);
- bloco de parafina contendo biópsia hepática armazenado nos arquivos do SERPAT, passível de análise.

4.2.2 Critérios de exclusão

- alterações na biópsia hepática não relacionadas exclusivamente à infecção pelo HCV como hepatite medicamentosa, infecções oportunistas, hepatite autoimune, etc.

4.3 Métodos

4.3.1 Caracterização demográfica dos pacientes

A caracterização de dados demográficos quantitativos e qualitativos dos pacientes foi feita mediante revisão do prontuário médico do HC-FMRP-USP no período de Janeiro a Julho de 2013. Foram levantadas características que pudessem ter influência no desfecho do tratamento do HCV e, por conseguinte, na expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas. As variáveis avaliadas foram:

- sexo: masculino ou feminino;
- idade, expressa em anos, no momento da biópsia hepática;
- cor da pele, descrita no prontuário do paciente;
- peso, em Kilogramas (Kg), distando seis meses – antes ou após – a realização da biópsia hepática;

- estatura, em metros (m), registrada em qualquer atendimento do paciente;
- índice de massa corporal (IMC) calculado pela fórmula peso (Kg)/[altura (m)]²;
- história de diabetes mellitus no momento da biópsia, ou no tratamento do HCV, e outras doenças crônicas pré-existentes descritas no prontuário;
- presença de história prévia de etilismo, mesmo que não quantificado, relatado em prontuário e supostamente ausente, por pelo menos seis meses, no momento da biópsia hepática (protocolo do HC-FMRP-USP para realização de biópsia hepática);
- efeitos colaterais relevantes (que tenham causado modificação de dose ou interrupção de tratamento) relatados durante o tratamento do HCV.
- status da infecção pelo HIV no momento da biópsia hepática (considerada como controlada se a carga viral do HIV estiver < 50 cópias/mL e contagem de linfócitos T CD4 $\geq$ 200 células/mm³).

4.3.2 Avaliações bioquímicas e hematológicas globais

Os dados bioquímicos e hematológicos dos pacientes foram obtidos por meio dos Sistemas HC em seu programa de apoio a atenção hospitalar/ambulatorial (ATHOS), mediante o registro do indivíduo no HC-FMRP-USP, além de dados retirados do prontuário médico do paciente arquivado na instituição. Tais variáveis foram selecionadas devido à importância das mesmas na evolução e na resposta ao tratamento do HCV.

As dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do HC-FMRP-USP e as dosagens hematológicas no Laboratório de Hematologia do mesmo hospital.

Os dados avaliados foram os seguintes:

- Gama glutamiltransferase (valores expressos em Unidades por Litro [U/L]), dosada até seis meses antes da realização da biópsia hepática, por método enzimático automatizado;
- Alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (valores expressos em U/L), dosadas até seis meses antes da realização da biópsia hepática, por método enzimático automatizado;
- Hemoglobina (Hb) (valores expressos em gramas por decilitro [g/dL]), dosada até um mês antes do início do tratamento do HCV e um mês após o início do tratamento, por método de impedância automatizado, sendo considerada normal até 12 g/dL para indivíduos do sexo masculino e até 11 g/dL para o sexo feminino.

4.3.3 Avaliações relacionadas ao HCV

4.3.3.1 Diagnóstico de Hepatite C Crônica

O diagnóstico de Hepatite C Crônica foi definido pela positividade de um teste de triagem seguido por outro teste confirmatório. O primeiro teste consistia na pesquisa de anticorpos da classe das imunoglobulinas G (IgG) contra proteínas estruturais e não estruturais do vírus HCV realizado em soro por um Imunoensaio Enzimático por Micropartículas (MEIA), uma variação do método imunoenzimático clássico (ELISA), realizado no Laboratório de Sorologia do HC-FMRP-USP. Este teste foi realizado por método automatizado com kits comerciais da marca Abbott® (*Wiesbaden, Germany*) denominados *AxSYM System HCV 3.0*, que detectava qualitativamente a existência de anti-HCV no soro.

O teste confirmatório foi feito pela detecção qualitativa do RNA do HCV em soro pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida por transcrição reversada RNA-HCV feita por kit comercial (*AMPLICOR HCV v2.0® Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA*) com limite inferior de detecção de 50 unidades internacionais (UI)/mililitros(mL), realizado no Laboratório de Gastroenterologia do HC-FMRP-USP. Além de teste confirmatório da infecção crônica pelo HCV, este teste qualitativo foi utilizado para determinação da resposta virológica na 24^a e 48^a semanas de tratamento do HCV e para verificação da resposta virológica sustentada seis meses após o final do tratamento, pois o limite inferior de detecção era menor que o teste quantitativo à época.

4.3.3.2 Detecção quantitativa do RNA-HCV

A detecção quantitativa do RNA-HCV no soro dos pacientes foi feita por kits comerciais (*AMPLICOR HCV MONITOR® Test, versão 2.0, Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, EUA*, até Setembro de 2005 e pelo teste *Versant® HCV RNA 3.0 Assay (bDNA), Bayer Diagnostics, Berkeley, CA, EUA*, até Julho de 2007, quando novamente o teste da Roche voltou a ser realizado). Os testes foram realizados no Laboratório de Gastroenterologia do HC-FMRP-USP, seguindo cinco processos principais: preparação da

amostra; transcrição reversa do RNA alvo para fornecer o DNA complementar (cDNA); amplificação do cDNA por PCR; hibridização dos produtos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas do alvo, e detecção dos produtos por determinação colorimétrica. Os limites inferior e superior de detecção para o AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test eram, respectivamente, de < 600 UI/mL e > 850.000 UI/mL, e para o teste VERSANT[®] HCV RNA 3.0 Assay de < 615 UI/mL e > 7.692.310 UI/mL.

4.3.3.3 Determinação do genótipo do HCV

A determinação dos genótipos do HCV foi feita por meio do ENSAIO HCV Genotype 2.0 (LiPA), kit comercial *Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY, EUA*, que utilizava hibridação reversa após a amplificação da região não traduzida 5' e região nuclear do RNA do HCV por RT-PCR, ligada a um conjugado (estreptavidina-fosfatase alcalina) que, após acrescido de um substrato (cromogêneo BCIP/NBT), forma um precipitado cor púrpura/castanha produzindo um padrão visível em tira. Este padrão é comparado com tabelas de referência do ensaio determinando assim o genótipo do HCV.

Esta variável foi expressa qualitativamente nos diferentes genótipos de 1 a 4 e categorizada como genótipos 1 e não 1 para análise estatística.

4.3.4 Avaliações relacionadas ao HIV

4.3.4.1 Diagnóstico da Infecção pelo HIV

O diagnóstico da infecção pelo HIV foi feito pela pesquisa de anticorpos da classe das imunoglobulinas G (IgG) contra proteínas estruturais do envelope e do núcleo do HIV-1 e do envelope do HIV-2 em duas amostras de soro colhidas em momentos diferentes, por Imunoensaio Enzimático por Micropartículas (MEIA), realizado no Laboratório de Sorologia do HC-FMRP-USP. Esse teste foi feito por método automatizado com kits comerciais da marca Abbott[®] (*Wiesbaden, Germany*) denominados AxSYM System HIV1/2 gO, que detectava qualitativamente a existência de anticorpos anti-HIV.

Em cada uma dessas amostras outro teste confirmatório, mais específico para detecção de anticorpos IgG contra proteínas do HIV-1 e peptídeo do HIV-2, foi realizado. Tratou-se do kit comercial Bioblot HIV-1 plus (*Biokit, S.A., Barcelona, Spain*). Esse teste é um ensaio imunoenzimático (tipo ELISA) no qual as proteínas gp160, gp120, p66, p55, p51, p39, gp41, p31, p24 e p17 do HIV-1 e um peptídeo sintético do HIV-2 são incorporados em fitas de nitrocelulose as quais são incubadas com soro da amostra em que se queira confirmar a existência de anticorpos anti-HIV. Posteriormente são novamente incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG humano conjugado a fosfatase alcalina e o substrato BCIP/NBT. Quando pelo menos duas bandas do HIV-1 ou o peptídeo do HIV-2 apresentam marcação na fita, a amostra é confirmada como positiva para anticorpos anti-HIV.

4.3.4.2 Quantificação da carga viral do HIV

A quantificação da carga viral do HIV foi feita por método automatizado QUANTIPLEX-bDNA[®] v2.0 (*Chiron Diagnostics, Emeryville, CA, USA*) utilizando o kit comercial VERSANT[®] HIV-1 RNA 3.0 (bDNA) (*Bayer Corporation, Berkeley, CA, USA*). É um procedimento de hibridação tipo “sanduíche” do ácido nucleico para a quantificação direta do HIV-1 RNA no plasma humano. O teste divide-se em três fases principais: preparação do precipitado viral, lise e hibridação das sondas e quantificação do HIV por meio da detecção do aumento da luminescência produzida da região genômica *pol*.

Para a realização do teste observou-se a especificação do fornecedor.

4.3.4.3 Contagem dos linfócitos T CD4+

A contagem dos linfócitos T CD4+, apesar de uma variável hematológica dos pacientes, é descrita nas avaliações relacionadas ao HIV, pois está diretamente relacionada a esta infecção e sua evolução.

Essas contagens foram feitas no Laboratório de Citometria do Hemocentro de Ribeirão Preto utilizando kit comercial BD Multitest[®] código 340491, para subpopulações linfocitárias CD4+/CD8+ contendo o reagente CD3+/CD4+/CD8+/CD45+ (*Becton Dickinson, San Jose,*

CA, USA). As amostras foram processadas no citometro BD FACSCalibur (*Becton Dickinson, San Jose, CA, USA*) e analisadas pelo software Multiset[®], para aquisição e análise dos dados automaticamente.

Para a realização da citometria observou-se a especificação do fornecedor.

4.3.5 Avaliação de variáveis genéticas dos pacientes

4.3.5.1 Extração do DNA

As amostras de sangue total foram colhidas em tubo padrão contendo EDTA como anticoagulante no ato das biópsias hepáticas (processo n° 3146/2003, no Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP) e prontamente transportadas em gelo para o Laboratório Multidisciplinar de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. Por meio da técnica *Salting-out*, descrita no Anexo B, foi feita a extração do DNA. As amostras devidamente identificadas foram armazenadas a -20°C e descongeladas para uso no dia dos ensaios descritos a seguir.

4.3.5.2 Processamento das amostras para determinação do genótipo da IL28B

A determinação dos genótipos da IL28B foi feita a partir do DNA extraído conforme indicado no item 4.3.4.1 e descongelado no dia do processamento das amostras.

O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no mês de Agosto de 2013.

As amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR em tempo real, utilizando-se a metodologia *Taqman* (*Applied Biosystems*[®], *Foster City, CA, USA*). Tal metodologia utiliza a atividade da 5' nuclease da Taq polimerase que cliva uma sonda de hibridização fluorogênica duplamente marcada durante a fase de extensão da PCR, empregando iniciadores e sondas específicas: iniciador direto 5'GCCTGTCTGTACTGAACCA3', iniciador reverso 5'GCGCGGAGTGCAATTCAAC3', sonda marcada com fluoróforo VIC (para o alelo C)

5`TGGTTCGCGCCTTC3`, sonda marcada como fluoróforo FAM (alelo T) 5`CTGGTTCACGCCTTC3`, correspondentes à região próxima ao gene da *IL28B*, de acordo com a metodologia descrita por Urban e col (127). Para as reações foi utilizado um sistema de PCR em tempo real *Applied Biosystem*® 7500 Fast Real-Time PCR System (Foster City, CA, USA). As concentrações empregadas para uma reação foram: 900nM dos iniciadores direto e reverso (rs12979860F e rs12979860R), 250nM de sondas marcadas VIC e FAM; TaqMan Universal PCR Master Mix 1X; 30 ng de DNA e água destilada para completar 25 µL. As condições para ciclagem do PCR em tempo real foram: 60°C por 1 minuto, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto, finalizando com 60°C. Em todas as reações foram utilizados controles positivos e negativos para cada genótipo. A determinação do genótipo foi feita utilizando *Software* da *Applied Biosystem*® versão 2.0.4, com *Allelic Discrimination Plot* inserido no apêndice A.

4.3.5.3 Processamento das amostras para determinação da Inserção/Deleção dos 14 pares de bases do HLA-G

A determinação dos polimorfismos deleção/inserção (D/I) dos 14pb do HLA-G foi feita a partir do DNA extraído conforme indicado no item 4.3.4.1 e descongelado no dia do processamento.

A região 3' NT do loco *HLA-G* foi inicialmente amplificada, utilizando a reação de cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*- PCR), com os iniciadores específicos para cada variante: HLA-G8R (5` GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT 3`) e HLA-G8F (5` TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3`), que amplificam respectivamente 345-pb e 359-pb ⁽¹²⁸⁾.

O polimorfismo de inserção / deleção de 14pb do HLA - G foi determinado a partir de 200 ng de DNA amplificado numa mistura reacional com volume final de 25 µl contendo água ultra-pura desionizada, 1 X tampão de amplificação (0,2 M Tris-HCl pH 8,5; 0,5 M KCl), 0,2 mM de DNTP (deoxinucleosídeo 5`trifosfato), 5 pmol de cada iniciador, 1,50 mM de MgCl₂ (cloreto de Magnésio), 0,5 U de DNA polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação foi realizada no termociclador Veriti (Applied BioSystems, EUA) utilizando-se os seguintes ciclos de temperatura/tempo: 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos a 95°C durante 45s, 59°C durante 45 s e 72°C durante 24 segundos, com um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados por electroforese em gel de poliacrilamida a 7% corado com prata, nos quais a presença do fragmento de 345-pb indicava a deleção e um fragmento de 359-pb a inserção do polimorfismo de 14pb do HLA-G ⁽¹²⁹⁾.

4.3.6 Avaliação da biópsia hepática

As biópsias hepáticas dos pacientes selecionados foram obtidas pela técnica de punção percutânea, no lobo hepático direito, com agulha Tru-cut de 14 Gauge, guiada por ultrassonografia, seguindo o protocolo do Ambulatório de Hepatites do HC-FMRP-USP, realizadas pré-tratamento do HCV entre os anos de 2003 e 2006. Estas amostras permaneceram conservadas em blocos de parafina e foram submetidas a cortes por micrótomo rotativo, com espessura de 5µm e processadas para análise histopatológica de acordo com procedimentos padronizados no Serviço de Patologia (SERPAT) do HC-FMRP-USP.

A avaliação das biópsias foi realizada por um único patologista com larga experiência em doenças do fígado (Prof. Dr Sérgio Zucoloto, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo).

4.3.6.1 Determinação e avaliação da deposição de ferro no tecido hepático

A determinação da deposição de ferro no tecido hepático foi realizada utilizando-se o corante azul da Prússia (coloração de Perl's) e avaliada segundo classificação de Sciot et al ⁽¹³⁰⁾. Tal classificação analisa semiquantitativamente os depósitos de ferro considerando-se intensidade e localização dos mesmos nos hepatócitos, células de Kupffer, tratos portais e septos. São atribuídos escores a cada uma dessas avaliações, sendo calculado o escore final que varia de 0 a 20. Assim, essa variável foi categorizada conforme abaixo:

escore 0 – ausente;

escores 1 a 5 – grau I;

escores 6 a 10 – grau II;

escores 11 a 15 – grau III;

escores 16 a 20 – grau IV.

4.3.6.2 Avaliação da esteatose hepática

A avaliação da esteatose hepática foi feita de acordo com a quantidade de hepatócitos acometidos, conforme a classificação de Brunt et al ⁽¹³¹⁾:

- grau 0: ausência de esteatose;
- grau I: de 1 a 33%;
- grau II: de 33 a 66%;
- grau III: superior a 66%.

4.3.6.3 Determinação e avaliação da fibrose hepática e do índice de atividade histológica

As colorações com hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson foram utilizadas para avaliação do índice de atividade histológica (IAH) e da fibrose hepática, respectivamente, baseados na classificação de Knodell et al ⁽¹³²⁾, modificada por Desmet et al ⁽¹³³⁾.

O estadiamento da fibrose hepática (F) por esta classificação leva em conta as alterações da arquitetura hepática atribuindo a estas valores numéricos a seguir:

- F0: ausência de alterações na arquitetura hepática;
- F1: leve fibrose periportal;
- F2: presença de septos porta-porta, sem a formação de nódulos;
- F3: grave distorção da arquitetura hepática
- F4: cirrose

O IAH relaciona alterações morfológicas baseadas no estudo do infiltrado inflamatório, no grau de lesão hepatocitária e de fibrose hepática, a valores numéricos. Neste sistema, quatro alterações histopatológicas (necrose periportal/em ponte, degeneração intralobular/necrose focal hepatocitária, inflamação portal e fibrose) são acessadas separadamente, recebendo valores numéricos individuais. O IAH é representado pela soma final destes valores numéricos. Este foi o primeiro sistema semiquantitativo a ser desenvolvido para o estudo de biópsias hepáticas de pacientes portadores de hepatite crônica viral e é assim discriminado:

- 1-3: hepatite crônica mínima atividade;
- 4-8: hepatite crônica leve;
- 9-12: hepatite crônica moderada;
- 13-18: hepatite crônica grave.

