GABRIELLA TEIXEIRA GARCIA

Vírus da Hepatite C e Células Mononucleares do Sangue Periférico

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alci Barone

SÃO PAULO

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Garcia, Gabriella Teixeira
Vírus da hepatite C e células mononucleares do sangue periférico / Gabriella Teixeira Garcia. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Antonio Alci Barone.

Descritores: 1.Hepacivirus 2.Linfócitos T 3.ELISPOT 4.Interleucina-4 5.Interferon gama 6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-311/16

DEDICATÓRIA

À Deus
que renovou minhas forças durante o meu árduo caminho e permitiu a concretização de um sonho. Sempre permitiu a realização de infinitamente mais do que tudo o que eu mereço. O que sou devo a Ti!

Aos meus pais Roberto e Beninha, que merecem toda honra por ensinar o caminho certo, investir no meu futuro e dedicar amor, muito amor.

Aos meus irmãos Junior e Rafael que comigo trilham um caminho inseparável de aprendizado, amor, felicidade e crescimento

As minhas cunhadas Cleuza e Flávia companheiras e dedicadas em minha jornada

As minhas pequenas sobrinhas Ana Luiza e Isabella, responsáveis por muitas alegrias e muito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Alci Barone, pela oportunidade de crescimento profissional e acadêmico, pelos valiosos ensinamentos, esforço incondicional para a concretização deste trabalho e pela confiança depositada. Exemplo de dedicação, profissionalismo e competência.

À Dra. Fátima Tengan, por me incentivar e disponibilizar o laboratório do LIM-47 para o desenvolvimento deste trabalho,

Ao Dr. Evaldo Stanislau, pela contribuição durante as correções da tese e palavras de incentivo proferidas.

Ao colega Carlos Mello, pela imprescindível motivação e orientação, que foram essenciais para o meu desenvolvimento e amadurecimento científico.

À Luciane Martins, pela ajuda nos vários momentos desses anos de doutoramento, e exemplo de dedicação pessoal e profissional.

À Mara Ribeiro, pela preocupação e inestimável auxílio na organização do laboratório.

Ao Prof. Dr. Esper Kallas e a equipe do LIM-60, por disponibilizar o equipamento para citometria de fluxo e auxiliar na aplicação do método neste trabalho

Ao Prof. Dr. Dilton , pela colaboração e por disponibilizar a estufa de CO_2.

Ao Dr. Edson Abdala, pela colaboração e contribuição dos conhecimentos científicos prestados

À Roseli, Secretária da Pós-graduação do Departamento de Molestias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP, pelo suporte nos trâmites burocráticos da pós-graduação.

As amigas Mariana Magri, Bianca Dantas, Caroline Manchiero do Laboratório de Hepatites Virais LIM-47 pela contribuição e amizade e todo apoio que tive cada uma à sua maneira.

As secretárias Sueli e Andréia, por auxiliar no desenvolvimento burocráticos.

A Gladis secretária da disciplina de graduação de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do curso de medicina, por auxiliar no estágio de docência do departamento.

A equipe de enfermagem, Marisa e Dona Dálva do ambulatório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Moléstias Infecciosas Parasitárias da Faculdade de medicina da USP e todo seu quadro de funcionários e professores, pela dedicação, apoio e incentivo durante a realização em todas as etapas deste trabalho.

Ao Phelipe, por acompanhar a minha jornada na qual recebi apoio e incentivo incondicional, durante a realização desta tese.

As minhas primas Natália e Vanessa por me incentivar a conquistar meus sonhos e por proporcionar muitas alegrias em momentos de tensão.

Durante a jornada para a realização de um sonho, nos deparamos com momentos de dificuldades e lutas. A realização desta conquista não seria possível sem o apoio

Este projeto recebeu apoio financeiro da agência de fomento FAPESP com o número de processo 2013/02749-9)

CAPES disponibilizou bolsa para Doutorado

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria." 1 Co 13:2

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por: Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação: 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS IX

LISTA DE GRÁFICOS X

LISTA DE TABELA XII

RESUMO XVII

ABSTRACT XIX

1.INTRODUÇÃO..... 1

1.1 Hepatite C 1

1.2 Epidemiologia 2

1.3 Tratamento 5

1.4 Vírus da Hepatite C 6

1.4.1 Genótipo Viral 7

1.4.2 Estrutura Viral 7

1.4.3 Região Estrutural do VHC 8

1.4.4 Proteínas não estruturais do VHC 9

1.5 Tropismo viral 12

1.6 Patogênese do VHC 13

1.7 Resposta imune do VHC 14

1.8 ELISpot 20

2. OBJETIVO 23

2.1 Geral 23

2.2 Específicos 23

3. MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 Casuística 24

3.2 Seleção dos pacientes 24

3.3 Coleta e análise do material biológico 26

3.4 Purificação do DNA para análise do polimorfismo 26

3.5 Análise do polimorfismo do gene IL28B por PCR em tempo real 27

3.6 Separação das PBMCs 28

3.7 Contagem absoluta dos linfócitos T 28

3.8 Genótipo do VHC e biópsia hepática 29

3.9 Ideentificação do RNA do VHC em PBMC 29

3.10 Quatificação do RNA do VHC 30

3.11 Análise da presença/ausência do RNA-VHC em PBMC por PCR em Tempo Real 30

3.12 Antígenos do VHC para estimulação das PBMCs 31

3.13 Estudo da função dos linfócitos T por ELISpot 32

3.14 Metodologia aplicada a análise estatística 34

3.14.1 Regressão Linear 34

3.14.2 Análise de variância 34

3.14.3 Teste de hipótese para 2 amostras 34

3.14.4 Teste de Kruskal-Wallis 34

4. EXPECTATIVA DOS RESULTADOS..... 36

5. RESULTADOS 37

5.1 Resultados da análise estatística 41

6. DISCUSSÃO 55

7. CONCLUSÃO 59

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS 61

9. ANEXOS 75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência e incidência da infecção do VHC no mundo e no Brasil	4
Figura 2	Representação esquemática do vírus da hepatite C (modificada).....	8
Figura 3	Proteínas virais do Vírus da Hepatite C	12
Figura 4	Princípio do ensaio de FluoroSpot	22
Figura 5	Representação esquemático do fluxo de trabalho utilizado para realização deste trabalho	25
Figura 6	Representação por dot blot da contagem absoluta de linfócitos T CD4 e T CD8 de pacientes com Hepatite C crônica analisada por Citometria de Fluxo	39
Figura 7	Imagens geradas pelo aparelho ImmunoSpot® em ensaio baseado em fluorescência, após a leitura da placa de Elispot, em pacientes com Hepatite C crônica.	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Valores das médias de células TCD4+, nos pacientes do Grupo 2 antes, durante e após o tratamento .	41
Gráfico 2	Valores das médias de células TCD8+, nos pacientes do Grupo 2 antes, durante e após o tratamento .	42
Gráfico 3	Valores médios de células produtoras de IL-4 pelas células CD4+ e CD8+ em três momentos: antes (pré), durante (s12) e depois (FUP) do tratamento.	43
Gráfico 4	Valores médios de células produtoras de IFN-gama pelas células TCD4+ e TCD8+ em três momentos: antes, durante e depois do tratamento.	44
Gráfico 5	Valores médios de células produtoras de IFN-gama pelas células TCD4+ em três momentos: antes, durante e depois do tratamento.	44
Gráfico 6	Grau de fibrose hepática comparado com a produção de IL4 por PBMCs do grupo 1 (52 pacientes näive).	45
Gráfico 7	Produção de IL4 por PBMCs comparado com o gênero do grupo 1 (52 pacientes näive).	46
Gráfico 8	Produção de IL-4 por células TCD4 comparada com o genótipo viral em pacientes näive.	47