4.3.6.4 Determinação e avaliação da expressão do HLA-G

A identificação da expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas foi realizada pelo método de imuno-histoquímica para antígenos do HLA-G em tecidos ⁽¹³⁴⁾.

Cortes de 5 micras de espessura dos blocos de parafina foram transferidos para lâminas previamente tratadas com solução de Poli-L-Lisina 0,1% (Sigma-Aldrich™, Inc, MO, USA) e foram submetidos a sucessivos tratamentos em xilol e álcool absoluto para diafanização e hidratação. Após esse tratamento a recuperação antigênica do tecido foi realizada com tampão citrato (10 mM ácido cítrico anidro, 0.05% Tween 20, pH 6.0) e aquecimento em banho de vapor a 95°C por 40 minutos. Todas as lavagens a partir desta etapa foram realizadas com solução de PBS 0,1 M/Tween 20 0,05% (pH 7.2). A peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) em metanol, por 20 minutos. O anticorpo primário utilizado foi: anti-HLA-G, clone 5A6G7 (EXBIO, Vestec, Czech Republic) contra isoformas solúveis HLA-G5 e HLA-G6 e 4H84 (gentilmente fornecido por Mc-Master University, San Francisco, CA) que reconhece todas as formas solúveis e ligadas à membrana das moléculas HLA-G, ambos na diluição de 1:50. Estes anticorpos foram incubados nas amostras por um período de 12 horas em câmara úmida à temperatura ambiente. A detecção da expressão da molécula HLA-G foi realizada por meio da utilização do kit MACH4 Mouse Probe e HRP-Polymer (Biocare Medical, LLC, CA, USA) e a revelação da reação com o substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Biocare Medical, LLC, CA, USA). Como controle positivo, cortes de parafina do tecido trofoblasto obtido a partir de abortos espontâneos de até aproximadamente 12 semanas de gestação foram sistematicamente utilizados. Um controle negativo foi realizado omitindo o anticorpo primário.

A expressão do HLA-G foi classificada de forma qualitativa (presente ou ausente) e de forma semiquantitativa (baseada na experiência do patologista), subjetivamente. Como esta é a primeira descrição de tal estudo imuno-histoquímico na literatura, o critério a seguir foi utilizado para pontuar a distribuição da expressão do HLA-G nas lâminas e orientar a classificação semiquantitativa:

- Expressão leve: marcação presente em até 30% da lâmina;
- Expressão moderada: marcação de 30 a 60% da lâmina;
- Expressão intensa: marcação em mais de 60% da lâmina.

O critério supra, guarda estreita relação com a classificação qualitativa onde expressão leve, moderada e intensa correspondem a HLA-G presente qualitativamente e ausência tem o mesmo significado nas duas classificações.

4.3.7 Análise estatística

A análise estatística foi feita com o apoio da PROESTAT Consultoria Estatística, Ribeirão Preto - SP.

Primeiramente realizou-se uma estatística descritiva com os dados. Esta metodologia tem como objetivo básico sintetizar uma série de valores de mesma natureza, permitindo que se tenha uma visão global da variação desses, organizando e descrevendo os dados por meio de medidas descritivas.

Para verificar a associação entre as variáveis de interesse, foi proposto o teste Qui-Quadrado. Esta análise foi realizada por meio do software SAS® 9, utilizando a PROC FREQ.

A regressão logística, simples e múltipla, para a estimação do Odds Ratio Bruto e Ajustado, respectivamente, foi utilizada com o objetivo de verificar a influência simultânea das variáveis independentes previamente selecionadas, para identificar os fatores de possível interferência na expressão de HLA-G e da resposta ao tratamento do HCV 6 meses após o final do tratamento (RVS). A análise foi realizada pelo o procedimento PROC LOGISTIC do software SAS® 9.0.

O nível de significância utilizado nos testes Qui-Quadrado e regressão logística foi $\leq 0,05$.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 População de estudo

A população final deste estudo contou com 57 pacientes coinfectados HIV/HCV que foram seguidos no Ambulatório de Hepatites ou que mantêm seguimento no Ambulatório de Hepatites e Imunodeficiência do HC-FMRP-USP e foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no período de 2003 a 2006. Todos os 57 pacientes possuíam blocos de parafina que continham as biópsias passíveis de análise, preenchiam os critérios de inclusão e não possuíam critérios de exclusão.

5.1.1 Características demográficas da população de estudo

Os dados demográficos dos 57 pacientes coinfectados HIV/HCV estudados estão representados na tabela 1:

Tabela 1 - Características demográficas dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Variável	n = 57
Sexo masculino, n (%)	43 (75,4%)
Mediana de idade (anos) no momento da biópsia hepática	38 (25 – 50)
Cor da pele	
Branco	49 (86%)
Afro-americano (mulato)	8 (14%)
Presença de Diabetes mellitus diagnosticada	3 (5,3%)
História prévia de ingestão de álcool	25 (43,9%)
Índice de massa corporal (Kg/m²)*	24 (16,7 – 37,1)
Até 18	2 (5,2%)
18,1 a 24,9	21 (53,8%)
25 a 29,9	14 (35,8%)
Acima de 30	2 (5,2%)

Valores expressos como mediana (valor mínimo e valor máximo) ou número absoluto (porcentual do total).

* Avaliado em 39 pacientes da amostra

A população de estudo foi, em sua maioria, composta por indivíduos do sexo masculino (75,4%) contrapondo com 24,6% do sexo feminino. A mediana de idade dos pacientes ao realizarem a biópsia hepática pré-tratamento do HCV foi de 38 anos, com idade inferior de 25 e superior de 50 anos, e média de 37,9 anos. Quanto à cor da pele, 86% eram brancos e 14% eram mulatos. Considerando todos os pacientes da amostra, apenas três deles (5,3%) possuíam diagnóstico de diabetes mellitus.

Em relação à história prévia de ingestão de bebida alcoólica, 43,9% dos pacientes declararam consumo prévio, com abstinência de pelo menos 6 meses antes da biópsia hepática.

A análise do IMC foi obtida em 39 pacientes da amostra, sendo a variável estatura o grande limitante na obtenção deste dado, visto que não havia referência a ela em 18 dos prontuários revisados. A mediana do IMC foi de 24 Kg/m², com apenas 2 pacientes abaixo do valor de 18,5 Kg/m². A maioria dos pacientes (53,8%) apresentavam IMC entre 18,5 e 25 Kg/m² e apenas dois (5,2%) possuíam IMC acima de 30, sendo, portanto considerados obesos (135).

5.1.2 Características bioquímicas e hematológicas da população de estudo

Os valores séricos da Gama GT, da ALT e da AST colhidos até 6 meses antes da realização da biópsia hepática, bem como os valores de hemoglobina do início do tratamento do HCV e 1 mês após o seu início estão expressos na tabela 2.

Tabela 2 - Características bioquímicas e hematológicas dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Variável	Mediana (valor máximo – mínimo) Número de pacientes (% do total)
Gama GT (UI/L)*	121 (15,1 – 884)
Valores até 60 (limite superior da normalidade)	18 (32,7%)
Valores acima de 60	37 (67,3%)
ALT (UI/L)**	72,3 (20,1 – 264,4)
Até 41 (limite superior da normalidade)	10 (17,9%)
Acima de 41	46 (82,1%)
AST (UI/L)**	64,5 (14,4 – 186,2)
Hemoglobina pré tratamento (g/dL) *	13,9 (12,2 – 17,6)
Hemoglobina após 30 dias do início do tratamento (g/dL) ***	13,4 (8,0 – 15,9)

Valores expressos como mediana (valor mínimo e valor máximo) ou número absoluto (porcentual do total).

* Avaliado em 55 pacientes da amostra

** Avaliado em 56 pacientes da amostra

*** Avaliado em 54 pacientes da amostra

Os valores medianos da Gama GT, ALT e AST foram respectivamente 121, 72,3 e 64,5 UI/L. Todos eles apresentaram valores elevados quando comparados ao limite superior de referência para os respectivos testes. Trinta e sete pacientes (67,3%) apresentaram Gama GT acima do valor de referência. Em relação à ALT, 82,1% dos pacientes apresentaram valores acima do limite superior adotado, sendo que destes, 78,3% possuíam valores pelo menos 1,5 vezes superior ao limite da normalidade e apenas 1 paciente com valores acima de 5 vezes deste limite.

A mediana da hemoglobina pré-tratamento do HCV colhida até 6 meses antes do início deste foi de 13,9 g/dL. Após 1 mês do início do tratamento foi de 13,4 g/dL, representando uma queda média de 3,6% dos seus valores.

5.2 Características relacionadas ao HCV e seu tratamento na população de estudo

As características relacionadas ao vírus da Hepatite C, bem como efeitos colaterais e resposta ao tratamento do HCV dos pacientes coinfectados HIV/HCV são representados nos gráficos 1 e 2 e mostrados nas tabelas de 3 a 5.

O genótipo do HCV foi avaliado em todos os pacientes (gráfico 1). O genótipo 1 foi o responsável pela infecção na grande maioria dos casos, representando 87,75% do total. O subtipo 1a, identificado em 60% dos casos, foi isoladamente o genótipo mais comum. Os genótipos não 1 representaram 12,25% dos casos, sendo 1,75% genótipo 2 e 10,5% genótipo 3a, com 1 e 6 casos, respectivamente.

Gráfico 1 - Distribuição dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo, de acordo com o genótipo do vírus HCV. n, % do total.

A avaliação da carga viral do HCV pré-tratamento foi realizada em 49 pacientes e em 33 deles (67,35%) estava acima de 600.000 UI/mL.

Em relação ao tratamento do HCV, dos 57 pacientes que realizaram biópsia hepática pré-tratamento, apenas 1 se recusou a iniciá-lo. Assim, 56 pacientes iniciaram o uso regular de Interferon associado à Ribavirina, com os tempos de tratamento representados no gráfico 2. Vinte e oito pacientes (49%) completaram 48 semanas ou mais de tratamento para o HCV. Já 22 pacientes (39%) tiveram seu tratamento suspenso entre a 24^a e 48^a semanas. A suspensão do tratamento entre a 24^a e a 12^a semanas ocorreu em apenas 3 pacientes (5%), devido a quadro depressivo (12^a semana), ausência de queda de carga viral do HCV na 12^a semana e uso irregular das medicações na 22^a semana. Três pacientes (5%) também tiveram seu tratamento interrompido antes da 12^a semana, sendo um devido à anemia grave na 4^a semana, outro por mal estar geral relacionado ao Interferon, com abandono na 3^a semana, e outro por abandono na 10^a semana.

Gráfico 2 - Distribuição do número absoluto (; porcentagem) de pacientes coinfetados HIV/HCV elegíveis para o estudo que foram submetidos ao tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, de acordo com o tempo total de tratamento.

O Interferon pequilado (α 2a ou 2b) foi prescrito como tratamento do HCV para a maioria dos pacientes (80%), enquanto 20% utilizaram o Interferon convencional, ambos associados à Ribavirina. Em 5,4% dos casos a dose do Interferon teve que ser diminuída durante o tratamento, enquanto 7,1% dos pacientes tiveram redução da dose da Ribavirina. Dez pacientes (17,8%) tiveram redução tanto do Interferon quanto da Ribavirina ao longo do tratamento, todos relacionados a efeitos colaterais, totalizando assim 30,3% dos pacientes com redução de dose de pelo menos uma medicação durante o tratamento.

Eventos adversos graves ou alterações laboratoriais importantes relacionados ao tratamento do HCV foram identificados em 41% dos pacientes, sendo a anemia, definida como Hb < 12 g/dL para indivíduos do sexo masculino e Hb < 11 g/dL para o sexo feminino, o mais comum. Dezesesseis pacientes apresentaram anemia durante o tratamento, sendo nove como evento adverso único e outros sete pacientes associada a outro evento adverso. A neutropenia foi o segundo evento adverso mais frequente, presente de maneira isolada ou associada a outro em 8 pacientes. Quatro pacientes descontinuaram o tratamento devido a eventos adversos, assim distribuídos: mal estar geral (3ª semana), anemia grave (4ª semana e 28ª semana) e depressão (12ª semana).

Tabela 3 - Características relacionadas ao HCV e seu tratamento nos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Variável	Valor
Carga viral do HCV pré-tratamento *	
< 600.000 UI/mL, n (%)	16 (32,65%)
≥ 600.000 UI/mL, n (%)	33 (67,35%)
Tipo de INF utilizado **	
Peguilado (α 2a ou 2b), n (%)	45 (80%)
INF convencional	11 (20%)
Dose média de Ribavirina (mg/Kg), média (±DP) ***	15,4 (± 2,46)
Diminuição da dose durante o tratamento **	
Não houve	39 (69,7%)
Interferon isolado	3 (5,4%)
Ribavirina isolada	4 (7,1%)
Interferon e Ribavirina	10 (17,8%)
Eventos adversos graves e alterações laboratoriais importantes decorrentes do tratamento **	23 (41%)
anemia isolada (2 provavelmente auto-imunes)	9
anemia + neutropenia	4
anemia + plaquetopenia	1
anemia + neutropenia + depressão	1
Eventos adversos graves e alterações laboratoriais importantes decorrentes do tratamento **	23 (41%)
anemia + neoplasia (reto)	1
neutropenia isolada	1
neutropenia + plaquetopenia	1
neutropenia + plaquetopenia + depressão	1
plaquetopenia isolada	1
plaquetopenia + síndrome colestática	1
mal-estar geral importante	1
depressão isolada	1

* Avaliada em 49 pacientes

** Avaliado em 56 pacientes que iniciaram o tratamento

*** Avaliada em 53 pacientes

5.2.1 Resposta Viroológica durante o tratamento do HCV

A resposta virológica durante o tratamento do HCV foi a seguinte:

- 1- Resposta Viroológica Rápida (RVR), que corresponde à carga viral do HCV na 4ª semana de tratamento: avaliada em oito pacientes, dos quais 5 possuíam genótipo 1a, 2 pacientes genótipo 1b e apenas 1 genótipo 3a. O Interferon prescrito foi o $\alpha 2A$ para todos os casos e a média da dose em mg/Kilograma (mg/Kg) de Ribavirina foi 15,88, com desvio padrão de $\pm 1,73$. Nenhum dos pacientes apresentou RVR;
- 2- Resposta Viroológica Precoce (RVP), que corresponde à carga viral do HCV na 12ª semana de tratamento: avaliada em trinta e cinco pacientes, dos quais 13 pacientes tiveram resposta precoce total (PCR negativo na 12ª semana), com o seguinte desfecho: 6 pacientes (46%) obtiveram Resposta Viroológica Sustentada (RVS) após 24 semanas do final do tratamento, 3 pacientes (23%) não sustentaram a resposta, 2 pacientes tiveram RNA-HCV positivo na 24ª e 48ª semanas e outros 2 abandonaram o tratamento antes da 48ª semana. Todos os pacientes que obtiveram RVP completa possuíam genótipo 1 (sendo 7 deles 1a) e utilizaram Interferon peguilado (10 pacientes com $\alpha 2A$ e outros 3 com $\alpha 2b$) como tratamento. A média da dose de Ribavirina foi 15,48 mg/Kg, com desvio padrão de $\pm 1,23$. Cinco pacientes foram nulos de resposta (não houve queda de pelo menos 2 log na 12ª semana), todos portadores de genótipo 1, sendo quatro pacientes 1a e um paciente 1a/1b. Todos utilizaram como tratamento Inteferon peguilado (2 pacientes com $\alpha 2A$ e outros 3 com $\alpha 2b$) e a média da dose de Ribavirina foi 17,65 mg/Kg, com desvio padrão de $\pm 2,35$. O desfecho dos nulos de resposta foi o seguinte: um paciente teve o tratamento suspenso na 14ª, porém os outros 4 trataram até pelo menos a 24ª semana, sem resposta virológica parcial;
- 3- A Resposta Viroológica na 24ª semana para avaliar o respondedor lento ou o não respondedor parcial foi avaliada em 47 pacientes;
- 4- A Resposta Viroológica ao Final do Tratamento (RVF): foi avaliada em 29 pacientes, dos quais 18 obtiveram RNA-HCV negativo. Assim, 32% dos pacientes que iniciaram o tratamento obtiveram RVF.
- 5- Resposta Viroológica Sustentada (RVS), que corresponde ao RNA-HCV negativo na 24ª semana após o final do tratamento, foi obtida em 12 pacientes. Este valor corresponde a 21% dos 56 pacientes coinfectados HIV/HCV que iniciaram a terapia, entre todos os genótipos. No caso dos genótipos não 1, dois dos sete pacientes (28,6%) obtiveram RVS e dos pacientes que possuíam genótipo 1, dez entre quarenta e nove (20,4%) obtiveram RVS.