Gráfico 9	Pacientes com hepatite C crônica tratados com amostras em 3 momentos: pré tratamento, durante e depois do tratamento. Correlação entre o número de células CD8 na semana 12 e a resposta ao tratamento.	48
Gráfico 10	Nível de Células T CD4+ em grupo controle normais e pacientes com Hepatite C crônica näive.	49
Gráfico 11	Nível de Células T CD8+ em grupo controle normais e pacientes com Hepatite C crônica näive.	49
Gráfico 12	Produção de IFN-γ de PBMCs em controles saudáveis e pacientes VHC+ näive.	50
Gráfico 13	Níveis de células T CD8+ de pacientes com Hepatite C crônica na semana 12 de tratamento com IFN e RBV e pacientes controles.	50
Gráfico 14	Produção de IFN-γ por PBMCs na semana 12 de tratamento em pacientes com Hepatite C e controles.	51
Gráfico 15	Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica com controles normais, condição follow up.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação da síntese do pool de peptídeos, baseados na sequência do genótipo 1a do VHC , localizados na região estrutural (Core e E2) e na região não estrutural do vírus (NS3, NS4 e NS5)	32
Tabela 2	Distribuição dos 52 pacientes com hepatite C crônica segundo dados demográficos, clínicos, laboratoriais e hábitos	37
Tabela 3	Valores médios de CD4, CD8, IL-4 e IFN-γ em 17 pacientes tratados com IFNα+RBV em três momentos: antes, durante e após o tratamento.	38
Tabela 4	Carga viral antes, durante e após tratamento e resutado final do tratamento em 17 pacientes que receberam PegIFNalfa+RBV	38
Tabela 5	Resultados para Grupo 1 Pacientes com Hepatite C crônica não tratados	52
Tabela 6	Pacientes com hepatite C crônica tratados com amostras em 3 momentos: pré tratamento, durante e depois do tratamento.	53
Tabela 7	Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica que receberam tratamento com IFNalfa+RBV, em três momentos, com controles normais.	54
Tabela 8	Distribuição dos 10 casos do grupo controle, segundo dados demográficos.	75

Tabela 9 Dados específicos de todos os pacientes com hepatite C crônica coletados antes, durante e após tratamento com IFN e RBV. 76

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ALT – Alanina Aminotransferase

APCs – Células apresentadoras de antígenos, do inglês *Antigen Presenting Cells*

AST – Aspartato aminotransferase

bDNA – Técnica de diagnóstico molecular *branched* DNA

CTL – Linfócitos T citotóxicos, do inglês *Cytotoxic T Lymphocyte*

DAA – Agentes anti-virais directos, do inglês *Direct Antiviral Agents*

DC – Células dendríticas, do inglês *Dendritic Cells*

DC-SIGN – Lectina DC-SIGN, do inglês *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-*

cDNA – DNA complementar

dNTP – desoxirribonucleosídeo trifosfatado

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCTP – desoxicitidina trifosfato

dGTP – desoxiguanosina trifosfato

dTTP – desoxitimidina trifosfato

ddATP – didesoxiadenosina trifosfato

ddCTP – didesoxicitidina trifosfato

ddGTP – didesoxiguanosina trifosfato

ddTTP – didesoxitimidina trifosfato

ddNTP – Didesoxirribonucleosídeo trifosfatado

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Desoxirribonucleic Acid*

dsRNA – RNA de cadeia dupla, do inglês *double stranded*

E1SS – Sequência sinal E1, do inglês *Signal Sequence*

EIAs – Ensaios imunoenzimáticos, do inglês *Enzymatic Immunoassay*

ELISpot - enzyme-linked immunospot

HVR – Região hipervariável, do inglês *Hypervariable Region*

IFN – Interferon

IFN-α – Interferon alfa

IFN-β – Interferon beta

IPS-1 – proteína IFN- β, do inglês *Promoter Stimulator Protein 1*

IRES – Local de ligação ao ribossoma, do inglês *Internal Ribosomal Entry Site*

IRF – Fator regulador de interferon, do inglês *Interferon Regulatory Factor*

IU – Unidades internacionais, do inglês *International Units*

Kb – kilobases

kDa – kiloDalton

LDL – Lipoproteína de baixa densidade, do inglês *Low-Density Lipoproteins*

LDL-R – Receptor de LDL, do inglês *LDL-Receptor*

L-SIGN – Lectina L-SIGN, do inglês *Liver/lymph node-specific intercellular adhesion -*

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno, do inglês *Mitogen-activated protein kinase*

MHC – Complexo *major* de histocompatibilidade

mL – mililitros

mRNA – RNA mensageiro

NANBH – Hepatite não A, não B, do inglês *non-A, non-B hepatitis*

NF-κB – Fator nuclear kappa B, do inglês *Nuclear Factor kappa B*

NK – *Natural killer*

NS – Não estrutural, do inglês Non Structural

nt – nucleótido

NTP – Nucleosídeo Trifosfatado

OAS – Oligoadenilato sintetase

ORF – Pauta de leitura, do inglês Opening Reading Frame

PAMP – Perfil molecular associado a agentes patogénicos, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Pattern*

pb – pares de bases

PBMCs – Células mononucleares do sangue periférico, do inglês *Peripheral Mononuclear Blood Cells*

PCR – Reação de polimerização em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

Peg-IFN-α – Interferon alfa peguilado

PI – Inibidor de protease, do inglês *Protease Inhibitor*

PIAS – Proteína inibidora de STAT1 ativada, *Protein Inhibitor of Activated STAT1*

PP2A – Proteína fosfatase 2A, do inglês *Protein Phosphatase 2A*

PKR – Receptor de proteína cinase, do inglês *Protein Kinase Receptor*

RBV – Ribavirina

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonuleic Acid*

ROS – Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive oxygen species*

rRNA – RNA ribossomal

RT – Transcriptase reversa, do inglês *Reverse Transcriptase*

RVR – Resposta virológica rápida, do inglês *Rapid Virological Response*

SAP – Fosfatase alcalina *Shrimp*, do inglês *Shrimp Alcaline Phosphatase*

SNP – Polimorfismo ao nível de um único nucleotídeo, do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism*

SOCS – Supressor de sinalização por citocinas, do inglês *Suppressor Of Cytokine Signaling*

STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription

SVR – Resposta virológica sustentada, do inglês *Sustained Virological Response*

Th – T *helper*

TLR – receptor TLR, do inglês *Toll-Llike Receptor*

TMA – Amplificação mediada por transcrição, do inglês Transcription Mediated Amplification