6- Recidivantes: sete pacientes que apresentaram RVF na 48^a semana tiveram carga viral do HCV detectável 24 semanas após o final do tratamento. Um paciente que não havia sido avaliado na 48^a semana, pois teve seu tratamento interrompido na 24^a com RVP completa, obteve RVS, não entrando no cálculo da RVF.

5.2.1.1 Fatores relacionados à Resposta Viroológica Sustentada no tratamento dos pacientes coinfectados HIV/HCV

O efeito das variáveis idade, Gama GT no início do tratamento do HCV, grau de fibrose na biópsia hepática, genótipo do HCV, carga viral do HCV pré-tratamento e controle da infecção pelo HIV, que classicamente favorecem a RVS no tratamento de pacientes coinfectados HIV/HCV, foi estudado por meio de regressão logística múltipla. Em outra análise (tabela 4), contendo as mesmas variáveis acima, a expressão do HLA-G na biópsia foi incluída. Quarenta e dois pacientes que realizaram tratamento do HCV pelo menos até a 24^a semana preencheram critérios estatísticos para o teste.

Entre as variáveis estudadas, as que se correlacionaram com a RVS nesta população de 42 pacientes foram os genótipos não 1 ($p = 0,05$) e a carga viral do HCV pré-tratamento menor que 600.000 UI/mL. A expressão do HLA-G na biópsia hepática não apresentou qualquer influência em relação à RVS, e nem mesmo interferiu nos valores de p e *odds ratio* ajustado encontrados na primeira análise realizada somente com as seis variáveis iniciais.

Tabela 4 - Efeitos da idade, Gama GT no início do tratamento do HCV, grau de fibrose na biópsia hepática, genótipo do HCV, carga viral do HCV pré-tratamento, controle da infecção pelo HIV e expressão do HLA-G na biópsia hepática, na RVS ao tratamento do HCV de pacientes coinfectados HIV/HCV que realizaram tratamento do HCV pelo menos até a 24ª semana e que preencheram critérios estatísticos para a análise. HC-FMRP-USP de 2003 a 2006.

RVS dos pacientes que trataram HCV pelo menos até a 24ª semana n=42				
Variável	Odds Ratio ajustado	IC 95%		p valor
Idade (≥ 40 anos x < 40 anos)	0,30	0,02	5,52	0,42
Gama GT no início do tratamento (normal x elevada)	1,55	0,14	17,14	0,72
Fibrose (leve x moderada/grave)	23,32	0,33	1675,05	0,15
Genótipo do HCV (não 1 x um)	33,02	1,05	1040,96	0,05
Carga viral do HCV pré- tratamento (< 600.000 x ≥ 600.000)	48,38	3,81	614,46	$<0,01$
HIV controlado ($CD4 > 200$ células/mm ³ e CV < 50 cópias/mL)	7,95	0,36	176,37	0,19
Expressão do HLA-G na biópsia hepática (ausente x presente)	0,89	0,09	9,10	0,92

IC = intervalo de confiança

O efeito do genótipo da IL28B na RVS dos pacientes que trataram o HCV pelo menos até a 24ª semana foi analisado em uma regressão logística simples, não contemplado na análise múltipla, devido à impossibilidade da execução do teste com a presença desta variável. Os genótipos foram categorizados em C/T + T/T e C/C isolado para possibilitar a análise estatística. Estes dados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5 - Influência dos genótipos relacionados à IL28B na RVS ao tratamento do HCV de pacientes coinfectados HIV/HCV que realizaram tratamento do HCV pelo menos até a 24ª semana. HC-FMRP-USP de 2003 a 2006.

RVS dos pacientes que trataram HCV pelo menos até a 24ª semana n=39				
	Odds Ratio bruto	IC 95%		p valor
IL28B (genótipo C/C x C/T+T/T)	4,71	1,03	21,65	0,05

A presença do genótipo C/C apresentou 4,71 vezes mais chance de obtenção de RVS em pacientes coinfectados HIV/HCV que foram selecionados para o estudo em comparação com a somatória dos genótipos C/T e T/T, agrupados por necessidade do teste estatístico.

Em números absolutos, dos 12 pacientes do estudo que obtiveram RSV, em 10 o polimorfismo de IL28B pode ser avaliado, com o seguinte resultado: 6 pacientes possuíam genótipo C/C e os outros 4 C/T. Nenhum dos pacientes com RVS era homozigoto T/T.

5.3 Características relacionadas ao HIV e seu tratamento na população de estudo

As variáveis relacionadas ao HIV, seu tratamento e a contagem de linfócitos T CD4+ estão distribuídas na tabela 6. A contagem dos linfócitos T CD4+, apesar de ser uma variável hematológica do paciente, estará descrita neste item pela sua estreita relação com a infecção pelo HIV.

Tabela 6 - Características relacionadas ao HIV dos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Variável	n (porcentagem do total) média (máximo – mínimo)
Carga viral do HIV próximo à biópsia hepática*	
< 50 cópias/mL	27 (49,1%)
≥ 50 cópias/mL	28 (50,9%)
Contagem de linfócitos T CD4+ próximo ao início do tratamento do HCV**	629,5 (1512 – 270)
HIV controlado no início do tratamento do HCV*** (CD4 > 200 células/mm ³ e CV < 50 cópias/mL)	32 (62,75%)
Uso de Zidovudina na Terapia Antirretroviral durante o tratamento do HCV*	
Presente	31 (56,4%)
Ausente	14 (25,4%)
Nunca utilizou TARV	10 (18,2%)
Terceiro antirretroviral que compõe o esquema terapêutico***	
Não-análogo	23 (41,8%)
Inibidor de Protease	17 (30,9%)
Não-análogo + Inibidor de Protease	5 (9,1%)
Nunca utilizou TARV	10 (18,2%)

* Avaliado em 55 pacientes

** Avaliado em 53 pacientes

*** Avaliado em 51 pacientes

A quantificação da carga viral do HIV realizada até 3 meses antes da biópsia hepática pode ser avaliada em 55 pacientes. Destes, 27 (49,1%) possuíam carga viral menor que 50 cópias/mL, limite de detecção à época. Os 28 pacientes restantes possuíam carga viral do HIV detectável, isto é, maior ou igual a 50 cópias/mL.

Em relação a contagem de linfócitos T CD4+, esta foi analisada próximo ao início do tratamento do HCV (até 6 meses antes), e apresentou média de 629,5 células/mm³, com uma variação de 270 a 1512, em 53 pacientes analisados.

A análise dos esquemas antirretrovirais para o HIV permitiu identificar que 10 entre os 51 pacientes avaliados nunca haviam feito uso de TARV. Os demais 81,8% dos pacientes utilizavam a medicação durante o tratamento do HCV. A Zidovudina compunha o esquema de análogos em 31 pacientes (56,4%) e os não-análogos fechavam o esquema terapêutico em 23 deles (41,8%).

A contagem dos linfócitos T CD4+ variou durante o tratamento do HCV conforme evidenciado no gráfico 3. No sexto mês após o início do tratamento houve queda de 34% da média dos linfócitos T CD4+, valor que se manteve até o final do tratamento. Seis meses após a suspensão da terapia para o HCV, os linfócitos T CD4+ voltaram a subir a patamares próximos aos do início do tratamento.

Gráfico 3 - Variação da média da contagem dos linfócitos T CD4+ no início do tratamento do HCV, no 6º mês, ao final do tratamento e seis meses após o final do tratamento, dos pacientes coinfectados HIV/HCV elegíveis para o estudo que foram submetidos ao tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006. Avaliação realizada em 44 pacientes.

5.4 Avaliação das variáveis genéticas da população de estudo

As variáveis genéticas avaliadas nos pacientes elegíveis para o estudo foram o polimorfismo da Inserção/Deleção (I/D) dos 14 pares de base (14pb) do HLA-G e da IL28B, que estão representados na tabela 7.

Tabela 7 - Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos dos 14pb do HLA-G e da IL28B nos pacientes coinfectados HIV/HCV que foram submetidos à biópsia hepática pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Polimorfismos		Frequência
14pb HLA-G (n=43)		
Alelos	14pb D	0,55 (47/86) *
	14pb I	0,45 (39/86) *
Genótipos	14pb D/D	0,26 (11/43) **
	14pb D/I	0,58 (25/43) **
	14pb I/I	0,16 (7/43) **
IL28B n=44 (rs12979860)		
Alelos	Alelo C	0,625 (55/88) *
	Alelo T	0,375 (33/88) *
Genótipos	14pb C/C	0,34 (15/44) **
	14pb C/T	0,56 (25/44) **
	14pb T/T	0,10 (7/44) **

* resultados expressos em frequência alélica e entre parênteses valor absoluto do número de alelos encontrados/número total de alelos;

** resultados expressos em frequência genotípica e entre parênteses valor absoluto do número de genótipos encontrados/número total de genótipos.

A frequência dos alelos das 14pb do HLA-G foi avaliada em 43 pacientes, sendo o alelo D o mais frequente, expresso em 55% dos pacientes. O genótipo mais frequente foi o heterozigoto D/I, presente em 58% dos pacientes.

O estudo da expressão da IL28B mostrou predominância do alelo C, presente em 62,5% dos 44 pacientes estudados. O genótipo mais frequente também foi o heterozigoto C/T, presente em 56% dos pacientes.

5.5 Avaliação da biópsia hepática

5.5.1 Hemossiderose, esteatose, fibrose e índice de atividade histológica na biópsia hepática da população de estudo

A biópsia hepática realizada pré-tratamento do HCV foi critério de inclusão do estudo, portanto analisada em todos os pacientes (n=57). A distribuição das variáveis relacionadas à biópsia está demonstrada na tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição das características histológicas das biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006 elegíveis para o estudo.

Variável	Categorização	n=57
Hemossiderose		
ausente		27 (47,4%)
grau 1	Grupo 0 = 75,5%	16 (28,1%)
grau 2		11 (19,3%)
grau 3	Grupo 1 = 24,5%	3 (5,2%)
grau 4		0
Esteatose		
ausente	Ausente = 75,45%	43 (75,45%)
grau 1		11 (19,3%)
grau 2	Presente = 24,55%	2 (3,5%)
grau 3		1 (1,75%)
Fibrose		
ausente		0
grau 1	Leve = 70,1%	23 (40,3%)
grau 2		17 (29,8%)
grau 3	Moderada/grave = 29,9%	12 (21,1%)
grau 4		5 (8,8%)
Atividade Histológica		
0 – 9	Hepatite leve	26 (45,6%)
≥ 9	Hepatite moderada a grave	31 (54,4%)
Variáveis quantificadas em número absoluto e porcentagem do total		

A hemossiderose, classificada segundo Sciot et al ⁽¹³⁰⁾, estava ausente em 47,4% dos casos e distribuída de forma decrescente nos demais graus de deposição de ferro, com 28,1% grau 1, 19,3% no grau 2, 5,2% no grau 3 e ausente no grau 4. Esta variável foi categorizada

em dois grupos para possibilitar análise comparativa (apresentada adiante): grupo 0 (hemossiderose ausente ou grau 1), com 75,5% dos casos, e grupo 1 (graus de 2 a 4), com 24,5% restantes.

A esteatose, classificada segundo Brunt et al ⁽¹³¹⁾, estava ausente em 75,45% dos casos e distribuída em 19,3%, 3,5% e 1,75% nos graus 1, 2 e 3, respectivamente. Esta variável também foi categorizada como ausente (75,45%) ou presente (24,55%) para ser analisada posteriormente.

A fibrose hepática, avaliada segundo a classificação de Knodell et al ⁽¹³²⁾, modificada por Desmet et al ⁽¹³³⁾, estava presente em todos os casos estudados. O grau 1 representou 40,3% dos casos e o grau 2, 29,8%. O grau 3 contava com 21,1% e o grau 4, 8,8%. Novamente a categorização em dois grupos se fez necessária para a comparação posterior e foi assim conduzida: fibrose leve (graus 1 e 2) com 70,1% dos casos e moderada a grave (graus 3 e 4) nos 29,9% restantes.

O IAH, também classificado por Knodell et al ⁽¹³²⁾, modificado por Desmet et al ⁽¹³³⁾, foi inicialmente representado de maneira categorizada, por se tratar de variável com muitas subdivisões, o que dificulta a análise comparativa. Assim, hepatite leve (IAH < 9) foi encontrada em 45,6% dos pacientes e hepatite moderada a grave (IAH ≥ 9) nos outros 54,4%.

5.5.2 Imuno-histoquímica para HLA-G

As lâminas com a imuno-histoquímica para HLA-G preparadas segundo a metodologia descrita por Crispin et al ⁽¹³⁴⁾ foram analisadas pelo Prof Dr Sérgio Zucoloto do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Inicialmente a análise visava somente avaliar qualitativamente a presença ou ausência da marcação do HLA-G no tecido hepático dos pacientes coinfectados HIV/HCV. Entretanto, durante a checagem das lâminas, foi possível determinar, de maneira subjetiva, baseado na experiência do patologista, uma gradação semi-quantitativa na intensidade da marcação do HLA-G, em leve (marcação presente em até 30% da lâmina), moderada (marcação de 30 a 60% da lâmina) e intensa (marcação em mais de 60% da lâmina). Esta classificação, segundo a intensidade, tem correspondência direta com a classificação qualitativa, de modo que a presença do HLA-G equivale à marcação leve, moderada ou intensa na classificação semi-quantitativa e, a ausência, tem o mesmo significado nas duas classificações.

A figura 11 mostra os controles positivo (A) e negativo (B) da reação. Trata-se de tecido de trofoblasto obtido de abortos espontâneos até a 12ª semana de gestação, nos quais o HLA-G é expresso (controle positivo) e não expresso (controle negativo no qual o anticorpo é suprimido).

A figura 12 de A a D mostra a imuno-histoquímica para HLA-G em tecido hepático de pacientes coinfectados HIV/HCV, desde a ausência de expressão até a expressão intensa.

Figura 11 – A) Trofoblasto obtido de placenta proveniente de aborto espontâneo até a 12ª semana de gestação, corado pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos e visualizado em aumento de 20x. As áreas de cor marrom intenso ao redor dos trofoblastos representam a expressão do HLA-G. B) Trofoblasto obtido de placenta proveniente de aborto espontâneo até a 12ª semana de gestação, corado pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos na qual é suprimido o anticorpo anti-HLA-G. Visualizado em aumento de 20x. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010.

O HLA-G foi expresso em 38 biópsias, o que representa 66,7% dos casos. A classificação de intensidade de expressão está representada na tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Intensidade de expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo.

Intensidade de Expressão do HLA-G	n = 38
Leve	18 (47,4%)
Moderada	16 (42,1%)
Intensa	4 (10,5%)

Na figura 12, quando há a expressão do HLA-G (figuras 12 B, C e D), esta acontece no hepatócito, de maneira global, marcando citoplasma e membrana citoplasmática. Não há marcação nuclear. Em algumas lâminas observou-se uma marcação mais pronunciada próxima a regiões de fibrose mais intensa, mas esta observação não pode ser quantificada, tratando-se de um dado subjetivo do patologista (figura 13).

Figura 12 – Biópsias hepáticas obtidas pela técnica de punção percutânea, no lobo hepático direito, com agulha Tru-cut de 14 Gauge, guiada por ultrassonografia, e coradas pela técnica de imunohistoquímica para HLA-G em tecidos. Visualizado em aumento de 20x. A) Ausência de marcação para HLA-G. B) Marcação leve, de até 30% da lâmina (elipse em preto). A seta em preto aponta para hepatócito marcado dentro da área de expressão. C) Marcação moderada, entre 30 a 60% da lâmina. O círculo e a elipse em preto delimitam aproximadamente as áreas onde ocorrem a expressão, e a seta em preto aponta um hepatócito marcado dentro da área de expressão. D) Marcação intensa, ocorrendo em mais de 60% da lâmina. Neste caso os hepatócitos estão marcados difusamente. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010.

Figura 13 – Biópsia hepática obtida pela técnica de punção percutânea, no lobo hepático direito, com agulha Tru-cut de 14 Gauge, guiada por ultrassonografia, e corada pela técnica de imuno-histoquímica para HLA-G em tecidos. Visualizado em aumento de 40x. Seta branca mostra área de fibrose e a seta amarela mostra marcação de um hepatócito para HLA-G, mais intensa nas áreas próximas à fibrose. HC-FMRP-USP, Fevereiro de 2010.

5.6 Análise comparativa dos fatores que podem estar relacionados à expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas

Os dados que serão apresentados neste item 5.6 correspondem a possíveis associações de variáveis demográficas, relacionadas à resposta ao tratamento do HCV, ao HIV, genéticas e da biópsia hepática que poderiam influenciar na expressão do HLA-G em tecido hepático dos pacientes coinfectados HIV/HCV.

Tabela 10 - Variáveis demográficas, relacionadas à resposta ao tratamento do HCV, ao HIV, genéticas e da biópsia hepática e sua possível relação com a expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo.

Variável	Expressão do HLA-G na biópsia hepática		p valor*
	Não expresso n=19 (33,3%)	Expresso n=38 (66,7%)	
Sexo			0,66
Masculino	15 (34,9%)	28 (65,1%)	
Feminino	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
Cor da pele			0,28
Branco	15 (30,6%)	34 (69,4%)	
Afro-americano (mulato)	4 (50%)	4 (50%)	
Uso prévio de álcool			0,45
Sim	7 (28%)	18 (72%)	
Não	12 (37,5%)	20 (62,5%)	
Gama GT normal pré-biópsia**			0,895
Valores até 60 UI/L	6 (33,3%)	12 (66,7%)	
Valores acima de 60 UI/L	13 (35,1%)	24 (64,9%)	
ALT normal pré-biópsia***			0,25
Valores até 41 UI/L	2 (20%)	8 (80%)	
Valores acima de 41 UI/L	16 (34,8%)	30 (65,2%)	
Índice de Massa Corporal**** (Kg/m²)			0,61
Até 25 Kg/m ²	9 (39,1%)	14 (60,9%)	
Acima de 25 Kg/m ²	5 (31,25%)	11 (68,75%)	
Genótipo do HCV			0,57
Genótipos 1	16 (32%)	34 (68%)	
Genótipos não 1	3 (42,9%)	4 (57,1%)	
Carga viral do HCV (pré-tratamento do HCV)*****			0,61
< 600.000 UI/mL, n (%) ≥ 600.000 UI/mL, n (%)	6 (37,5%)	10 (62,5%)	
	10 (30,3%)	23 (69,7%)	
Carga Viral do HIV próximo à biópsia**			0,63
< 50 cópias/mm ³	8 (29,6%)	19 (70,4%)	
≥ 50 cópias/mm ³	10 (35,7%)	18 (64,3%)	

Continua

Variável	Expressão do HLA-G na biópsia hepática		p valor*
	Não expresso n=19 (33,3%)	Expresso n=38 (66,7%)	
Infecção pelo HIV controlada (CD4 > 200 e CV < 50) *****			0,86
Sim	11 (34,4%)	21 (65,6%)	
Não	7 (36,8%)	12 (63,2%)	
IL28B *****			0,94
Genótipo C/C	5 (33,3%)	10 (66,7%)	
Genótipo C/T + T/T	10 (34,5%)	19 (65,5%)	
Inserção/Deleção dos 14pb do HLA-G *****			0,35
D/D	5 (45,45%)	6 (55,55%)	
I/D	7 (28%)	18 (72%)	
I/I	1 (14,3%)	6 (85,7%)	
Hemossiderose			0,28
Grupo 0 (ausente e grau 1)	16 (37,2%)	27 (62,8%)	
Grupo 1 (graus 2, 3 e 4)	3 (21,4%)	11 (78,6%)	
Esteatose			0,66
Ausente	15 (34,9%)	28 (65,1%)	
Presente (graus 1, 2 e 3)	4 (28,6%)	10 (71,4%)	
Fibrose			< 0,01
Leve (ausente, grau 1 e 2)	18 (45%)	22 (55%)	
Moderada/grave (graus 3 e 4)	1 (5,9%)	16 (94,1%)	
Índice de Atividade Histológica (IAH)			0,45
Hepatite leve (0 a 9)	10 (38,5%)	16 (61,5%)	
Hepatite moderada a grave (≥ 9)	9 (29%)	22 (71%)	
Valores expressos em números absolutos e entre parênteses porcentagem dentro da mesma variável			
* p valor obtido por meio do teste Qui-Quadrado utilizando como nível de significância $p < 0,05$			
** Avaliada em 55 pacientes			
*** Avaliada em 56 pacientes			
**** Avaliado em 39 pacientes			
***** Avaliado em 49 pacientes			
***** Avaliado em 44 pacientes			
***** Avaliado em 43 pacientes			

Entre as 16 variáveis estudadas na Tabela 8, apenas a variável fibrose se relacionou com a expressão do HLA-G na biópsia hepática dos pacientes coinfectados HIV/HCV. Em pacientes que apresentavam graus de fibrose moderada a grave (graus 3 e 4) havia maior expressão de HLA-G, com significância estatística. Foi realizada regressão logística simples entre as dezesseis variáveis apresentadas acima e a expressão de HLA-G, confirmando o

achado da análise do Qui-Quadrado, com *Odds Ratio* bruto de 13,09 (IC 95% = 1,58 – 108,39). Uma regressão logística múltipla foi realizada com doze das dezesseis variáveis que preencheram critérios para esta análise, e também confirmou a relação entre fibrose moderada a grave e expressão do HLA-G.

O polimorfismo da I/D dos 14pb do HLA-G não teve relação com sua expressão na biópsia hepática.

Uma análise por meio de regressão logística múltipla, contendo somente as variáveis analisadas na biópsia hepática (hemossiderose, esteatose, fibrose e índice de atividade histológica) e seu efeito simultâneo na expressão do HLA-G, mostrou novamente significância estatística somente em relação à fibrose, com maior expressão em pacientes com fibrose moderada a grave (tabela 11).

Tabela 11 - Análise das variáveis relacionadas à biópsia hepática e sua relação com a expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo.

Efeito	<i>Odds Ratio</i> ajustado	IC 95%		<i>p</i> valor
Hemossiderose (2,3 e 4 x 0 e 1)	1,45	0,30	6,94	0,64
Esteatose (presente x ausente)	0,78	0,17	3,58	0,75
Fibrose (moderada/grave x leve)	15,52	1,62	149,20	0,02
Índice de Atividade Histológica (≥ 9 x <9)	0,68	0,19	2,41	0,56

IC = intervalo de confiança

5.6.1 Análise da classificação semiquantitativa da expressão do HLA-G em biópsias hepáticas

No grupo de 38 pacientes nos quais o HLA-G foi expresso na biópsia hepática avaliamos a classificação semiquantitativa, baseada em análise subjetiva do patologista, descrita anteriormente, em relação a variáveis previamente selecionadas.

A tabela 12 mostra nove variáveis que puderam ser correlacionadas com a classificação semiquantitativa, das quais nenhuma apresentou significância estatística.

Tabela 12 - Variáveis demográficas, relacionadas à resposta ao tratamento do HCV, ao HIV, genéticas e da biópsia hepática e sua relação com classificação semiquantitativa da expressão do HLA-G nas biópsias hepáticas realizadas nos pacientes coinfectados HIV/HCV pré-tratamento do HCV no HC-FMRP-USP de 2003 a 2006, elegíveis para o estudo.

Variável	Intensidade da Expressão do HLA-G n=38			p valor*
	Leve	Moderada	Intensa	
Gama GT normal pré biópsia**				0,92
Valores até 60 UI/L	6 (50%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)	
Valores acima de 60 UI/L	12 (50%)	9 (37,5%)	3 (12,5%)	
ALT normal pré-biópsia***				0,22
Valores até 41 UI/L	3 (27,3%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	
Valores acima de 41 UI/L	15 (57,7%)	9 (34,6%)	2 (7,7%)	
Carga viral do HCV (pré-tratamento do HCV)****				0,52
< 600.000 UI/mL, n (%)	4 (40%)	5 (50%)	1 (10%)	
≥ 600.000 UI/mL, n (%)	14 (60,9%)	7 (30,4%)	2 (8,7%)	
Carga Viral do HIV próximo à biópsia***				0,42
< 50 cópias/mm ³	7 (36,8%)	9 (47,4%)	3 (15,8%)	
≥ 50 cópias/mm ³	10 (55,6%)	7 (38,9%)	1 (5,5%)	
Inserção/Deleção dos 14pb do HLA-G*****				0,15
D/D	5 (83,3%)	0	1 (16,7%)	
I/D + I/I	11 (45,8%)	10 (41,7%)	3 (12,5%)	
Esteatose				0,33
Ausente	15 (53,6%)	11 (39,3%)	2 (7,1%)	
Presente (graus 1, 2 e 3)	3 (30%)	5 (50%)	2 (20%)	
Fibrose				0,62
Leve (ausente, grau 1/2)	11 (50%)	8 (36,4%)	3 (13,6%)	
Moderada/grave (graus 3/ 4)	7 (43,75%)	8 (50%)	1 (6,25%)	
Índice de Atividade Histológica (IAH)				0,58
Hepatite leve (0 a 9)	6 (37,5%)	8 (50%)	2 (12,5%)	
Hepatite moderada a grave (≥ 9)	12 (54,5%)	8 (36,4%)	2 (9,1%)	

Valores expressos em números absolutos e entre parênteses porcentagem dentro da mesma variável

* p valor obtido por meio do teste Qui-Quadrado, utilizando-se como nível de significância $p < 0,05$

** Avaliada em 36 pacientes

*** Avaliada em 37 pacientes

**** Avaliado em 33 pacientes

***** Avaliado em 30 pacientes

Discussão

6 DISCUSSÃO

A coinfeção HIV e HCV possui distribuição mundial e é um importante agravo de saúde pública, principalmente nos países nos quais a TARV está bem estabelecida. Nesses locais, a doença hepática terminal proveniente do HCV tem se tornado uma das principais causas de mortalidade entre os pacientes coinfectados ^(71;72). A infecção pelo HIV possui impacto negativo na evolução natural da infecção pelo HCV, aumentando a carga viral, o risco para evolução de cirrose e doença hepática terminal, contribuindo sobremaneira para pior evolução nos graus de fibrose hepática ^(76;82-85).

São muitos os mecanismos propostos para explicar a rápida progressão da doença hepática nos pacientes coinfectados pelo HIV/HCV ⁽⁸⁶⁾. Nos últimos anos, a participação do HLA-G, um antígeno leucocitário humano de classe Ib, não clássico, descrito inicialmente com a função de conferir ao feto proteção contra resposta imunológica materna ⁽¹⁹⁾, vem sendo estudada no cenário das doenças infecciosas virais ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾, inclusive pelo HCV ^(20;94). O fato de a expressão do HLA-G estar relacionada à evasão desses vírus à imunovigilância ⁽²¹⁾ pode explicar, em parte, a evolução desfavorável da infecção pelo HCV na coinfeção com o HIV.

Nosso grupo identificou, pela primeira vez, a expressão do HLA-G em biópsia hepática de pacientes monoinfectados pelo HCV e sua possível relação com fibrose hepática ⁽¹³⁶⁾. Não há na literatura nenhum estudo que mostre a expressão deste HLA em biópsia hepática de pacientes coinfectados HIV/HCV.

Neste trabalho, avaliamos pela primeira vez a expressão de formas solúveis e de membrana do HLA-G em biópsia hepática de pacientes coinfectados com HIV/HCV. Fatores demográficos, histológicos e genéticos do hospedeiro, relacionados ao HIV e ao HCV, classicamente descritos na literatura como tendo influência na progressão e tratamento do HCV na coinfeção, foram correlacionados com a expressão do HLA-G.

O estudo contou com 57 pacientes coinfectados com HIV/HCV. A amostra teve predomínio do sexo masculino (75,4%), com mediana de idade, na época da realização da biópsia hepática, de 38 anos (variação de 25 a 50 anos). Estudos brasileiros e multicêntricos, envolvendo pacientes coinfectados, também apresentaram o sexo masculino como a maioria da amostra, variando de 65 a 85%, e com média de idade de 34,08 a 45 anos ^(74;100;137;138). Houve predomínio de indivíduos brancos (86%) em relação aos afro-americanos (14%), e nenhum relato de pacientes da cor amarela ou outra em nossa casuística. Esse dado não é

compatível com a distribuição de grupos étnicos no Brasil, segundo censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 2010. O país possuía, à época, 47,51% de brancos e 43,42% de pardos (multirraciais)⁽¹³⁹⁾. A distribuição da etnia no estudo de Chung et al (ACTG5071) foi de 50% de brancos e 22% de negros⁽¹³⁸⁾. Vale ressaltar que tanto no censo Brasil quanto no estudo de Chung et al a cor da pele foi diretamente respondida pelo sujeito da pesquisa, enquanto no presente estudo tratou-se de dado obtido do prontuário médico. Um estudo multicêntrico de Focaccia et al que avaliou 4.996 prontuários médicos de pacientes monoinfectados com HCV encontrou proporção de 80% brancos e 20% não brancos⁽¹⁴⁰⁾, muito semelhante a proporção de nossa amostra. Esse dado pode não corresponder à real distribuição de grupos étnicos da amostra, tendo em vista o método como foi obtido.

A presença de pacientes com diabetes mellitus na amostra foi de 5,3% (3 pacientes). Há dúvida na literatura de qual o real impacto da resistência insulínica/diabetes na RVS. Bongiovanni et al encontraram, em um estudo com 29 pacientes, que a resistência insulínica foi fator independente de pior RVR, enquanto Merchant et al não demonstraram relação entre esta variável e a RVS⁽¹⁴¹⁾. Apesar de pequena, a proporção de pacientes com diabetes mellitus ganha importância nesta amostra, pois um dos três pacientes que possuíam a doença pertence ao genótipo 3 do HCV. Assim, 15% dos pacientes genótipos não 1 possuíam diabetes mellitus. Em relação à ingestão prévia de álcool, 43,9% dos pacientes declararam o uso, mas todos declararam ter permanecido pelo menos seis meses abstinentes para a realização da biópsia hepática.

O índice de massa corporal foi obtido em 39 pacientes (68,7%) e a variável estatura foi o grande limitante da obtenção do dado, pois estava ausente em 18 dos prontuários. A maioria dos pacientes (53,8%) foi classificada como saudável, segundo a classificação da OMS⁽¹³⁵⁾, pois possuía IMC entre 18,5 e 25 Kg/m². A mediana do IMC foi de 24 Kg/m², com apenas 2 pacientes abaixo do valor de 18,5 Kg/m². Quatorze pacientes (35,8%) apresentavam sobrepeso e apenas dois (5,2%) possuíam IMC acima de 30, sendo, portanto considerados obesos. No estudo de Focaccia et al, feito a partir da análise de prontuários, 70% dos pacientes tiveram o IMC calculado e 47,9% estavam entre 18,5 e 25 Kg/m². A média de IMC da população de estudo de Chung et al foi de 22,07 Kg/m²^(138;140).

A partir da análise comparativa dos dados demográficos, a presente amostra é compatível nas variáveis sexo, idade e IMC com outros estudos que avaliaram pacientes mono e coinfectados HIV/HCV.

Quanto a variáveis bioquímicas, 82,1% e 67,3% dos pacientes possuíam valores de ALT e Gama GT, respectivamente, acima do limite da normalidade em nossa casuística. Entre

os 46 pacientes com elevação da ALT, 78,3% possuíam níveis entre 1,5 a 5 vezes o limite superior da normalidade, mostrando lesão hepatocelular na maioria dos pacientes da amostra no momento da biópsia hepática.

O genótipo 1 do HCV foi encontrado em 87,75% dos pacientes de nossa amostra. Quando avaliado isoladamente, o genótipo 1a predominou em relação aos demais, com 34 pacientes (60%) como portadores desse. Entre os sete pacientes (12,25%) que possuíam HCV de genótipos não 1, seis (10,5%) correspondiam a genótipo 3a e apenas um (1,75%) ao genótipo 2. Não foram encontrados pacientes com genótipo 4, 5 ou 6. O trabalho de Focaccia et al traçou a distribuição de genótipos do HCV em 1348 pacientes mono infectados do Brasil com 64% pertencentes ao genótipo 1. Quando analisada a região sudeste do país, na qual se situa Ribeirão Preto, a proporção de genótipo 1 chegou a 72% dos casos⁽¹⁴⁰⁾. Mendes-Corrêa et al encontraram 66,4% de pacientes portadores de genótipo 1 em 170 coinfectados HIV/HCV de dois serviços de tratamento de Aids da região metropolitana de São Paulo⁽⁷⁴⁾. Fica claro a predominância do genótipo 1 do HCV nos diversos grupos populacionais estudados no Brasil e, principalmente, na região sudeste. Na casuística deste estudo, a frequência de genótipo 1 foi ainda mais alta que a dos trabalhos citados.