TMD – Domínio transmembranar, do inglês *Transmembranar Domain*

TJ – *Tight Junctions*

TNF – Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor Necrosis Factor*

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

WHO – World Health Organization

RESUMO

A hepatite C é uma doença que leva à inflamação do fígado, sendo causada pelo vírus da hepatite C (VHC). Estima-se que existam 130 a 170 milhões de casos de infecção crônica pelo VHC por todo o mundo. Apesar do VHC ser principalmente hepatotrópico, foi evidenciada a detecção de RNA viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado um importante tropismo do VHC por células do sistema imune, em especial por PBMCs. Apesar deste interessante achado, a importância da infecção do sistema imune na história natural da doença não é totalmente conhecida. É possível observar em alguns estudos que, em pacientes que desenvolvem infecção aguda, observa-se uma vigorosa resposta mediada por células T, específica ao VHC, mediada, por células T CD4+ e T CD8. Esta resposta é detectada na fase inicial da doença, e prolonga-se durante vários anos após a resolução do vírus. Pelo contrário, os pacientes que desenvolvem infecção crônica, apresentam, normalmente, respostas T fracas e / ou de curta duração, bem como defeitos nas funções efetoras de células T específicas. As respostas mediadas por células T com este perfil resultam, normalmente, em um baixo controlo da viremia e na sua persistência. Outra importante questão que permanece incerta até o presente momento é como a infecção das células imunes pelo VHC altera a sua função, principalmente no que concerne às PBMCs. Informações referentes às PBMCs e o VHC são pouco estudadas e referidas na literatura internacional, embora sejam de fundamental importância para a compreensão do seu peso na história natural da infecção. OBJETIVO: Baseado nessas incertezas o presente estudo tentará contribuir para a elucidação da influência do parasitismo por VHC na função de células TCD4+ e TCD8+ em pacientes naïve com indicação de tratamento com IFNpeg+RBV e comparar os dados obtidos antes, durante e pós-tratamento com os valores encontrados dos controles negativos, avaliando a influência do tratamento sobre a função dessas células. Verificar a presença do RNA-VHC nas PBMCs por RT-PCR em Tempo Real. Verificar a influência de fatores do vírus e do hospedeiro, tais como genótipo, carga viral, idade, gênero, raça, polimorfismo IL28B e biópsia hepática sobre as células parasitadas pelo VHC e sua produção de citocinas; Determinar a contagem e a função de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico desses pacientes; Determinar a influência do parasitismo de linfócitos pelo VHC sobre a função dos linfócitos TCD4+ e TCD8+. METODOLOGIA: Foram estudados 52 pacientes com hepatite C crônica; destes, 17 pacientes foram tratados com IFNalfa+RBV; 10 controles sadios, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HC FMUSP. A contagem de células da subpopulação de linfócitos T CD4+ e CD8+ periféricas foram realizadas por citometria de fluxo *FACSCanto II* (BD) por meio do *software MultiSet*(BD). Foi analisada a presença/ausência do RNA-VHC em PBMC por PCR em tempo real no sistema *TaqMan*, no termociclador Applied Biosystems StepOne™. A função dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ foram avaliadas através da técnica ELISPOT utilizanso o Kit Human IFN-gamma/IL-4 Dual-Color FluoroSpot. A contagem dos spots foi realizada em um leitor automatizado CTL-ImmunoSpot® S6 FluoroSpot Line. As PBMCs foram fracionadas e depletadas, utilizando-se o Kit Dynabeads FlowComp Human CD4 (Invitrogen Life Technologies) segundo as instruções do fabricante. RESULTADOS: Foram estudados 52 pacientes com hepatite C crônica; destes, 17 pacientes foram tratados com IFNalfa+RBV; 10 controles sadios. O genótipo 1 foi o mais prevalente 61,5%. O RNA do VHC foi detectado nas PBMCS em 88,4% dos pacientes.

Nossos resultados mostraram um aumento de células CD4 e CD8 parasitadas pelo VHC antes do tratamento, com valores estatisticamente significantes quando comparadas aos controles normais apenas no caso das CD4. Ocorreu, porém, um nítido prejuízo na produção de interleucinas por estas células parasitadas, particularmente a produção de IFN- γ, com valores altamente significantes (0,009). Na semana 12, podemos ver o aumento de células CD4 no pré-tratamento, porém com diminuição na semana 12 e no follow up; entretanto a produção de IL-4 pelas células CD4 aumenta na semana 12 e cai novamente no seguimento; com as células CD8 ocorre leve queda na semana 12 porém uma tentativa de recuperação no follow up; sua produção de IFN-γ cai na semana 12 e no follow up para números estatisticamente significantes. É a chamada "exaustão" de função destas células já descrita *in vitro* por alguns autores. Estes dados poderão ser muito úteis nas futuras observações desses pacientes que serão tratados com esquemas de DAAs sem interferon alfa. CONCLUSÃO: Em conclusão, os resultados desta pesquisa confirmam a importante influência do parasitismo das células CD4 e CD8 em suas funções.

Descritores: hepacivirus; linfócitos T; ELISPOT; Interleucina-4; Interferon gama; citometria de fluxo.

ABSTRACT

Hepatitis C is a disease that causes inflammation of the liver, caused by hepatitis C virus (HCV). It is estimated that there are 130 million to 170 million cases of chronic HCV infection worldwide. Although HCV is primarily hepatotropic was evidenced by detection of viral RNA in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Clinical and experimental evidence have demonstrated an important tropism of HCV by immune system cells, in particular by PBMC. Despite this interesting finding, the importance of infection of the immune system in the natural history of the disease is not fully known. It can be observed in some studies in patients who develop acute infection a vigorous response is observed mediated by T cells specific to HCV mediated by CD4 + and CD8. This response is detected at the initial stage of the disease, and extends for years after the resolution of the virus. Conversely, patients who develop chronic infection, are typically in the low T responses and / or short-term as well as defects in the effector functions of specific T cells. The responses mediated by T cells with the profile usually result in a low control of viremia and its persistence. Another important issue that remains unclear to date is how the infection of immune cells by HCV alters its function, especially with regard to the PBMCs. Information relating to the PBMCs and HCV are little studied and reported in the international literature, although they are of fundamental importance for the understanding of its weight in the natural history of infection. OBJECTIVE: Based on these uncertainties the present study attempts to contribute to the elucidation of the influence of parasitism by HCV on CD4 T cell function + and CD8 + in naïve patients with treatment indication with IFNpeg + RBV and compare the data obtained before, during and after treatment with the values found negative controls, assessing the influence of treatment on the function of these cells. Verify the presence of HCV-RNA in PBMC by RT-PCR in real time. Check the influence of virus and host factors such as genotype, viral load, age, gender, race, IL28B polymorphism and liver biopsy on the parasitized cells with HCV and their cytokine production; Determine count and function of lymphocytes T CD4 + and CD8 + peripheral blood of patients; To determine the influence of parasitism lymphocytes HCV on the function of CD4 + and CD8 + T lymphocytes. METHODS: We studied 52 patients with chronic hepatitis C; of these, 17 patients were treated with IFNalpha + RBV; 10 healthy controls, treated at the Hepatitis Clinic of the Division of Clinical Infectious and Parasitic Diseases of the FMUSP. The lymphocyte subpopulation of T-cell count CD4 + and CD8 + peripheral been made by FACSCanto II flow cytometer (BD) through the multiset software (BD). the presence / absence of HCV-RNA in PBMC by real-time PCR was analyzed in the TaqMan system, Applied Biosystems thermal cycler StepOne ™. The role of CD4 + T lymphocytes and CD8 + were assessed by ELISPOT technique utilizanso the Human Kit IFN-gamma / IL-4 Dual-Color FluoroSpot. The counting of the spots was carried out in an automated reader CTL-ImmunoSpot® S6 FluoroSpot Line. And fractionated PBMCs were depleted using Dynabeads kit is the Human CD4 FlowComp (Invitrogen Life Technologies) according to manufacturer's instructions. RESULTS: We studied 52 patients with chronic hepatitis C; of these, 17 patients were treated with IFNalpha + RBV; 10 healthy controls. Genotype 1 was the most prevalent 61.5%. The HCV RNA was detected in PBMC in 88.4% of patients. Our results showed an increase of CD4 and CD8 cells parasitized with HCV prior to treatment, with statistically significant amounts compared to controls only if CD4. There was however, a marked impairment in production of interleukins for these parasitized cells, particularly the

production of IFN- γ, with highly significant values (0.009). At week 12, we can see the increase in CD4 cells before treatment, but with decreased at

week 12 and at follow up; However IL-4 production by CD4 cells increased at week 12 and again falls in the following; with the CD8 cells is slightly lower at week 12 but a recovery attempt at follow up; their IFN-γ production drops at week 12 and follow up to statistically significant numbers. It is called "exhaust" function of these cells in vitro been described by some authors. This data is very useful in future observations of these patients are treated with AADs regimens without interferon alfa. CONCLUSION: In conclusion, the results confirm the important influence of the parasitism of CD4 and CD8 cells in their functions.

Descriptors : hepacivirus; T-lymphocytes; ELISPOT; interleukin-4; interferon-gamma;

flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

1. 1. HEPATITE C

A Hepatite C Crônica é a principal doença causada pelo Vírus da Hepatite C, tendo experimentado uma evolução dos conhecimentos científicos, desde a descoberta até a cura, muito rápida dentro da história da medicina. Na realidade, desde a identificação do VHC em 1989 por Choo e colaboradores, até a disponibilidade de tratamentos representados pela combinação de drogas antivirais altamente ativas, decorreram apenas 25 anos. Fala-se hoje até na possibilidade de erradicação terapêutica da doença. Entretanto, este inesperado desfecho não deve ser visto como um “milagre”, mas como resultado de uma conjugação de esforços e circunstâncias favoráveis. Estes incluem (1) o notável trabalho de pesquisadores pioneiros em medicina transfusional e hepatites virais que identificaram a “Hepatite nãoA-nãoB” como uma doença infecciosa transmitida pelo sangue, provavelmente causada por um vírus e caracterizaram a sua epidemiologia; (2) a descoberta do VHC, uma das mais importantes do século 20, usando uma metodologia original baseada em métodos de biologia molecular, usada depois para a descoberta de muitos outros vírus; (3) o trabalho de inúmeros laboratórios de pesquisa em universidades que desenvolveram modelos *in vitro* necessários para desvendar o ciclo vital do VHC e permitiram testar enorme número de compostos como inibidores antivirais específicos; (4) as enormes quantidades de dinheiro tornadas disponíveis para o desenvolvimento de drogas anti-VHC, baseados na perspectiva de rápido e vantajoso retorno devido ao tamanho do mercado para tratamento dessa doença; (5) a notável experiência desenvolvida pela indústria farmacêutica, em parceria com clínicas acadêmicas, no desenvolvimento de testes pré-clínicos e estudos clínicos de fases I a III, oferecendo aos pacientes um acesso precoce às novas drogas e finalmente a sua aprovação para uso clínico (Pawlotsky, 2014).

Alguns aspectos do relacionamento microrganismo-hospedeiro, todavia, ainda não são totalmente conhecidos na infecção crônica do hospedeiro humano pelo VHC. Por outro lado, as infecções crônicas representam um gravíssimo problema de saúde pública para todo o mundo. Doenças como a malária, a tuberculose, a infecção pelo HIV e as hepatites virais comprometem milhões de pessoas e

continuam a causar morbidade e mortalidade altamente significantes. Essas diversas infecções tornam-se crônicas quando o agente invasor escapa da eliminação pela resposta imune do hospedeiro na tentativa de sobreviver e de garantir a sua transmissão com sucesso.

1. 2 EPIDEMIOLOGIA

A transmissão, seja endêmica ou epidêmica, é o processo viral pelo qual se disseminam a infecção e a doença. Portanto, o rastreamento da transmissão é fundamental para o controle do VHC e da Hepatite C (Khudyakov, 2012). A história da epidemia de Hepatite C é muito dinâmica e em meados do século passado, houve um rápido aumento no número total de infecções, sendo os subtipos 1a e 1b prevalentes mundialmente (Magiorkinis GE, et al., 2009; Iles JC, et al., 2013), o genótipo 2 e o subtipo 5a encontrados na África (Tanaka Y, et al. 2006; Markov PV, et al. 2009) e subtipo 3a localizado no Paquistão e Ásia Central (Tanaka Y, et al. 2006; Khan A, et al. 2009). Posteriormente, durante a década de 1980 e início de 1990, observou-se um rápido declínio no número casos de Hepatite C aguda nos EUA (Williams LT, et al. 2011). Tais variações no tamanho da população do VHC impactaram a diversidade genética do vírus (Tanaka Y, et al. 2006; Magiorkinis G, et al. 2009; Markov PV, et al. 2009). Do mesmo modo, os padrões de transmissão, característicos a grupos de risco específicos, e as variações nas taxas e padrões de transmissão tendem a reconfigurar a composição genética das populações do VHC (Khudyakov Y, 2012).

A principal forma de transmissão do VHC é a parenteral, através da exposição à sangue e derivados contaminados (Stockman LJ, et al. 2014; Zibbell JE, et al. 2015). A partir de 1990, a introdução de métodos de triagem para detecção de anticorpos anti-HCV em amostras de sangue diminuiu o número de casos de infecção por VHC durante a transfusão sanguínea e hemoderivados (Soldan K, et al. 2003). No entanto, o uso de drogas injetáveis tornou-se o principal fator de risco de infecção pelo VHC (Williams LT, et al. 2011), e a prevalência da infecção em usuários de drogas injetáveis (UDI) pode ser superior a 80% (Garfein RS, et al. 1996; Amon JJ, et al. 2008; Zibbell JE, et al. 2015). Globalmente, estima-se que 64%

dos UDI estão infectados pelo VHC e a aquisição do vírus é bastante rápida após o início do uso de drogas injetáveis (Ward JW, 2013). Este grupo de alto risco frequentemente apresenta infecção primária e reinfecções com mais frequência do que a população em geral (Khudyakov 2012). Do mesmo modo, as transmissões do tipo nosocomial continuam a ser uma importante fonte de novas infecções pelo VHC. Globalmente, estima-se que esse tipo de transmissão seja responsável por 40% das infecções. Em países com alta prevalência de infecção crônica do VHC (ou seja, maior do que 3%), como o Egito, Paquistão e Mongólia, este é o principal modo de transmissão. Nessas localidades, o uso compartilhado de seringas é comum e tais práticas, tão arraigadas culturalmente, são difíceis de mudar. Nos Estados Unidos e em outros países com baixa prevalência do VHC, as transmissões nosocomiais são importantes causas de surtos. O vírus também pode ser transmitido através do compartilhamento de dispositivos contaminados com sangue VHC positivo. Apesar de controversa, nos Estados Unidos estima-se que a transmissão heterossexual seja responsável por 14% dos casos notificados de infecção aguda pelo VHC (Williams IT, et al. 2011; Ward 2013). O contato domiciliar com pessoas infectadas dobra o risco de infecção, resultante da exposição incidental ao sangue contaminante em itens como escovas de dente e lâminas de barbear. Nos Estados Unidos, aproximadamente 3% dos casos agudos de infecção por VHC ocorrem em profissionais de saúde, como resultado da exposição ocupacional (Wasley and Alter 2000; Esteban JI, et al. 2008; Williams IT, et al. 2011). Não obstante, a via de transmissão não é prontamente identificada em uma porcentagem significativa dos casos (Flamm SL, et al. 1998; Karmochkine M, et al. 2006).

No Brasil, a prevalência da infecção pelo VHC na população em geral é de aproximadamente 1,5% (Focaccia R, et al. 1998; Zarife MA, et al. 2006; Pereira LM, et al. 2013), havendo grande variação em populações específicas. Inquérito epidemiológico recente feito no Brasil mostrou 1,38% de prevalência de sorologia positiva para o vírus da hepatite C entre a faixa etária de 10 a 69 anos. Os principais grupos de risco identificados foram os usuários de drogas (27,4%) e os hemotransfundidos (26,9%). Outros mecanismos de infecção prováveis foram o contato sexual (18,5%), acidente de trabalho (1,2%), contato domiciliar (1,1%), hemodiálise (0,9%) e transmissão vertical em 0,3%. O pico de incidência foi maior nos indivíduos mais velhos, entre 50 e 60 anos. A razão homens e mulheres foi de

1,4. Em relação à raça, 68,1% são brancos, seguidos por 23,4% de pardos, 7,6% de negros, 0,8% de amarelos e 0,1% indígenas. A maioria dos casos notificados apresentam os genótipos de VHC tipo 1 em 67,7%, seguido pelos tipos 3 e 2 com 25,9% e 5,7%, respectivamente. No Brasil, entre 2000 e 2011, foram declarados no Sistema de Informação de Mortalidade 30.931 óbitos por hepatite C, sendo, 16.896 como causa básica e 14.035 como causa associada, a maioria dos quais nas Regiões Sudeste e Sul com 57,5% e 25,5%, respectivamente. No período de 1999 a 2011, foram notificados no Sistema Nacional de Informação 5.222 casos confirmados de hepatite C na Região Sudeste, o que representou 67,3% dos casos notificados no Brasil, (Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais, 2012).