A carga viral do HCV pré-tratamento da hepatite C foi avaliada em 49 pacientes da amostra. Valores maiores ou iguais a 600.000 UI/mL foram encontrados em 33 deles (67,35%), e os demais possuíam valores abaixo desse patamar. Martinez-Sierra et al estudaram 180 pacientes divididos em dois grupos (mono infectados por HCV e coinfectados HIV/HCV) na busca de fatores demográficos, virológicos (HIV e HCV), histológicos e relacionados à TARV que diferenciasssem os mesmos. A média da carga viral do HCV foi significativamente maior no grupo de coinfeção, com valores de 570.000 cópias/mL⁽¹⁴²⁾. Laguno et al, em 2009, no estudo comparativo entre PEG-IFN α 2a e α 2b no tratamento do HCV em coinfectados com HIV, encontraram carga viral do HCV maior que 600.000 UI/mL em 59,1% dos pacientes do estudo⁽¹⁰⁰⁾. No estudo de Torriani et al (APRICOT), 72% dos 860 pacientes estudados possuíam carga viral do HCV maior que 800.000 UI/mL⁽¹⁴³⁾. Assim, a carga viral pré-tratamento do HCV, em nossa casuística, é compatível com estudos de coinfeção com expressivo número de pacientes.

O tratamento do HCV, apesar de não representar diretamente os objetivos do estudo, foi avaliado no intuito de qualificar a casuística como representativa da população de coinfectados HIV/HCV, pois variáveis relacionadas à terapia do HCV estão bem determinadas na literatura. Em nosso estudo, a medicação prescrita para 80% dos pacientes foi PEG-IFN (α 2a ou α 2b), sempre associados à RBV, com dose média de 15,4 mg/Kg

(SD±2,46) dessa última medicação, durante todo o tratamento. Os 20% restantes (11 pacientes) foram tratados com IFN convencional, também associado à RBV. Houve diminuição da dose de pelo menos uma das drogas prescritas em 30,3% dos pacientes. No estudo de Laguno et al 37% dos pacientes que utilizaram PEG-IFN + RBV tiveram diminuição da dose de pelo menos uma das duas drogas⁽¹⁰⁰⁾, número muito próximo ao da nossa casuística. Em relação a efeitos adversos relacionados ao tratamento, 41% dos pacientes do nosso estudo experimentaram efeitos adversos graves ou alterações laboratoriais relevantes, sendo anemia a mais frequente (28,5% dos pacientes). Quatro pacientes (7,1%) descontinuaram o tratamento devido a efeitos adversos. No estudo de Laguno et al 55% dos pacientes apresentaram efeitos adversos grau III (grave, do ponto de vista médico, ou algo significativo que não representa risco à vida) ou IV (consequências que representam risco de morte, sendo indicada intervenção urgente), 28% deles apresentaram anemia e 10% descontinuaram o tratamento devido a efeitos colaterais⁽¹⁰⁰⁾, dados muito próximos aos da nossa casuística.

Quando analisamos a Resposta Viroológica Sustentada ao tratamento do HCV nos pacientes de nossa casuística, encontramos 21% de resposta global, considerando todos os genótipos do HCV. Os grandes estudos multicêntricos randomizados de tratamento de pacientes coinfectados HIV/HCV possuem taxa global de RVS variando entre 27 a 45%^(100;138;143;144). A RVS global de nossa amostra foi inferior pelo fato da mesma ser constituída, em grande parte (87,75%), de pacientes com genótipo 1 (que possui pior resposta ao tratamento). Entre os trabalhos randomizados de pacientes coinfectados, o de Chung et al é o que mais se aproxima desta porcentagem de pacientes de genótipo 1, com 77% dos pacientes tratados. Por sua vez, sua RVS global é a mais próxima de nossa, 27%⁽¹³⁸⁾. Outro dado que tem que ser levado em consideração quando se analisa a menor RVS global de nossos pacientes ao tratamento do HCV, é que 20% deles utilizaram IFN convencional no tratamento e as taxas de resposta desse medicamento são menores que o PEG-INF utilizado nos demais estudos.

A RVS específica para genótipos não 1, isto é 2 e 3, foi de 28,6%, e para genótipo 1 de 20,4% em nossa casuística. Quando considerados isoladamente, os pacientes com genótipo 1 têm de 14 a 30% de RVS, enquanto nos pacientes com genótipo 2 e 3 esta taxa varia de 43 a 73%, nos grandes estudos multicêntricos randomizados^(100;138;143;144). A RVS para genótipo 1 em nossa casuística foi comparável com os dados de literatura, entretanto a RVS de pacientes com genótipos não 1 foi menor. Este fato pode ser explicado analisando individualmente os casos de pacientes com genótipos 2 e 3. Um deles apresentou grave anemia hemolítica e teve

seu tratamento suspenso na 28ª semana, com PCR da 24ª negativo. Entretanto este paciente não sustentou resposta na avaliação de 24 semanas após a suspensão. Outro paciente possuía diabetes mellitus e pode ter havido relação com a não resposta ao tratamento. Assim, 28,6% da casuística de pacientes com genótipo não 1 apresentaram fatores que provavelmente influenciaram na baixa RVS, explicando a diferença desta taxa de resposta entre nossa amostra e os grandes *trials* randomizados da literatura.

Entre os fatores preditores de RVS do tratamento do HCV em pacientes coinfectados com HIV, o genótipo do HCV foi a única variável comum às principais análises multivariadas por regressão logística dos grandes estudos randomizados^(100;138;143;144), que se relacionou de forma independente com as taxas de RVS. Pacientes com genótipo 1 e 4, quando comparados aos pacientes com genótipo 2 e 3, apresentaram pior RVS. Outros fatores como o não uso de drogas, carga viral do HIV indetectável no início do tratamento, menor carga viral do HCV, idade inferior a 40 anos ao tratamento, valores de ALT menores que 3 vezes o limite superior da normalidade e graus de fibrose mais baixos à biópsia hepática fizeram parte, individualmente, dos fatores de bom prognóstico para RVS nesses estudos^(100;138;143;144). O estudo de Neukan et al, de 2012, que propõe um algoritmo preditivo de RVS para o tratamento do HCV em pacientes coinfectados com HIV, engloba a carga viral do HCV pré-tratamento menor ou igual a 600.000 UI/mL e o genótipo não 1 como dois dos três fatores preditivos positivos principais de RVS (a terceira variável, o genótipo de IL28B, será discutido a diante)⁽¹⁰¹⁾. Em nossa casuística a análise multivariável por regressão logística mostrou o genótipo não 1 e carga viral do HCV menor que 600.000 UI/mL como fatores favoráveis independentes para RVS, com *odds ratio* respectivo de 32,06 (IC: 1,07 – 964,35, $p=0,05$) e 47,12 (IC: 3,96 – 561,42, $p<0,01$). Outras variáveis como idade, valores de Gama GT, graus de fibrose na biópsia hepática, controle da infecção pelo HIV no início do tratamento e presença da expressão do HLA-G não interferiram na RVS dos pacientes do estudo (vide tabela completa da regressão logística em apêndice A).

O genótipo da IL28B foi avaliado em 44 pacientes de nossa casuística. Essa característica genética foi amplamente relacionada como fator independente de RVS ao tratamento da hepatite C, tanto em mono quanto em pacientes coinfectados com HIV. O genótipo C/C apresenta melhor RVS, quando comparado aos C/T e T/T^(102;145). Em nosso estudo o genótipo C/T foi o mais comum, encontrado em 56% dos pacientes, seguido do genótipo C/C (34%) e, com menor frequência, T/T (10%). Esta distribuição genotípica apresenta algumas divergências na população brasileira. No estado do Rio Grande do Sul, Grandi et al encontraram 14,4% de genótipos C/C, 48,7% de genótipos C/T e 36,9% de T/T

em 263 pacientes mono infectados com HCV que foram submetidos a tratamento com PRG-IFN + RBV ⁽¹⁴⁶⁾. No estado do Rio de Janeiro, região mais próxima a Ribeirão Preto, Ramos et al encontraram em 66 pacientes cronicamente infectados pelo HCV uma frequência de 32% de genótipos C/C, 44% de C/T e 24% de TT ⁽¹⁴⁷⁾, mais próxima a nossa casuística. Na população espanhola, Rallón et al analisaram a influência dos genótipos da IL28B na resposta ao tratamento de pacientes co infectados HIV/HCV de 164 pacientes. A proporção de genótipos deste estudo mostrou 46% de C/C, 44% de C/T e 10% de T/T ⁽¹⁰²⁾, também próxima ao nosso estudo. Este dado pode ser explicado pela predominância de descendência europeia na região sul do Brasil ⁽¹⁴⁸⁾, aproximando nossa frequência de genótipos da IL28B à população espanhola. Quanto à participação dessa variável na RVS, o estudo de Rallón et al, citado acima, encontrou 75% de resposta virológica sustentada ao tratamento do HCV em co infectados com HIV no genótipo C/C e 38% nos genótipos C/T e T/T somados, considerando todos os genótipos do HCV ⁽¹⁰²⁾. Este dado foi calculado em 39 pacientes de nossa casuística que terminaram o tratamento para HCV. Foi utilizada uma regressão logística simples devido à impossibilidade estatística de participação da variável na análise multivariada da regressão múltipla (automaticamente excluída da análise, pois nem todos os pacientes determinados possuíam este genótipo identificado). O *odds ratio* bruto da análise demonstrou que pacientes com genótipo C/C têm 4,71 vezes chance de responderem com RVS ao tratamento do HCV em relação aos pacientes C/T e T/T ([IC: 1,03 – 21,65], $p=0,05$), em nossa amostra. Entre os 12 pacientes que alcançaram RVS, dez tinham genótipo de IL28B determinado. Seis pertenciam ao genótipo C/C e 4 ao genótipo C/T. Nenhum portador do genótipo T/T respondeu ao tratamento. Estes dados estão em concordância com os da literatura ⁽¹⁰²⁾.

As variáveis relacionadas ao HIV que poderiam influenciar no tratamento do HCV também foram analisadas em nossa casuística. Entre os estudos multicêntricos randomizados de tratamento do HCV em pacientes co infectados com HIV ^(100;138;143;144), somente o de Chung et al encontrou relação entre carga viral do HIV detectável e menor RVS ao tratamento do HCV ⁽¹³⁸⁾. Em nosso estudo analisamos a contagem de carga viral do HIV em 55 pacientes da amostra próximo ao início do tratamento do HCV. Desses, 62,75% possuíam carga viral do HIV menor que o limite de detecção do teste (50 cópias/mL), valor muito semelhante aos estudos da literatura que variaram de 60 a 73,5% ^(100;138;143;144). Outro fator relacionado ao HIV, mas que não foi atribuída influência na RVS ao tratamento do HCV, foi a contagem de células CD4+ no início do tratamento do HCV. Esta variável pôde ser quantificada em 53 pacientes de nossa amostra, com média de 629,5 células/mm³, um pouco superior aos estudos

clássicos da literatura, que variou de 477 a 597 células/mm³ ^(100;138;143;144). No Brasil, estudo de Mendes-Corrêa et al com 189 pacientes coinfectados elegíveis para tratamento do HCV, a média de CD4+ foi de 394 células/mm³ ⁽⁷⁴⁾. A variação da contagem de células TCD4+ durante o tratamento do HCV foi mostrada por Laguno et al ⁽¹⁰⁰⁾ em seu estudo de tratamento do HCV em coinfectados com HIV, variando de modo semelhante ao de nossa casuística. No trabalho citado, houve queda de até 45% nos níveis de CD4+ durante o tratamento, com recuperação completa após este. Os nossos dados mostram queda de 34%, com recuperação total 24 semanas após o final do tratamento. Em nossa casuística, 81,8% dos pacientes utilizavam regularmente TARV, dado compatível com estudos de tratamento do HCV na coinfecção com HIV, nos quais esta proporção variou entre 73 a 88% ^(74;100;138;143;144).

Características histológicas da biópsia hepática dos pacientes coinfectados HIV/HCV foram estudadas. O papel dos depósitos de ferro no tecido hepático de pacientes coinfectados HIV/HCV ainda não está bem estabelecido na literatura ⁽¹⁴⁹⁾. D'Incao et al, em um estudo brasileiro que analisou 20 anos de biópsia hepática em um hospital de Porto Alegre, encontraram diferença significativa entre depósitos de ferro na biópsia dos pacientes monoinfectados pelo HCV e coinfectados HIV/HCV. No primeiro grupo, 8% das biópsias apresentavam depósitos de ferro, enquanto no segundo, havia 20% ⁽¹⁴⁹⁾. Em nossa casuística, 52,6% das biópsias apresentavam depósito de ferro. Vale destacar que hemossiderose grau I (leve) representou a maioria dos depósitos e, somada à ausência de ferro (47,4%), perfaz 75,5% de nossas amostras.

A esteatose hepática nos pacientes coinfectados HIV/HCV parece não se relacionar diretamente à infecção por estes vírus (exceto com genótipo 3 do HCV, no qual os pacientes, após tratamento, melhoram esta variável) e tem relação com IMC, diabetes, atividade necroinflamatória e fibrose ⁽¹⁵⁰⁾. A evolução da esteatose, quando se comparam pacientes monoinfectados com HCV e coinfectados com HIV/HCV, é discrepante na literatura médica. Por um lado, Castéra et al estudaram a evolução desta variável em 427 pacientes monoinfectados pelo HCV comparados com 137 pacientes coinfectados HIV/HCV, e encontraram uma maior proporção de depósitos de gordura no segundo grupo (41,6% x 67,1%) ⁽¹⁵¹⁾. Por outro, pelo menos oito estudos com a mesma análise comparativa não encontraram relação entre coinfecção e esteatose ⁽¹⁵⁰⁾. Uma metanálise de 283 casos de pacientes coinfectados HIV/HCV revelou a presença de 23% de esteatose na biópsia hepática destes indivíduos ⁽¹⁵²⁾. Em nossa casuística, a presença desta variável no tecido hepático foi de 24,5%, muito próxima ao dado apresentado da literatura. A atividade inflamatória na biópsia hepática parece ter relação com a esteatose, sendo que, quanto maior o acúmulo de gordura no

tecido hepático, maior a atividade inflamatória ⁽¹⁵¹⁾. No estudo de Castéra et al, citado acima, a proporção de atividade inflamatória foi maior nos pacientes coinfectados HIV/HCV em relação aos monoinfectados, com proporções de 78,1% de A2-A3 (classificação de METAVIR ⁽¹⁵³⁾) x 55,5%, respectivamente. Apesar de diferentes, a classificação de Knodell et al ⁽¹³²⁾ modificada por Desmet et al ⁽¹³³⁾ (utilizada neste trabalho) e a de METAVIR ⁽¹⁵³⁾, são comparáveis ⁽¹⁵⁴⁾. Assim, em nossa casuística encontramos apenas 54,4% de atividade inflamatória moderada a grave, contra 78,1% do estudo de Castéra. Entretanto, como a esteatose e a atividade inflamatória estão correlacionadas ⁽¹⁵¹⁾ e no estudo de Castéra o acúmulo de gordura hepática foi encontrado em 67,1% dos pacientes comparado com 23% de nossa casuística, era de se esperar que a atividade inflamatória naquela amostra fosse superior à nossa, como de fato ocorreu.

A fibrose hepática, outra variável importante estudada na biópsia hepática, parece ter relação com a RVS no tratamento do HCV. No estudo de Mira et al houve diferença entre RVS de pacientes com e sem cirrose, respectivamente 25 e 39% ⁽¹⁵⁵⁾. Rallón et al encontraram que a fibrose hepática leve medida por elastografia pelo FibroScan é fator independente de RVS em coinfectados com HIV ⁽¹⁰²⁾. Entretanto, nos grandes estudos randomizados de resposta ao tratamento do HCV em pacientes coinfectados com HIV, as variáveis relacionadas à biópsia hepática não configuraram fatores independentes para RVS ^(100;138;143;144). Nestes estudos, a proporção de pacientes com estágios de fibrose hepática grave (F3 e F4) variou entre 11 e 39%. Em nossa casuística, estágios avançados de fibrose (F3 e F4) foram encontrados em 29,9% dos casos e, na análise multivariada para RVS, esta variável não representou fator independente de resposta ao tratamento. A opção por classificação da fibrose hepática por Knodell et al ⁽¹³²⁾ modificada por Desmet et al ⁽¹³³⁾ no presente estudo foi feita porque tal classificação estratifica esta variável em 4 graus, o que facilita a análise dos dados em uma amostra pequena.

A comparação de dados demográficos, relacionados ao HCV e ao tratamento da hepatite C, ao HIV e à biópsia hepática da população de pacientes coinfectados HIV/HCV encontrados na literatura, com os dados encontrados em nossa casuística, deixa claro que, apesar de pequena, trata-se de uma amostra representativa desta população. Assim, a correlação entre a expressão do HLA-G (que será abordada a seguir) e os dados apresentados até o momento podem ser extrapolados para a população de coinfectados.