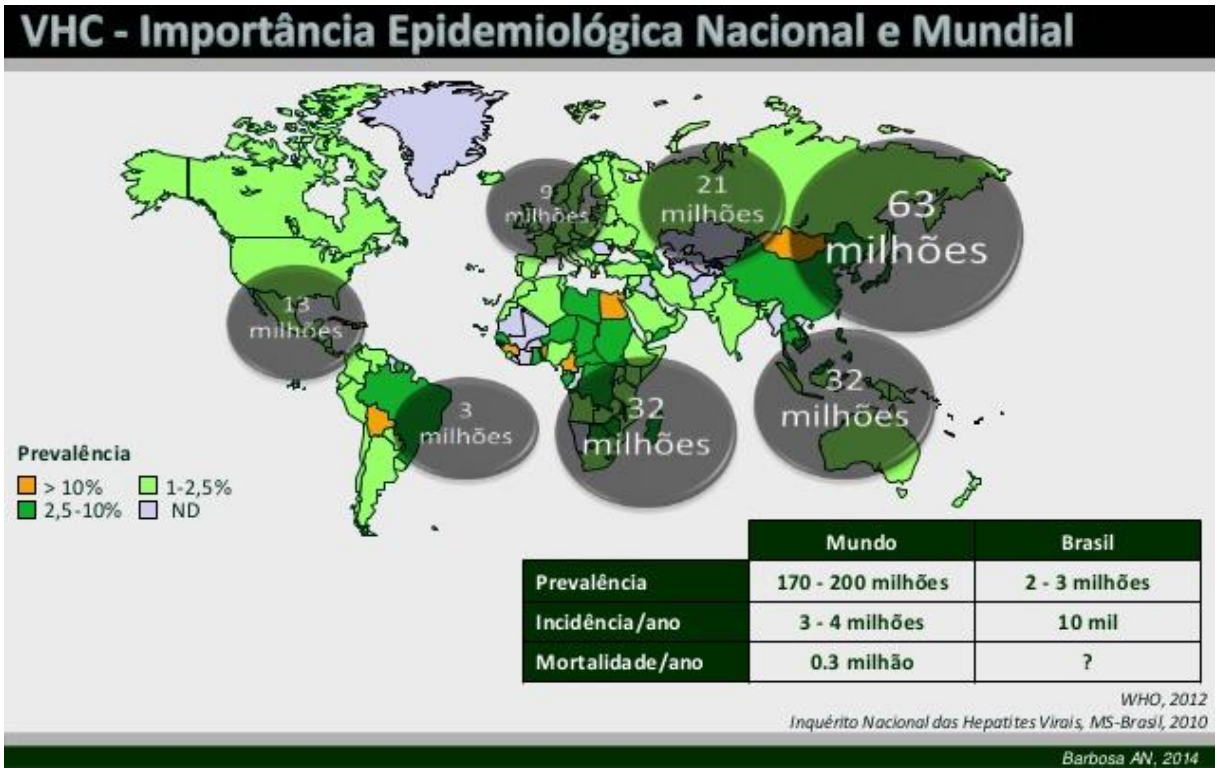

Figura 1: Prevalência e incidência da infecção do VHC no mundo e no Brasil

1. 3 TRATAMENTO

Até 2011, o tratamento disponível para a hepatite C crônica baseava-se em uma combinação de interferon alfa peguilado (IFN-α) e ribavirina (RBV) cuja resposta virológica sustentada (RVS) é avaliada pela não detecção de RNA viral três a seis meses após o tratamento (MAcParland et al. 2009; Pawlotsky et al. 2007; Sabahi, 2009). Em infecções pelo genótipo 1 observam-se as taxas mais baixas de RVS (40-50%). Em contraste, para os genótipos 2 ou 3, foram obtidas elevadas taxas de RVS que atingiam os 80% (Manns et al., 2001; Fried et al., 2002; McHutchison, 2004). No entanto, taxas de RVS de valores intermédios (43-70%) foram associadas ao genótipo 4. Em relação aos genótipos 5 e 6, as taxas de RVS alcançadas podem ser as mais elevadas, variando entre 60-85% (Antaki et al., 2010). Esse tratamento, entretanto, mostrava-se associado a rigorosos efeitos adversos, tempo prolongado de duração (um ano ou mais) e, na vida real, índices de RVS ainda mais baixos dos observados nos protocolos de pesquisa (entre 30 e 40% em nosso meio).

Recentemente, estudos revelaram uma eficácia superior no tratamento, através da utilização de novos fármacos que são drogas antivirais de ação direta e que interferem na replicação do VHC pela inibição da enzima protease serínica NS3/4A (telaprevir e boceprevir) (Tong et al., 2008; Pol S, & Corouge M., 2014; Bichoupan K & Dieterich DT, 2014). O uso clínico no tratamento da hepatite C crônica associada ao genótipo 1 demonstrou que com o uso de telaprevir ou boceprevir (inibidores de protease de primeira geração), em combinação com INF-α-PEG e RBV, observou-se uma RVS significativamente superior à do tratamento usual com apenas INF-α-PEG e RBV. Entretanto, pacientes infectados pelos genótipos 2 e 3 continuam a tratar com INF-α-PEG e RBV (Zeuzem et al., 2011). Este esquema tríplice, com PegIFNalfa + RBV e um inibidor de protease, passou a ser o “standard of care” no tratamento dos pacientes infectados pelo genótipo 1 do VHC, inclusive no Brasil.

Nestes últimos dois anos, novos tratamentos com outros medicamentos de ação direta como inibidores da protease de segunda geração e inibidores da polimerase (nucleosídeo/tídeo análogos ou não) demonstraram serem muito mais

eficazes contra o vírus da hepatite C, além de envolverem efeitos colaterais ausentes ou muito discretos, ao contrário dos esquemas anteriores. Esses novos esquemas propiciam tratamentos livres do uso do Interferon e já estão disponíveis para uso clínico na Europa, na América do Norte e no Brasil. Estudos publicados recentemente, que utilizam a combinação de antivirais de ação direta, sendo um inibidor de protease, por exemplo o simeprevir e um inibidor de polimerase, por exemplo o sofosbuvir ou de dois inibidores da polimerase como o daclatasvir (NS5A) e o sofosbuvir (NS5B), foram associados a altas taxas de Resposta Virológica Sustentada contra o vírus da hepatite C (acima de 95%), em tratamentos mais curtos (12 a 24 semanas) e sem gerar efeitos colaterais significativos (Sulkowski et al. 2014). Algumas dessas medicações, já foram licenciadas pelos órgãos reguladores do Ministério da Saúde do Brasil e já estão disponíveis para uso clínico em nosso meio.

Torna-se muito importante destacar que, o uso de tratamentos com drogas antivirais diretas de nenhuma forma diminui a importância da resposta do sistema imune do hospedeiro no controle e mesmo na erradicação da infecção crônica pelo VHC e suas deletérias consequências. Este é um tema que começa a chamar a atenção dos pesquisadores envolvidos na fisiopatogenia dessa doença e é, igualmente, uma das motivações deste trabalho.

1.4 VÍRUS DA HEPATITE C

O vírus da hepatite C (VHC) foi identificado em 1989, por Choo e colaboradores (Choo et al., 1989) e está atualmente classificado no gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae* (Kupfer, 2012). A análise filogenética permitiu a classificação do vírus em seis genótipos e vários subtipos, de acordo com as regiões codificadoras homólogas e sequências completas do genoma (Simmonds et al., 2005). As chamadas quasispécies, são VHC geneticamente relacionados que ocorrem no mesmo paciente infectado resultante de mutações que ocorrem durante a replicação viral.

1.4.1 GENÓTIPO VIRAL

O genótipo 1, é mais prevalente nos Estados Unidos, Europa e no Brasil. Em nosso país, o VHC mostrou predominância do genótipo 1 em 70%, seguido do tipo 3 (22,3%) e tipo 2 (4,2%) (Cavalheiro et al., 2002; Lauer e Walker, 2001), conferindo menor resposta ao tratamento com Interferon peguilado + ribavirina, quando comparado aos genótipos 2 e 3 (Manns et al., 2001).

A variabilidade elevada do VHC tem dificultado o desenvolvimento de vacinas e favorece a persistência viral no organismo do hospedeiro (Lyra et al. 2004, Strahotin & Babich, 2012). A diversidade dos genótipos é importante epidemiologicamente e, principalmente, em relação ao tratamento da hepatite C. Assim, o genótipo é um dos parâmetros utilizados para definir a estratégia de tratamento e as chances de sucesso terapêutico (Le Guillou-Guillemette et al., 2007).

1.4.2 ESTRUTURA VIRAL

A partícula viral do VHC apresenta tamanho variável de 40 a 70 nm de diâmetro. Trata-se de um vírus RNA de fita simples com polaridade positiva, formado por cerca de 9.600 nucleotídeos (Choo et al., 1989). Contém uma única fase de leitura aberta (ORF, “open reading frame”) que codifica para uma poliproteína de cerca de 3.000 aminoácidos. O genoma possui duas regiões não traduzidas: 5’UTR com aproximadamente 341 nucleotídeos e região 3’UTR com aproximadamente 230 nucleotídeos. A tradução do RNA do VHC resulta numa poliproteína precursora que sofre processamento proteolítico para dar origem às proteínas estruturais (“core” e as proteínas do envelope E1 e E2), o polipeptídeo p7 e as proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Moradpour et al., 2007).

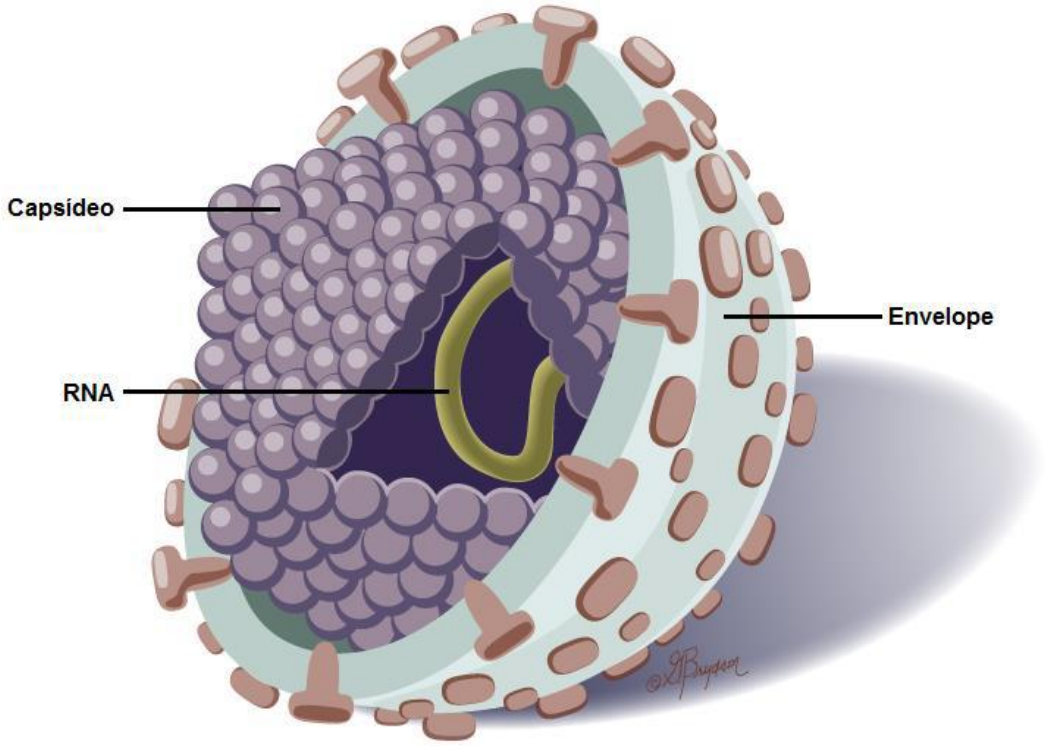

Figura 2: Representação esquemática do vírus da hepatite C (modificada)
Fonte: http://hepatite-tema.blogspot.com.br/2011_12_01_archive.html

1.4.3 REGIÃO ESTRUTURAL DO VHC

A proteína core é a primeira na sequência da poliproteína inicialmente formada, constituindo a nucleocápsideo do VHC. (Bukh J, et al. 1994; McLauchlan , 2000). O domínio I permite a ligação da core ao RNA, ao nível dos aa 1 – 74 (Santolini E, et al. 1994). Este domínio é extremamente hidrofílico, e as cargas positivas dos seus resíduos básicos interagem com as cargas negativas do esqueleto de fosfato dos ácidos nucléicos, mediando a ligação ao RNA viral (Fan Z, et al. 1999; Santolini E, et al. 1994). De fato, este domínio parece ser responsável por mediar a montagem do cápsideo, interagindo com várias proteínas celulares. O domínio II, devido à sua hidrofobicidade, interagem entre os lipídios e as proteínas de membrana. Quanto ao domínio III, apesar de não se encontrar presente na forma madura da proteína, desempenha um papel importante na estabilidade do core, sendo que a sua clivagem poderá estar envolvida na associação da core a vias celulares que previnem a sua degradação (Polyak SJ, et al. 2006).

A glicoproteína E1 parece estar envolvida na fusão do vírus à membrana citoplasmática, além do que vários anticorpos dirigidos contra E1 são capazes de neutralizar a entrada na célula, presumivelmente, numa fase distinta da ligação ao receptor (Lavillete et al., 2007; Samreen et al., 2012).

A glicoproteína E2 participa como um componente chave na adsorção do vírus aos seus principais receptores celulares, como o CD81, expresso em várias células como hepatócitos, macrófagos, linfócitos, monócitos, células dendríticas, *natural killer*, endoteliais e epiteliais (Rocha-Perugini et al., 2008; Sharma, 2010). Além disso, a glicoproteína E2 interfere na atividade antiviral do interferon (IFN), pois é capaz de interagir com a proteína quinase R (PKR - *protein kinase R*), cuja expressão é induzida pelo IFN, o que permite ao VHC escapar da ação do IFN (Wohnsland et al., 2007; Afzal et al., 2011).

1.4.4 PROTEINAS NÃO ESTRUTURAIS DO VHC

As proteínas não estruturais, localizadas na extremidade C-terminal, são imprescindíveis para a replicação viral (Suzuki *et al.* 1999, Suzuki *et al.* 2007, Tang & Grisé, 2009).

A NS2 é uma proteína transmembranar que possui cerca de 21 – 23 kDa. O N-terminal desta proteína contém resíduos altamente hidrofóbicos, que formam três ou quatro hélices transmembranares que se inserem na membrana do retículo endoplasmático. Quanto à região C-terminal, esta localiza-se no citoplasma, e forma, juntamente com o domínio N-terminal da NS3, a protease NS2/NS3, que é responsável pela clivagem intramolecular entre a NS2 e a NS3. (Grakoui A, et al. 1993; Ashfaq UA, et al. 2011).

A NS3 é uma proteína de 67 kDa, com atividade multifuncional. Os 180 aminoácidos N-terminais definem a sua atividade de protease serínica, enquanto os aminoácidos C-terminais são responsáveis pelas atividades de NTPase/helicase, sendo subdivididos em três domínios. (Yao N, et al. 1999). A proteína NS4A funciona como co-fator para atividade de protease serínica da NS3, constituindo, ambas as componentes proteicas, um dímero não covalente, designado por

protease serínica NS3-4A. Esta é responsável pela clivagem de quatro locais na poliproteína, nomeadamente, entre NS3- 4A, NS4A-4B,NS4B-5A e NS5A-5B, na poliproteína precursora. (Bartenschlager R, et al. 1994; Ashfaq UA, et al. 2011). A atividade enzimática da NS3 NTPase/helicase é indispensável para a replicação do RNA viral. Foram atribuídas funções putativas a este complexo enzimático, tais como o desenrolamento dos intermediários de cadeia dupla do RNA, a eliminação das estruturas secundárias, ou a separação do genoma viral das proteínas às quais se encontrem ligadas (Serebrov and Pyle 2004; Ashfaq UA, et al. 2011).