O HLA-G, um HLA de classe Ib não clássico, com funções descritas previamente e no início deste tópico, foi correlacionado pela primeira vez com a infecção pelo HCV por Martinetti et al em 2006. Naquele trabalho, diversos polimorfismos relacionados a HLA

foram estudados como fatores de risco independentes para a transmissão vertical HCV. A homozigose para deleção de 14pb, um polimorfismo relacionado a expressão de moléculas do HLA-G, foi identificado como um destes fatores ⁽¹²⁴⁾. A partir daí, alguns estudos exploraram a relação do HCV com HLA-G.

Weng et al mostraram o aumento das moléculas solúveis de HLA-G no sangue de pacientes monoinfectados pelo HCV ⁽²⁰⁾ e nosso grupo descreveu pela primeira vez a expressão das moléculas de HLA-G, solúveis e ligadas à membrana, em tecido hepático de pacientes monoinfectados pelo HCV ⁽¹³⁶⁾. Nesse trabalho, houve expressão nos hepatócitos de 51% das amostras, e essa estava ligada a estágios mais leves de fibrose hepática. A análise multivariada por regressão logística não mostrou, exceto na fibrose, qualquer outra variável que se correlacionava com a expressão do HLA-G no tecido hepático. A expressão do HLA-G em pacientes coinfectados HIV/HCV nunca havia sido estudada.

Neste trabalho, a análise das biópsias hepáticas de pacientes coinfectados com HIV/HCV, coradas por imuno-histoquímica para HLA-G, tanto para moléculas solúveis quanto ligadas à membrana, revelou a presença desse HLA em 66,7% das amostras (38 pacientes). Este dado é inédito na literatura (figura 12).

Essa expressão foi localizada em hepatócitos, tanto no citoplasma quanto na membrana citoplasmática, mostrando haver, provavelmente, moléculas solúveis de HLA-G e formas ligadas à membrana. A técnica de imuno-histoquímica é qualitativa, isto é, revela a presença ou a ausência da molécula em questão. Entretanto, durante a análise das lâminas desta casuística por um patologista experiente em doenças hepáticas (Prof. Dr. Sérgio Zucoloto), foi proposta uma classificação semiquantitativa da intensidade da marcação do HLA-G, em leve (marcação presente em até 30% da lâmina), moderada (marcação de 30 a 60% da lâmina) e intensa (marcação em mais de 60% da lâmina). Esta classificação, segundo a intensidade, tem correspondência direta com a classificação qualitativa, de modo que a presença do HLA-G equivale à marcação leve, moderada ou intensa na classificação semiquantitativa, e a ausência tem o mesmo significado nas duas classificações.

A distribuição da intensidade da expressão entre as lâminas positivas para HLA-G foi 47,4% leve, 42,1% moderada e 10,5% intensa. O significado desta classificação semiquantitativa será avaliado e discutido adiante.

A partir da determinação da existência de HLA-G expresso em tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV, procuramos estudar o polimorfismo de 14pb da região 3'NT do éxon 8 do HLA-G, classicamente relacionado à expressão destas moléculas ⁽¹²⁶⁾, e tido como fator independente de proteção ou sensibilidade a determinadas doenças ^(116;117;122-124).

A genotipagem de 43 pacientes da amostra para a presença da Deleção e/ou Inserção dos 14pb da região 3'NT do *HLA-G* revelou 55% de alelos D e 45% de alelos I. O genótipo D/I foi o mais frequente, presente em 58% dos pacientes, seguido do genótipo D/D (26%) e do genótipo I/I (16%). Um estudo recente de Martelli-Palomino et al determinou a frequência alélica e genotípica dos 14pb de I/D do *HLA-G* na população brasileira e francesa. A presença do alelo D foi de 57% e do alelo I 43% entre as amostras de 153 brasileiros analisados ⁽¹²⁶⁾. A distribuição genotípica foi de 36% de genótipo D/I, 38% de genótipo D/D e 24% de genótipo I/I. A frequência alélica foi muito semelhante entre nossa casuística e o trabalho de Martelli-Palomino, entretanto a frequência genotípica foi diferente, visto que em nosso estudo o genótipo predominante foi o heterozigoto (58%) e no estudo de Martelli-Palomino foi o homozigoto D/D (38%).

Após a determinação dos genótipos dos 14pb da região 3'NT do *HLA-G* de 43 pacientes de nossa amostra, uma análise por regressão logística foi feita (tabela 10) com o objetivo de determinar, entre as 15 variáveis discutidas anteriormente e os genótipos dos 14pb, quais delas teriam associação com a expressão do *HLA-G* na biópsia hepática. Os genótipos de D/I dos 14pb da região 3'NT do *HLA-G* não apresentaram correlação com a expressão de *HLA-G* em biópsias hepáticas dos pacientes coinfectados HIV/HCV.

O fato do genótipo dos 14pb não se correlacionar diretamente com a expressão do *HLA-G* na biópsia hepática não exclui sua influência nessa variável. Os mecanismos de modulação da estabilidade do mRNA e, em última análise, da expressão do *HLA-G*, envolvem diversos outros sítios polimórficos, com relação complexa entre si ⁽¹²⁶⁾.

Outra análise feita por regressão logística simples, correlacionando 9 variáveis estudadas anteriormente e a intensidade da expressão do *HLA-G* (tabela 12), segundo a classificação proposta por Zucoloto, não mostrou diferença entre as intensidades de expressão e as variáveis estudadas. Isto leva a crer que a classificação semiquantitativa de intensidade da expressão do *HLA-G* não exerce efeito em outras variáveis, sendo seus graus de intensidade, portanto equivalentes. Assim, a imuno-histoquímica para determinação deste *HLA-G* em tecido hepático deve ser interpretada de modo qualitativo.

A variável que merece destaque em relação à expressão do *HLA-G* no tecido hepático é a fibrose hepática. Ela foi a única variável que se associou com a expressão do *HLA-G* na biópsia hepática (*odds ratio* bruto = 13,09 [IC: 1,58 – 108,39], $p=0,02$). Uma regressão logística múltipla foi realizada com doze das dezesseis variáveis que preencheram critérios para a esta análise, e também confirmou a relação entre fibrose e expressão do *HLA-G* (*odds ratio* ajustado = 109,8 [IC: 2,7->999,99], $p=0,01$). Graus mais avançados de fibrose (F3 e F4)

estão relacionados a maior expressão do HLA-G quando comparados aos graus mais leves (F1 e F2). Além do estudo prévio de nosso grupo que havia correlacionado a expressão de HLA-G em biópsia de fígado de pacientes monoinfectados pelo HCV com estágios leves de fibrose ⁽¹³⁶⁾, outro trabalho recente de Amiot et al sugeriu um alça autócrina da gênese da fibrose hepática, envolvendo HLA-G e mastócitos no fígado de pacientes monoinfectados pelo HCV ⁽⁹⁴⁾. Assim, o presente estudo é mais uma evidência de que a expressão do HLA-G desempenha papel na fisiopatologia da fibrose hepática dos pacientes infectados pelo HCV e pode estar relacionada ao aumento da gravidade desta variável nos pacientes infectados pelo HIV.

A fibrose hepática é caracterizada pela deposição de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular que origina um polímero complexo, insolúvel e que induz a perda da arquitetura hepática. Estes componentes da fibrose são produzidos pelas células estreladas hepáticas (CEH) que, quando ativadas, deixam a forma quiescente e passam a exibir fenótipo de fibroblastos. A diferenciação dessas células em miofibroblastos envolve 2 fases: a primeira é representada pela ativação da CEH por citocinas, quimiocinas e outras moléculas capazes de induzir processo inflamatório. Caso o processo inflamatório hepático se perpetue, há uma segunda fase de diferenciação, com a transformação das CEH em miofibroblastos ativos, capazes de produzir o colágeno tipo I e a matriz proteica, que originará a fibrose ⁽⁸⁷⁾.

A infecção pelo HCV é um exemplo claro de perpetuação da inflamação hepática e indução da transformação das CEH em miofibroblastos ⁽⁸⁷⁾. Nessa infecção crônica, altos níveis de fator de transformação do crescimento (TGF, do inglês *transforming growth factor*) β são encontrados ⁽¹⁵⁶⁾. Essa citocina, por sua vez, estimula a expressão de genes de produção de colágeno ⁽¹⁵⁷⁾ e a transformação das CEH em miofibroblastos ativos ⁽⁸⁷⁾. Quando ativadas, as CEH expressam receptores de quimiocinas, como CCR5 e CXCR4, tornando-se alvo de infecção direta pelo HIV ⁽⁹⁰⁾.

Nesse contexto, o paciente coinfectado pelo HCV e HIV passa a contar, além da ativação das CEH por citocinas inflamatórias, com a replicação do retrovírus humano em seu interior. Este processo induz a expressão de colágeno tipo I e a secreção de *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), um potente quimioatraente de monócitos e linfócitos. No fígado, estas células contribuem para a perpetuação da inflamação e o aumento da fibrose nos coinfectados ⁽⁹⁰⁾. Além disso, monócitos de pacientes portadores de HIV expressam HLA-G em suas membranas ⁽¹⁵⁸⁾ e produzem IL-10 ⁽¹⁵⁹⁾, que por sua vez é um potente indutor da expressão de HLA-G ⁽¹⁰⁹⁾. A presença deste HLA no fígado modula a resposta inflamatória

para um padrão Th2, o que dificulta o controle da infecção pelo vírus C e pode agravar a fibrose ⁽¹⁸⁾.

Os hepatócitos, em menor grau, também sofrem infecção pelo HIV, ou são estimulados diretamente pela ligação da gp120 com receptor CXCR4. Estas interações promovem apoptose dessas células e liberação de citocinas pró-inflamatórias e fibrinogênicas ^(90;92;93).

Outro mecanismo de gênese da fibrose hepática, envolvendo a infecção pelo HIV, é a translocação intestinal de antígenos bacterianos ⁽⁸⁸⁾. A resposta imune local é diminuída já nos primeiros meses da infecção pelo HIV, devido à infecção da população linfocitária intestinal por este vírus. Isso permite a translocação de antígenos bacterianos (como o LPS) do intestino para o sangue, afetando diretamente as células de Kupffer. Estimuladas via TLR-4, estas células produzem citocinas pró-inflamatórias, com padrão de resposta Th1, e fibrinogênicas ⁽⁸⁸⁾.

Um estudo recente de Amiot et al ⁽⁹⁴⁾ trouxe mais informações em relação a fisiopatologia da fibrose hepática na infecção pelo HCV e o possível envolvimento do HLA-G. A expressão deste HLA em mastócitos estaria associada à indução de fibrose em pacientes monoinfectados por HCV. Inicialmente, a expressão de HLA-G foi identificada por imuno-histoquímica de biópsia hepática, como presente somente em áreas contendo fibrose. Por meio de imunofluorescência dupla, mastócitos foram identificados como sendo as células nas quais a expressão do HLA-G ocorreu. Posteriormente, em cultura de mastócitos humanos da linhagem HMC1.1 estimulados por IFN- α (que induz a expressão de HLA-G), foi determinada por PCR em tempo real, a cinética do perfil de expressão de citocinas dessas células. Como resultado final, foi proposta uma alça autócrina, baseada em mastócitos e expressão do HLA-G, como um dos mecanismos da fibrose hepática em pacientes monoinfectados com HCV.

Os resultados do trabalho de Amiot et al apoiam e refutam os achados do presente estudo. Em relação à fibrose hepática, fornecem base para justificar a maior expressão do HLA-G em biópsias onde o score de fibrose é maior. Entretanto, não houve marcação de hepatócitos na imuno-histoquímica para HLA-G em tecido hepático, o que contradiz nossos achados. Algumas diferenças entre o referido trabalho e o presente estudo podem justificar a ausência de marcação para hepatócitos no trabalho de Amiot et al. Naquele trabalho, os anticorpos anti-HLA-G utilizados para a imuno-histoquímica foram 4H84 (que marca moléculas solúveis e de membrana, tanto desnaturada/mal enoveladas) e MEM-G/1 (que marca exatamente as mesmas moléculas do 4H84), ambos na concentração de 1:100. Em

nosso estudo, além do anticorpo 4H84, utilizamos também o 5A6G7 (que marca somente moléculas solúveis, tanto com conformação preservada quanto desnaturadas) ⁽¹⁶⁰⁾, ambos na concentração de 1:50. Assim, pela especificidade de anticorpos contra um maior número e conformação das moléculas do HLA-G, além de uma maior concentração destes, nós podemos observar a marcação de hepatócitos, o que não ocorreu no trabalho de Amiot et al. Outro viés que pode ser atribuído àquele trabalho, foi na seleção de pacientes. A amostra contou com 90% de pacientes com fibrose grave (F3-F4) e avaliou a expressão de HLA-G em apenas 2 pacientes com graus mais leves de fibrose (F1-F2). No estudo prévio de nosso grupo ⁽¹³⁶⁾ que verificou a expressão de HLA-G no tecido hepático de pacientes mono infectados pelo HCV, justamente os graus mais leves de fibrose se relacionaram com a expressão do HLA-G, identificado em 67% das amostras com fibrose leve.

Esse dado é, em princípio, contraditório em relação ao presente estudo, que identificou a expressão do HLA-G, predominantemente, em estágios mais avançados de fibrose. Uma possível explicação para tal diferença está no fato de que, nos pacientes coinfectados com HIV, a ativação imune, provocada pela translocação de antígenos bacterianos intestinais, estimula as células de Kupffer à produção de citocinas de padrão Th1 ⁽⁸⁸⁾. Ao longo da infecção pelo HIV e a manutenção da ativação do sistema imune pela translocação de antígenos bacterianos (que está presente mesmo em pacientes em uso de TARV) haveria um esgotamento das respostas das células de Kupffer, que propiciaria um padrão de resposta Th2, facilitando a expressão do HLA-G no tecido hepático, que aconteceria em fases mais tardias da coinfeção.

A expressão do HLA-G tem propriedades bem reconhecidas na regulação negativa da resposta imune. Entretanto, o papel protetor ou deletério dessa expressão em determinadas situações, só poderá ser estabelecido com estudos experimentais ou de coorte prospectivo. Assim, por uma limitação metodológica, podemos sugerir que o HLA-G é expresso em tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV e se relaciona com os graus de fibrose da biópsia, sem atribuir um efeito a esta expressão.

O presente estudo possui limitações metodológicas acima descritas por se tratar de um estudo retrospectivo e transversal. Como tal, há impossibilidade de estabelecer relações causais diretas, por não provarem a existência de uma sequência temporal entre exposição ao fator e o subsequente desenvolvimento da doença. São susceptíveis aos chamados vieses de prevalência/incidência, que acontecem quando o efeito de determinados fatores relacionados com a duração da doença é confundido com um efeito na ocorrência da doença. Entretanto, permite calcular uma razão de risco de forma menos dispendiosa, rápida e sem perda de

seguimento de pacientes, configurando-se como a primeira etapa de um estudo de coorte ou ensaio clínico.

Assim, acredito que este trabalho abre caminho para o delineamento de ensaios clínicos que relacionem a expressão do HLA-G na fibrose hepática de pacientes coinfectados com HIV/HCV.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu:

- Descrever, pela primeira vez na literatura, a expressão de HLA-G na biópsia hepática de pacientes coinfectados com HIV/HCV.
- Identificar a fibrose hepática como variável que se relaciona com a expressão de HLA-G no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV.
- Sugerir que a expressão de HLA-G não se configura como preditor de resposta ao tratamento da hepatite C em pacientes coinfectados com HIV/HCV.
- Sugerir que o polimorfismo de D/I de 14pb da região 3'NT do *HLA-G* não é determinante direto da expressão dessa proteína no tecido hepático de pacientes coinfectados com HIV/HCV.
- Lançar as bases para o delineamento de um ensaio clínico relacionando HLA-G e fibrose hepática em pacientes coinfectados com HIV/HCV.

Referências

REFERÊNCIAS

- (1) Mohd HK, Groeger J, Flaxman AD, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: new estimates of age-specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology* 2013 Apr;57(4):1333-42.
- (2) Kershenobich D, Razavi HA, Sanchez-Avila JF, Bessone F, Coelho HS, Dagher L, et al. Trends and projections of hepatitis C virus epidemiology in Latin America. *Liver Int* 2011 Jul;31 Suppl 2:18-29.
- (3) Pereira LM, Martelli CM, Moreira RC, Merchan-Hamman E, Stein AT, Cardoso MR, et al. Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2013;13:60.
- (4) Valente VB, Covas DT, Passos AD. [Hepatitis B and C serologic markers in blood donors of the Ribeirao Preto Blood Center]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005 Nov;38(6):488-92.
- (5) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989 Apr 21;244(4902):359-62.
- (6) MacDonald M, Crofts N, Kaldor J. Transmission of hepatitis C virus: rates, routes, and cofactors. *Epidemiol Rev* 1996;18(2):137-48.
- (7) Nelson PK, Mathers BM, Cowie B, Hagan H, Des JD, Horyniak D, et al. Global epidemiology of hepatitis B and hepatitis C in people who inject drugs: results of systematic reviews. *Lancet* 2011 Aug 13;378(9791):571-83.
- (8) Terrault NA. Sexual activity as a risk factor for hepatitis C. *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S99-105.
- (9) Seeff LB. Natural history of hepatitis C. *Hepatology* 1997 Sep;26(3 Suppl 1):21S-8S.
- (10) Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, et al. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999 Sep 16;341(12):866-70.