A NS4A é uma proteína com 54 aminoácidos. Como foi já referido, esta proteína atua como co-fator da proteína NS3, na sua vertente de protease serínica, sendo a interação entre a NS4A e a NS3 mediada pelo C-terminal da NS4A. Esta interação permite a ativação do local ativo da NS3 (Wolk B, et al. 2000; Ashfaq UA, et al. 2011)

A NS4B é uma pequena proteína com 27 kDa, que desempenha um importante papel no recrutamento de outras proteínas virais (Lundin, et al. 2006; Ashfaq UA, et al. 2011). De fato, a NS4B é uma proteína integral de membrana, sendo sinalizada para o ER, e co-localizando-se com outras proteínas não estruturais na membrana do ER (Hugle T, et al. 2001; Ashfaq UA, et al. 2011). Adicionalmente, a NS4B interage com a NS4A e, desta forma, também com a NS3 e a NS4, de forma indireta (Lin C, et al. 1997; Ashfaq UA, et al. 2011).

A NS5A é uma fosfoproteína hidrofílica, que existe em diferentes estados de fosforilação, tendo-se observado duas formas da proteína, uma num estado de fosforilação basal, com 56 kDa, e uma hiperfosforilada, com 58 kDa, que se designam, respectivamente, por p56 e p58 (Kaneko T, et al. 1994; Tellinghuisen TL, et al. 2004). A NS5A desempenha um importante papel na replicação, sendo que a associação da NS5A com outras proteínas virais sugere a sua presença no complexo de replicação (Neddermann P, et al. 1999). Adicionalmente, as mutações presentes na NS5A mostraram ser essenciais para a replicação (Lohmann V, et al. 1999; Ashfaq UA, et al. 2011). As funções da NS5A são muito importantes ao nível da modulação da resposta imune mediada por IFN-α. O domínio II contém uma região da NS5A definida como *Interferon-α Sensitive Determining Region* (ISDR, a.a. 237-276) (Tellinghuisen TL, et al. 2004). A NS5A poderá ter numerosas interações

com proteínas que afetam os processos de sinalização celular. Nomeadamente, esta proteína pode modular três vias MAPK principais, envolvidas na sinalização mitogênica da célula, que regula o crescimento e ativação. Desta forma, a NS5A seria capaz de regular a sinalização celular por mecanismos pró e anti-apoptóticos. A NS5A poderá ainda interferir nas vias de espécies reativas ao oxigénio (ROS) e de fosfatidilinositol 3- cinase, o que pode levar à transformação dos hepatócitos e à formação de hepatocarcinoma. (Macdonald A, et al. 2004).

A NS5B desempenha um papel crucial na replicação do RNA do VHC. Possui atividade de RNA polimerase dependente de RNA, constituindo a subunidade catalítica do complexo de replicação (Behrens SE, et al. 1996; Ashfaq AU, et al. 2011). Esta RNA polimerase dependente de RNA não possui atividade de *proofreading*, o que se reflete numa taxa de erro de cerca de 10-4 mutações por genoma por ciclo de replicação. Disto resulta uma enorme heterogeneidade viral em cada paciente, responsável pela existência de quasispecies (Mathy JE, et al. 2008).

De fato, as proteínas não estruturais do VHC encontram-se co-localizadas com a NS5B na membrana do ER (Behrens SE, et al. 1996; Brass V, et al. 2002). Adicionalmente, outros resultados sugerem que a NS5B se liga à NS3, sendo que a NS3 interage, por sua vez, com a NS4A e, possivelmente, com a NS4B e a NS5B (Piccininni S, et al. 2002). A NS5A pode interagir com as proteínas NS3, NS3, NS3A, NS4B e NS5B (Blight KJ, et al. 2000; Krieger N, et al. 2001). A atividade da NS5B poderá ainda ser modulada pela NS5A (Shirota Y, et al. 2002).

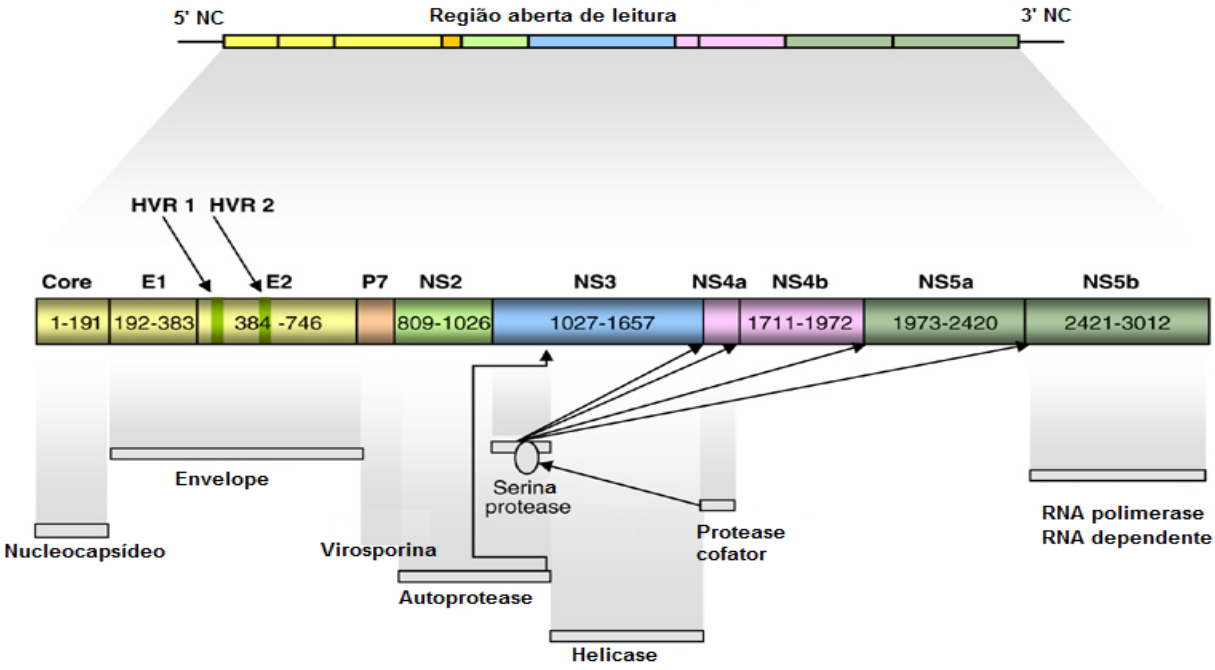

Figura 3: Proteínas virais do Vírus da Hepatite C**.** Fonte: Lloyd *et al.* (2007)

1.5 TROPISMO VIRAL

A partir do momento que o vírus se dissemina em um organismo, a sua distribuição entre e dentro dos tecidos do hospedeiro torna-se um fator determinante da sua patogénese. No entanto, a distribuição do vírus pelos tecidos é um processo dinâmico determinado por diversos fatores, que incluem a velocidade de replicação viral, a presença de receptores virais específicos, a taxa de mutação viral, a susceptibilidade hospedeira e genes de resistência, e a imunidade inata e adaptativa (Bernard N. et al., 2007). O VHC é considerado um vírus hepatotrópico, pelo que os hepatócitos são os seus principais alvos (Brian WJ, et al., 2010). É sabido que os receptores celulares CD81, SR-B1, CLDN1, e OCLN, desempenham um papel fundamental na entrada do VHC (Ploss A, et al., 2009; Scarselli E, et al. 2002; Zeisel MB, et al., 2007) e, consequentemente, no seu tropismo celular (Shiffman ML, 2011). Há evidências de que estes receptores se encontram expressos numa variedade de tecidos, apresentando, contudo, uma expressão mais elevada ao nível do fígado (Su AI, et al., 2004; Fletcher NF, et al., 2010). Apesar de o VHC ser principalmente

hepatotrópico, foi evidenciada a detecção de RNA viral em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), embora não se saiba ainda ao certo se ocorre replicação viral ao nível destas células (Dustin and Rice, 2007; Fletcher NF, et al., 2010).