-
- (11) Alberti A, Chemello L, Benvegna L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:17-24.
 - (12) Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001 Jul 5;345(1):41-52.
 - (13) Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med* 2013 Jul;19(7):837-49.
 - (14) Buratti E, Gerotto M, Pontisso P, Alberti A, Tisminetzky SG, Baralle FE. In vivo translational efficiency of different hepatitis C virus 5'-UTRs. *FEBS Lett* 1997 Jul 14;411(2-3):275-80.
 - (15) Gerber MA, Thung SN. Histology of the liver. *Am J Surg Pathol* 1987 Sep;11(9):709-22.
 - (16) Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol* 2008 Aug;128(2):133-47.
 - (17) Semmo N, Klenerman P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007 Sep 28;13(36):4831-8.
 - (18) Boyer N, Marcellin P. Pathogenesis, diagnosis and management of hepatitis C. *J Hepatol* 2000;32(1 Suppl):98-112.
 - (19) Rouas-Freiss N, Goncalves RM, Menier C, Dausset J, Carosella ED. Direct evidence to support the role of HLA-G in protecting the fetus from maternal uterine natural killer cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Oct 14;94(21):11520-5.
 - (20) Weng PJ, Fu YM, Ding SX, Xu DP, Lin A, Yan WH. Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2011 May;72(5):406-11.
 - (21) Favier B, LeMaout J, Carosella ED. Functions of HLA-G in the immune system. *Tissue Antigens* 2007 Apr;69 Suppl 1:150-2.
 - (22) Beyrer C, Baral SD, van GF, Goodreau SM, Chariyalertsak S, Wirtz AL, et al. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet* 2012 Jul 28;380(9839):367-77.

-
- (23) Beyrer C, Abdool KQ. The changing epidemiology of HIV in 2013. *Curr Opin HIV AIDS* 2013 Jul;8(4):306-10.
- (24) Teva I, Bermudez MP, Ramiro MT, Buéla-Casal G. [Current epidemiological situation of HIV/AIDS in Latin America: analysis of differences among countries]. *Rev Med Chil* 2012 Jan;140(1):50-8.
- (25) Okie S. Fighting HIV--lessons from Brazil. *N Engl J Med* 2006 May 11;354(19):1977-81.
- (26) Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Política Brasileira de Enfrentamento da Aids - resultados, avanços e perspectivas. 2012.
- (27) Divisão de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto. Distribuição dos casos de AIDS e HIV até 2011. 2013.
- (28) Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Boletim Epidemiológico - Aids e DST 2013. 2013.
- (29) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983 May 20;220(4599):868-71.
- (30) Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981 Jul 3;30(25):305-8.
- (31) Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis* 1983 Aug;148(2):339-45.
- (32) Oleske J, Minnefor A, Cooper R, Jr., Thomas K, dela CA, Ahdieh H, et al. Immune deficiency syndrome in children. *JAMA* 1983 May 6;249(17):2345-9.
- (33) Kahn JO, Walker BD. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1998 Jul 2;339(1):33-9.
- (34) Deeks SG, Walker BD. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 2007 Sep;27(3):406-16.

-
- (35) Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996 Apr 1;124(7):654-63.
- (36) Vaishnav YN, Wong-Staal F. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 1991;60:577-630.
- (37) Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998;67:1-25.
- (38) Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012 Apr;2(4):a007161.
- (39) Rubbert A, Behrens G, Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 Infection. <http://hivbook.com/category/part-1-the-basics/3-pathogenesis-of-hiv-1-infection/> 2014.
- (40) Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol* 2002 Jun;83(Pt 6):1253-65.
- (41) Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000 Apr 7;288(5463):55-6.
- (42) Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De OF, Cordonnier F, Lemee V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009 Aug;15(8):871-2.
- (43) Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002 Feb 1;29(2):184-90.
- (44) Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 1989 Oct 5;264(28):16948-56.
- (45) Santoro MM, Perno CF. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN Microbiol* 2013;2013:481314.
- (46) Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, et al. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997 Jun;71(6):4284-95.

-
- (47) Okulicz JF, Lambotte O. Epidemiology and clinical characteristics of elite controllers. *Curr Opin HIV AIDS* 2011 May;6(3):163-8.
- (48) Horton RE, McLaren PJ, Fowke K, Kimani J, Ball TB. Cohorts for the study of HIV-1-exposed but uninfected individuals: benefits and limitations. *J Infect Dis* 2010 Nov 1;202 Suppl 3:S377-S381.
- (49) Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993 Nov 12;262(5136):1011-8.
- (50) Altfeld M, Fadda L, Frleta D, Bhardwaj N. DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nat Rev Immunol* 2011 Mar;11(3):176-86.
- (51) Diaz-Mitoma F, Kumar A, Karimi S, Kryworuchko M, Daftarian MP, Creery WD, et al. Expression of IL-10, IL-4 and interferon-gamma in unstimulated and mitogen-stimulated peripheral blood lymphocytes from HIV-seropositive patients. *Clin Exp Immunol* 1995 Oct;102(1):31-9.
- (52) Tripathi P, Agrawal S. The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection. *AIDS* 2007 Jul 11;21(11):1395-404.
- (53) Mbisa JL, Bu W, Pathak VK. APOBEC3F and APOBEC3G inhibit HIV-1 DNA integration by different mechanisms. *J Virol* 2010 May;84(10):5250-9.
- (54) Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, Weeks KA, et al. Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 2008 Dec 19;29(6):1009-21.
- (55) Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, et al. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology* 2007;4:65.
- (56) Boutwell CL, Rolland MM, Herbeck JT, Mullins JI, Allen TM. Viral evolution and escape during acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2010 Oct 15;202 Suppl 2:S309-S314.
- (57) Akari H, Arold S, Fukumori T, Okazaki T, Strebel K, Adachi A. Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *J Virol* 2000 Mar;74(6):2907-12.

-
- (58) Fraternale A, Paoletti MF, Dominici S, Buondelmonte C, Caputo A, Castaldello A, et al. Modulation of Th1/Th2 immune responses to HIV-1 Tat by new pro-GSH molecules. *Vaccine* 2011 Sep 16;29(40):6823-9.
- (59) Cloyd MW, Chen JJ, Adegboyega P, Wang L. How does HIV cause depletion of CD4 lymphocytes? A mechanism involving virus signaling through its cellular receptors. *Curr Mol Med* 2001 Nov;1(5):545-50.
- (60) Tomaras GD, Yates NL, Liu P, Qin L, Fouda GG, Chavez LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 2008 Dec;82(24):12449-63.
- (61) Forthal DN, Landucci G, Phan TB, Becerra J. Interactions between natural killer cells and antibody Fc result in enhanced antibody neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2005 Feb;79(4):2042-9.
- (62) Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R, Goedert JJ, et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 2002 Aug;31(4):429-34.
- (63) Lajoie J, Hargrove J, Zijenah LS, Humphrey JH, Ward BJ, Roger M. Genetic variants in nonclassical major histocompatibility complex class I human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G molecules are associated with susceptibility to heterosexual acquisition of HIV-1. *J Infect Dis* 2006 Jan 15;193(2):298-301.
- (64) Martin MP, Carrington M. Immunogenetics of HIV disease. *Immunol Rev* 2013 Jul;254(1):245-64.
- (65) Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998 Mar 26;338(13):853-60.
- (66) Thompson MA, Aberg JA, Hoy JF, Telenti A, Benson C, Cahn P, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel. *JAMA* 2012 Jul 25;308(4):387-402.

-
- (67) Departamento de DST Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Ministério da Saúde; 2013.
- (68) Cooper DA, Merigan TC. Clinical treatment. *AIDS* 1996;10 Suppl A:S133-S134.
- (69) Seden K, Back D, Khoo S. New directly acting antivirals for hepatitis C: potential for interaction with antiretrovirals. *J Antimicrob Chemother* 2010 Jun;65(6):1079-85.
- (70) Soriano V, Sherman KE, Rockstroh J, Dieterich D, Back D, Sulkowski M, et al. Challenges and opportunities for hepatitis C drug development in HIV-hepatitis C virus-co-infected patients. *AIDS* 2011 Nov 28;25(18):2197-208.
- (71) Bica I, McGovern B, Dhar R, Stone D, McGowan K, Scheib R, et al. Increasing mortality due to end-stage liver disease in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 2001 Feb 1;32(3):492-7.
- (72) Puoti M, Spinetti A, Ghezzi A, Donato F, Zaltron S, Putzolu V, et al. Mortality for liver disease in patients with HIV infection: a cohort study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000 Jul 1;24(3):211-7.
- (73) Alter MJ. Epidemiology of viral hepatitis and HIV co-infection. *J Hepatol* 2006;44(1 Suppl):S6-S9.
- (74) Mendes-Correa MC, Martins LG, Tenore S, Leite OH, Leite AG, Cavalcante AJ, et al. Barriers to treatment of hepatitis C in HIV/HCV coinfecting adults in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010 May;14(3):237-41.
- (75) De Santis GC, Brunetta DM, Vilar FC, Brandao RA, de Albernaz Muniz RZ, de Lima GM, et al. Hematological abnormalities in HIV-infected patients. *Int J Infect Dis* 2011 Dec;15(12):e808-e811.
- (76) Hernandez MD, Sherman KE. HIV/hepatitis C coinfection natural history and disease progression. *Curr Opin HIV AIDS* 2011 Nov;6(6):478-82.
- (77) Potter M, Oduyungbo A, Yang H, Saeed S, Klein MB. Impact of hepatitis C viral replication on CD4+ T-lymphocyte progression in HIV-HCV coinfection before and after antiretroviral therapy. *AIDS* 2010 Jul 31;24(12):1857-65.

-
- (78) Peters L, Mocroft A, Soriano V, Rockstroh JK, Losso M, Valerio L, et al. Hepatitis C virus coinfection does not influence the CD4 cell recovery in HIV-1-infected patients with maximum virologic suppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009 Apr 15;50(5):457-63.
- (79) Kamat A, Misra V, Cassol E, Ancuta P, Yan Z, Li C, et al. A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. *PLoS One* 2012;7(2):e30881.
- (80) Kovacs A, Karim R, Mack WJ, Xu J, Chen Z, Operskalski E, et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2010 Mar 15;201(6):823-34.
- (81) Hershow RC, O'Driscoll PT, Handelsman E, Pitt J, Hillyer G, Serchuck L, et al. Hepatitis C virus coinfection and HIV load, CD4+ cell percentage, and clinical progression to AIDS or death among HIV-infected women: Women and Infants Transmission Study. *Clin Infect Dis* 2005 Mar 15;40(6):859-67.
- (82) Graham CS, Baden LR, Yu E, Mrus JM, Carnie J, Heeren T, et al. Influence of human immunodeficiency virus infection on the course of hepatitis C virus infection: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2001 Aug 15;33(4):562-9.
- (83) Martin-Carbonero L, de L, V, Moreno A, Maida I, Foucher J, Barreiro P, et al. Liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C and persistently normal liver enzymes: influence of HIV infection. *J Viral Hepat* 2009 Nov;16(11):790-5.
- (84) Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, Garcia-Bengoechea M, Hernandez-Quero J, et al. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997 Jan;26(1):1-5.
- (85) Bonacini M, Govindarajan S, Blatt LM, Schmid P, Conrad A, Lindsay KL. Patients co-infected with human immunodeficiency virus and hepatitis C virus demonstrate higher levels of hepatic HCV RNA. *J Viral Hepat* 1999 May;6(3):203-8.
- (86) Rotman Y, Liang TJ. Coinfection with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus: virological, immunological, and clinical outcomes. *J Virol* 2009 Aug;83(15):7366-74.
- (87) Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S47-S56.

-
- (88) Balagopal A, Philp FH, Astemborski J, Block TM, Mehta A, Long R, et al. Human immunodeficiency virus-related microbial translocation and progression of hepatitis C. *Gastroenterology* 2008 Jul;135(1):226-33.
- (89) Olaso E, Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J Hepatol* 1998 Nov;29(5):836-47.
- (90) Tuyama AC, Hong F, Saiman Y, Wang C, Ozkok D, Mosoian A, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-1 infects human hepatic stellate cells and promotes collagen I and monocyte chemoattractant protein-1 expression: implications for the pathogenesis of HIV/hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *Hepatology* 2010 Aug;52(2):612-22.
- (91) Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, et al. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 2004 Sep 20;200(6):761-70.
- (92) Kong L, Cardona MW, Moreno-Fernandez ME, Ma G, Shata MT, Sherman KE, et al. Low-level HIV infection of hepatocytes. *Virology* 2012;9:157.
- (93) Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez TS, Bren GD, Paya CV. Human immunodeficiency virus-induced apoptosis of human hepatocytes via CXCR4. *J Infect Dis* 2003 Nov 15;188(10):1455-60.
- (94) Amiot L, Vu N, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Chalmel F, Gascan H, et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. *J Hepatol* 2014 Feb;60(2):245-52.
- (95) Operskalski EA, Kovacs A. HIV/HCV co-infection: pathogenesis, clinical complications, treatment, and new therapeutic technologies. *Curr HIV/AIDS Rep* 2011 Mar;8(1):12-22.
- (96) Sulkowski MS. Hepatitis C virus-human immunodeficiency virus coinfection. *Liver Int* 2012 Feb;32 Suppl 1:129-34.
- (97) Departamento de Aids DST e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Viral C e Coinfecções. Ministério da Saúde do Brasil; 2011.

-
- (98) Yu JW, Wang GQ, Sun LJ, Li XG, Li SC. Predictive value of rapid virological response and early virological response on sustained virological response in HCV patients treated with pegylated interferon alpha-2a and ribavirin. *J Gastroenterol Hepatol* 2007 Jun;22(6):832-6.
- (99) Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, Smith C, Marinos G, Goncales FL, Jr., et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2002 Sep 26;347(13):975-82.
- (100) Laguno M, Cifuentes C, Murillas J, Veloso S, Larrousse M, Payeras A, et al. Randomized trial comparing pegylated interferon alpha-2b versus pegylated interferon alpha-2a, both plus ribavirin, to treat chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus patients. *Hepatology* 2009 Jan;49(1):22-31.
- (101) Neukam K, Camacho A, Caruz A, Rallon N, Torres-Cornejo A, Rockstroh JK, et al. Prediction of response to pegylated interferon plus ribavirin in HIV/hepatitis C virus (HCV)-coinfected patients using HCV genotype, IL28B variations, and HCV-RNA load. *J Hepatol* 2012 Apr;56(4):788-94.
- (102) Rallon NI, Naggie S, Benito JM, Medrano J, Restrepo C, Goldstein D, et al. Association of a single nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene with response to hepatitis C therapy in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *AIDS* 2010 May 15;24(8):F23-F29.
- (103) Andersson T, Flockhart DA, Goldstein DB, Huang SM, Kroetz DL, Milos PM, et al. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. *Clin Pharmacol Ther* 2005 Dec;78(6):559-81.
- (104) Ng PC, Zhao Q, Levy S, Strausberg RL, Venter JC. Individual genomes instead of race for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther* 2008 Sep;84(3):306-9.
- (105) Dausset J, VIDAL G. [Detection of incomplete antibodies by the technic of erythrocytes trypsinized and utilized in plasma medium]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1950 May;144(9-10):679-81.
- (106) Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 2007 Feb 28;48(1):11-23.
- (107) Veit TD, Cazarolli J, Salzano FM, Schiengold M, Chies JA. New evidence for balancing selection at the HLA-G locus in South Amerindians. *Genet Mol Biol* 2012 Dec;35(4 (suppl)):919-23.

-
- (108) Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, et al. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. *Cell Mol Life Sci* 2011 Feb;68(3):433-51.
- (109) Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol* 1999 May;11(5):803-11.
- (110) LeMaoult J, Caumartin J, Daouya M, Favier B, Le RS, Gonzalez A, et al. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. *Blood* 2007 Mar 1;109(5):2040-8.
- (111) Yan WH, Lin A, Chen BG, Chen SY. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 2009 Sep 1;200(5):820-6.
- (112) Lafon M, Prehaud C, Megret F, Lafage M, Mouillot G, Roa M, et al. Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. *J Virol* 2005 Dec;79(24):15226-37.
- (113) LeBouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, et al. Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection. *Hum Immunol* 2009 Dec;70(12):1016-9.
- (114) Menier C, Rouas-Freiss N, Corosella ED. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/HLAinCancerID20070.html> 2008 Available from: URL: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/HLAinCancerID20070.html>
- (115) Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011 Feb;68(3):369-95.
- (116) Fabris A, Segat L, Catamo E, Morgutti M, Vendramin A, Crovella S. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2011 Jan;106(1):139-44.
- (117) Haddad R, Cilio Alves DC, Rocha-Junior MC, Azevedo R, do Socorro Pombo-de-Oliveira, Takayanagui OM, et al. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011 Mar;27(3):283-8.

-
- (118) Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003 May;55(2):63-79.
- (119) Brenol CV, Veit TD, Chies JA, Xavier RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol* 2012 Jan;52(1):82-91.
- (120) Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 2003 Aug;4(8):626-37.
- (121) Rousseau P, Le DM, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003 Nov;64(11):1005-10.
- (122) Fabris A, Catamo E, Segat L, Morgutti M, Arraes LC, de Lima-Filho JL, et al. Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 2009 Jan 14;23(2):177-82.
- (123) Lajoie J, Massinga LM, Poudrier J, Guedou F, Pepin J, Labbe AC, et al. Blood soluble human leukocyte antigen G levels are associated with human immunodeficiency virus type 1 infection in Beninese commercial sex workers. *Hum Immunol* 2010 Feb;71(2):182-5.
- (124) Martinetti M, Pacati I, Cuccia M, Badulli C, Pasi A, Salvaneschi L, et al. Hierarchy of baby-linked immunogenetic risk factors in the vertical transmission of hepatitis C virus. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006 Apr;19(2):369-78.
- (125) Cordero EA, Veit TD, da Silva MA, Jacques SM, Silla LM, Chies JA. HLA-G polymorphism influences the susceptibility to HCV infection in sickle cell disease patients. *Tissue Antigens* 2009 Oct;74(4):308-13.
- (126) Martelli-Palomino G, Pancotto JA, Muniz YC, Mendes-Junior CT, Castelli EC, Massaro JD, et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One* 2013;8(10):e71742.
- (127) Urban TJ, Thompson AJ, Bradrick SS, Fellay J, Schuppan D, Cronin KD, et al. IL28B genotype is associated with differential expression of intrahepatic interferon-stimulated genes in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2010 Dec;52(6):1888-96.

-
- (128) Bermingham J, Jenkins D, McCarthy T, O'Brien M. Genetic analysis of insulin-like growth factor II and HLA-G in pre-eclampsia. *Biochem Soc Trans* 2000 Feb;28(2):215-9.
- (129) Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NH, de Albuquerque RS, Muniz YC, Simoes RT, et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 2010 Mar;11(2):134-41.
- (130) Sciot R, van EP, Facchetti F, Callea F, van der Steen K, van DH, et al. Hepatocellular transferrin receptor expression in secondary siderosis. *Liver* 1989 Feb;9(1):52-61.
- (131) Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999 Sep;94(9):2467-74.
- (132) Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981 Sep;1(5):431-5.
- (133) Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994 Jun;19(6):1513-20.
- (134) Crispim JC, Duarte RA, Soares CP, Costa R, Silva JS, Mendes-Junior CT, et al. Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection. *Transpl Immunol* 2008 Feb;18(4):361-7.
- (135) WHO. BMI classification. http://apps.who.int/bmi/index/jsp?introPage=intro_3.html 2014 [cited 2014 Mar 3]; Available from: URL: http://apps.who.int/bmi/index/jsp?introPage=intro_3.html
- (136) de Oliveira Crispim JC, Silva TG, Souto FJ, Souza FF, Bassi CL, Soares CP, et al. Upregulation of soluble and membrane-bound human leukocyte antigen G expression is primarily observed in the milder histopathological stages of chronic hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2012 Mar;73(3):258-62.
- (137) Mendes-Correa MC, Barone AA, Guastini C. Hepatitis C virus seroprevalence and risk factors among patients with HIV infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2001 Jan;43(1):15-9.

-
- (138) Chung RT, Andersen J, Volberding P, Robbins GK, Liu T, Sherman KE, et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin versus interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C in HIV-coinfected persons. *N Engl J Med* 2004 Jul 29;351(5):451-9.
- (139) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. População residente por cor ou raça e religião. 2010.
- (140) Focaccia R, Baraldo DC, Ferraz ML, Martinelli AL, Carrilho FJ, Goncales FL, Jr., et al. Demographic and anthropometrical analysis and genotype distribution of chronic hepatitis C patients treated in public and private reference centers in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004 Oct;8(5):348-55.
- (141) Bongiovanni M, Ranieri R, Casana M, Tordato F, Cicconi P, Tincati C, et al. Insulin resistance affects early virologic response in HIV-infected subjects treated for hepatitis C infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008 Feb 1;47(2):258-9.
- (142) Martinez-Sierra C, Arizcorreta A, Diaz F, Roldan R, Martin-Herrera L, Perez-Guzman E, et al. Progression of chronic hepatitis C to liver fibrosis and cirrhosis in patients coinfectd with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2003 Feb 15;36(4):491-8.
- (143) Torriani FJ, Rodriguez-Torres M, Rockstroh JK, Lissen E, Gonzalez-Garcia J, Lazzarin A, et al. Peginterferon Alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2004 Jul 29;351(5):438-50.
- (144) Carrat F, Bani-Sadr F, Pol S, Rosenthal E, Lunel-Fabiani F, Benzekri A, et al. Pegylated interferon alfa-2b vs standard interferon alfa-2b, plus ribavirin, for chronic hepatitis C in HIV-infected patients: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004 Dec 15;292(23):2839-48.
- (145) Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009 Sep 17;461(7262):399-401.
- (146) Grandi T, da Silva CM, Amaral KM, Picon PD, Costi C, da Fre NN, et al. Response to treatment in Brazilian patients with chronic hepatitis C is associated with a single-nucleotide polymorphism near the interleukin-28B gene. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013 Feb;108(1):48-53.

-
- (147) Ramos JA, Ramos AL, Hoffmann L, Perez RM, Coelho HS, Urmenyi TP, et al. A single nucleotide polymorphism, rs129679860, in the IL28B locus is associated with the viral kinetics and a sustained virological response in a chronic, monoinfected hepatitis C virus genotype-1 Brazilian population treated with pegylated interferon-ribavirin. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012 Nov;107(7):888-92.
- (148) Pena SD, Di PG, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FS, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6(2):e17063.
- (149) D'Incao RB, Silva MC, Almeida PR, Renon VP, Tovo CV. Percutaneous liver biopsy--2 decades of experience in a public hospital in the South of Brazil. *Ann Hepatol* 2013 Nov;12(6):876-80.
- (150) Machado MV, Oliveira AG, Cortez-Pinto H. Hepatic steatosis in patients coinfectd with human immunodeficiency virus/hepatitis C virus: a meta-analysis of the risk factors. *Hepatology* 2010 Jul;52(1):71-8.
- (151) Castera L, Loko MA, Le BB, Coffie P, de L, V, Trimoulet P, et al. Hepatic steatosis in HIV-HCV coinfectd patients in France: comparison with HCV monoinfected patients matched for body mass index and HCV genotype. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 Dec;26(11-12):1489-98.
- (152) Rodriguez-Torres M, Govindarajan S, Sola R, Clumeck N, Lissen E, Pessoa M, et al. Hepatic steatosis in HIV/HCV co-infected patients: correlates, efficacy and outcomes of anti-HCV therapy: a paired liver biopsy study. *J Hepatol* 2008 May;48(5):756-64.
- (153) Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1994 Jul;20(1 Pt 1):15-20.
- (154) Okafor O, Ojo S. A comparative analysis of six current histological classification schemes and scoring systems used in chronic hepatitis reporting. *Rev Esp Patol* 2004;37(3):269-77.
- (155) Mira JA, Garcia-Rey S, Rivero A, de IS-G, I, Lopez-Cortes LF, Giron-Gonzalez JA, et al. Response to pegylated interferon plus ribavirin among HIV/hepatitis C virus-coinfectd patients with compensated liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* 2012 Dec;55(12):1719-26.

- (156) Bedossa P, Poynard T, Mathurin P, Lemaigre G, Chaput JC. Transforming growth factor beta 1: in situ expression in the liver of patients with chronic hepatitis C treated with alpha interferon. *Gut* 1993;34(2 Suppl):S146-S147.
- (157) Verrecchia F, Mauviel A. TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal* 2004 Aug;16(8):873-80.
- (158) Lozano JM, Gonzalez R, Kindelan JM, Rouas-Freiss N, Caballos R, Dausset J, et al. Monocytes and T lymphocytes in HIV-1-positive patients express HLA-G molecule. *AIDS* 2002 Feb 15;16(3):347-51.
- (159) Navikas V, Link J, Persson C, Olsson T, Hojeberg B, Ljungdahl A, et al. Increased mRNA expression of IL-6, IL-10, TNF-alpha, and perforin in blood mononuclear cells in human HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995 Aug 15;9(5):484-9.
- (160) Apps R, Gardner L, Moffett A. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 2008 Jul;29(7):313-21.

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A – Análise multivariada por regressão logística das variáveis envolvidas na RVS ao tratamento do HCV em pacientes coinfectados com HIV na população de estudo:

RVS no 6o mês DOS QUE TRATARAM ATÉ 24 PELO MENOS (SIM = 0) n=42								
Efeito	Odds Ratio Bruto	IC 95%		Valor p	Odds Ratio Ajustado	IC 95%		Valor p
Idade (< 40=2; ≥40=1) (1 vs 2)	1.04	0.25	4.35	0.96	0.31	0.02	5.14	0.42
Gama GT no início do tto (normal (até 60) = 0 elevada = 1) (0 vs 1)	2.93	0.71	12.11	0.14	1.56	0.14	17.30	0.72
FIBROSE (1 E 2 = 0; 3 E 4 = 1) (0 vs 1)	5.50	0.62	48.82	0.13	21.30	0.47	968.70	0.12
Genótipo (1 = 1; NÃO 1 = 0) (0 vs 1)	3.22	0.40	26.26	0.27	32.06	1.07	964.35	0.05
CARGA VIRAL HCV (pré) TTO (< 600.000=0; ≥ 600.000=1) (0 vs 1)	18.00	3.31	97.76	<0,01	47.12	3.96	561.42	<0,01
Hiv controlado início do trat// (cd>350 e cv < 50) 1 sim; 2 não (1 vs 2)	2.84	0.52	15.47	0.23	7.99	0.36	178.11	0.19
RVS no 6o mês DOS QUE TRATARAM ATÉ 24 PELO MENOS (SIM = 0) n=42								
Efeito	Odds Ratio Bruto	IC 95%		Valor p	Odds Ratio Ajustado	IC 95%		Valor p
Idade (< 40=2; ≥40=1) (1 vs 2)	1.04	0.25	4.35	0.96	0.30	0.02	5.52	0.42
Gama GT no início do tto (normal (até 60) = 0 elevada = 1) (0 vs 1)	2.93	0.71	12.11	0.14	1.55	0.14	17.14	0.72
FIBROSE (1 E 2 = 0; 3 E 4 = 1) (0 vs 1)	5.50	0.62	48.82	0.13	23.32	0.33	1675.05	0.15
Genótipo (1 = 1; NÃO 1 = 0) (0 vs 1)	3.22	0.40	26.26	0.27	33.02	1.05	1040.96	0.05
CARGA VIRAL HCV (pré) TTO (< 600.000=0; ≥ 600.000=1) (0 vs 1)	18.00	3.31	97.76	<0,01	48.38	3.81	614.46	<0,01
Hiv controlado início do trat// (cd>350 e cv < 50) 1 sim; 2 não (1 vs 2)	2.84	0.52	15.47	0.23	7.95	0.36	176.37	0.19
HLA-G (AUSENTE = 0 PRESENTE = 1) (0 vs 1)	2.93	0.71	12.11	0.14	0.89	0.09	9.10	0.92
RVS no 6o mês DOS QUE TRATARAM ATÉ 24 PELO MENOS (SIM = 0) n=39								
Efeito	Odds Ratio Bruto	IC 95%		Valor p				
IL - 28 (SE 2 FOR POUCO, AGRUPO 0 = C/C E 1 = T/C+T/T) (0 vs 1)	4.71	1.03	21.65	0.05				

APÊNDICE B – *Allelic Discrimination Plot* da determinação dos genótipos da IL28B na população de estudo

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do comitê de ética do HC-FMRP-USP

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

www.hcrp.usp.br

Ribeirão Preto, 09 de junho de 2010

Ofício nº 1773/2010
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“EXPRESSÃO DO HLA-G EM PACIENTES COINFECTADOS HCV/HIV E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO DA HEPATITE C”** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 309ª Reunião Ordinária realizada em 07/06/2010 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 4916/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
FERNANDO CRIVELANTI VILAR
PROF. DR. BENEDITO ANTÔNIO LOPES DA FONSECA (Orientador)
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO B – Técnica Extração de DNA - “Salting-out”

- 1- Coletar 10 ml de sangue colhido em tubos com EDTA como anticoagulante e transferi-los para tubo de 50 mL no qual é adicionado tampão de lise I gelado (reagente 1), até o volume final de 50 mL. Misturado por inversão de maneira delicada, este tubo é centrifugado por 5 minutos a 2400g ou 3200 rpm a 4 graus. Neste passo serão lisados os glóbulos vermelhos;
- 2- O conteúdo do tubo de 50 mL tem o sobrenadante desprezado cuidadosamente (hemácias lisadas) e a extração prossegue com o botão de células que ficam retidas no fundo ou na parede do tubo;
- 3- Ressuspender este botão em: 4,5 ml de tampão de lise II (reagente 2), 125uL SDS 10%, 1,1 mL de Perclorato de sódio 5 M;
- 4- Agitar vigorosamente em agitador de tubos por 10 segundos à temperatura ambiente. Neste passo serão lisados os glóbulos brancos;
- 5- Adicionar 2ml de NaCl 6m saturado e agitar vigorosamente por 15 segundos em agitador de tubos a temperatura ambiente. Neste passo serão lisadas as proteínas;
- 6- Centrifugar por 5 minutos a 1500g ou 2600 rpm à temperatura ambiente;
- 7- Cuidadosamente desprezar o sobrenadante num tubo de 50 mL limpo, pois nele estará o DNA. O botão que resta no tubo “sujo” são as proteínas e paredes celulares os quais são desprezados;
- 8- Adicionar 7 mL de isopropanol absoluto à temperatura ambiente no sobrenadante do tubo limpo. Homogeneizar por inversão gentilmente até que o DNA se precipite (em torno de 1 minuto), formando-se uma “teia de aranha” que se condensa com o passar do tempo;
- 9- Retirar o DNA precipitado com auxílio de pipeta Pasteur selada e colocá-lo em um tubo eppendorf de 1,5ml;
- 10- Adicionar no eppendorf com o DNA, 1ml de Etanol 75% gelado e centrifugar por 5 minutos a 5000 rpm a 4 graus. Neste passo estamos lavando DNA;
- 11- Após centrifugar, repetir a lavagem com etanol 75% gelado;
- 12- Retirar todo o excesso de etanol e deixar o DNA secar à temperatura ambiente por 15 minutos até que o etanol tenha sido totalmente evaporado;
- 13- Dissolver o DNA em 200 uL água estéril e congelar a -20°C.

Reagentes:

1) Tampão de lise I (reagente 1): Preparar inicialmente um Tris-HCl pH 7,5. Pesar 1,57g do Tris-HCl e dissolver em 800 mL de água estéril, acertando o pH para 7,5 e completar o volume para 1 litro. Reserve.

Pesar 102,69g de Sacarose e 0,048g de MgCl e dissolver estes reagentes com o Tris-HCl. Adicionar 10 mL de Triton X-100 e acertar o volume para 1 litro. Guardar na geladeira em frasco âmbar ou protegido com papel alumínio.

2) Tampão de lise II (reagente 2): Pesar 4,35g de NaCl e 8,92g de EDTA, dissolver em 800mL de água estéril e acertar pH para 8,0. Completar o volume para 1 litro. Guardar à temperatura ambiente.

3) SDS 10%. Estocar à temperatura ambiente.

4) Perclorato de Sódio 5,0 M: Pesar 70,2g de perclorato e dissolver em 100 mL de água. Estocar à temperatura ambiente.

5) NaCl 6,0M (saturado): Pesar 34,8g de NaCl e dissolver em 100mL de água estéril. O sal não dissolve totalmente pois a solução é saturada. Estocar à temperatura ambiente.

6) TE: 10mM Tris-HCl pH7,5, 1mM EDTA pH 8,0. Armazenar em geladeira.