1.6 PATOGÊNESE DO VHC

O VHC é um exemplo de patógeno viral que obtém grande sucesso em estabelecer infecções persistentes através da evasão do sistema imune do hospedeiro. Uma pequena fração dos indivíduos infectados é capaz de clarear a infecção espontaneamente, enquanto cerca de 70% desenvolve uma infecção crônica. Nesses pacientes persistentemente infectados os sintomas são leves ou ausentes e pode levar décadas antes que as sérias consequências da infecção crônica tornem-se aparentes. Esses pacientes estão expostos ao risco de desenvolver fibrose hepática, cirrose e/ou carcinoma hepatocelular. Além do mais, as complicações tardias da falência hepática são uma importante indicação para o transplante de fígado.

Embora os hepatócitos sejam considerados os alvos primários do VHC, evidências clínicas e experimentais indicam fortemente que o vírus se propaga para células de outros órgãos como cérebro e medula óssea, mas particularmente, para células do sistema imune. O tropismo do VHC por células linfóides é ainda apoiado pela maior prevalência de doenças do sistema linfático em pacientes com hepatite C crônica do que naqueles sem ela, incluindo crioglobulinemia mista tipo II e linfoma não - Hodgkin (Zignego et al., 2007; Tram et al., 2008).

1.7 RESPOSTA IMUNE AO VHC

A resposta imune do hospedeiro é de central importância para o controle da infecção pelo VHC. Receptores detectores de patógenos continuamente rastreiam o meio e reconhecem produtos virais resultando em rápida produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-6, assim como Interferons do tipo I. Estes iniciam uma resposta imune não específica através da indução de produtos antivirais além de atuarem como imunomodulatórios dando origem a células imunes que incluem células NK e células T para responder de maneira eficiente ao ataque dos patógenos ao hospedeiro. Em adição, durante infecções virais, células TCD4+ e TCD8+ vírus específicas são normalmente detectadas no sangue. As células TCD4+ auxiliares estimulam as células TCD8+ citotóxicas que são equipadas para erradicar os vírus de uma maneira muito específica (Spaan et al., 2012).

A noção do linfotropismo como sendo uma propriedade intrínseca do VHC ganhou destaque a partir de estudos que demonstraram o genoma viral e sua forma replicativa (RNA de fita negativa) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos tanto com hepatite C crônica quanto naqueles que sofreram resolução espontânea ou terapêutica da infecção (Pham et al., 2005), sugerindo que tais células não seriam apenas um sítio de infecção, mas também de replicação viral.

Evidências em favor da infecção por VHC-RNA nas PBMCs *in vivo* incluem estudos realizados em culturas de PBMCs obtidas de pacientes cronicamente infectados pelo vírus, nos quais um significativo aumento na quantidade de RNA viral foi obtido por meio de estimulação mitótica. Isso sugere que a replicação do VHC é mais eficiente em células ativas do que em repouso (Pham et al., 2005; Tram et al., 2008; Zignego et al., 2007). O mais intrigante, no entanto, é o exato peso do linfotropismo do VHC sobre a história natural da doença.

Uma implicação imediata da infecção das células linfóides pode ser o seu papel em condicionar a persistência do vírus, desse modo, favorecendo a cronicidade da infecção pelo VHC. De fato, células linfóides, podem representar privilegiados reservatórios de infecção. A existência de tal reservatório pode ainda

implicar na recorrência de hepatite crônica mesmo após tratamento antiviral aparentemente bem sucedido e depois de transplante hepático por cirrose relacionada ao VHC. Nesses casos, o compartimento das PBMCs pode ser um bom reservatório para o VHC, o qual é capaz de reiniciar a replicação viral depois do fim do tratamento, quando as condições tornam-se novamente favoráveis (Cavalheiro et al., 2007b; Zignego et al., 2007). O achado de PBMCs infectadas pelo RNA-VHC mesmo após meses de RVS ou mesmo após a eliminação espontânea do vírus vem ao encontro da tese de que as PBMCs formam um reservatório para o VHC (Castillo et al., 2005; Cavalheiro et al., 2007b; Zignego et al., 2007). Entretanto, isso ainda é tema controverso na literatura.

Outra importante questão que permanece incerta até o presente momento é como a infecção das células imunes pelo VHC altera a sua função, principalmente no que concerne às PBMCs. Informações referentes às PBMCs e o VHC são pouco referidas na literatura internacional, embora sejam de fundamental importância para a compreensão do seu peso na história natural da infecção.

Estudo de R-Viso AT et al., de 2010, analisou a resposta imune no soro e no tecido em pacientes com hepatite crônica por VHC, através de método de imunohistoquímica semi quantitativo, comparando com biópsias de doadores de fígado para transplante. Foram estudados inúmeras citocinas, inclusive IFN-gama e IL-4 e subpopulações celulares como CD4, CD8, CD45, CD68, CD57, entre outras. Essa pesquisa mostrou claramente, pelo acesso simultâneo de citocinas pro e antinflamatórias e populações celulares, que (1) a resposta imune está associada com algumas citocinas proinflamatórias; (2) os linfócitos TCD4+ desempenham um papel predominante em orquestrar a resposta imune e (3) esses eventos tomam lugar primariamente nos espaços portais.

A resposta imune adaptativa consiste, quer na resposta imunes humoral, através da produção de anticorpos neutralizantes pelas células B, quer pela resposta imune celular, pela ação de células T auxiliares CD4+ (Th – T helper) e de células T citotóxicas CD8+ (CTLs – Cytotoxic T Lymphocytes). (Ashfaq, Javed et al. 2011). Relativamente ao primeiro caso, e no que diz respeito ao VHC, é possível detectar anticorpos específicos ao VHC, 7 a 8 semanas após a infecção (Pawlotsky 1999). No entanto, não se sabe ainda ao certo se estes anticorpos neutralizam a

infectividade do VHC (Ashfaq UA, et al. 2011). Já a resposta imune celular desempenha um importante papel na resolução viral (Thimme R, et al., 2001; Diepolder HM, et al. 1996; Ashfaq UA, et al. 2011). As células TCD4+ efetoras podem formar duas subpopulações, Th1 e Th2. A primeira (Th1) é responsável por muitas funções da imunidade mediada por células, tais como a ativação de CTLs, encontrando-se também associada com a promoção excessiva de inflamação; a segunda (Th2) encontra-se principalmente relacionada com a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos. As subpopulações que se distinguem pelo perfil das citocinas que produzem. As células Th1 secretam citocinas como IL-2, IFN-γ, e TNF. Já as Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e as suas funções são muito importantes ao nível da ativação de células B e, como tal, da resposta humoral. Normalmente, a resposta Th1 exerce um efeito negativo na regulação de Th2, e vice-versa (Kuby, 2003). A resposta Th1 parece ser um fator extremamente importante na proteção contra a infecção pelo VHC (Diepolder HM, et al., 1995; Wan L, et al., 2009). As células TCD4+ reconhecem antígenos apresentados por moléculas MHC II presentes na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs – Antigen Presenting Cells), e desempenham múltiplas funções efetoras, incluindo a ativação direta de macrófagos e de células B específicas de antígenos, bem como de células TCD8+. As células TCD8+ reconhecem antígenos apresentados por moléculas MHC I presentes na superfície de células infectadas, exercendo diferentes funções, quer causando a morte das células infectadas através da produção de granzima e perforina, quer inibindo a replicação viral sem causar morte celular, pela secreção de citocinas como, IFN-γ e TNF-α (Guidotti and Chisari 2001; Ashfaq UA, et al., 2011). A produção de IFN-α resulta na modulação indireta da resposta imune adaptativa, uma vez que induz a maturação de células apresentadoras de antígenos, resultando na produção de outras citocinas inflamatórias por células hepáticas residentes (Biron, 1999). O IFN-α influência a maturação de células dendríticas, modulando a apresentação de antígenos por parte das mesmas (Colonna M, et al., 2004; Barth H, et al., 2005), sendo que a apresentação de antígenos por células dendríticas, sob a influência de IFN-α, contribui para a diferenciação das células TCD4+ no fenótipo Th1, que está associado à resolução da infecção por VHC (Shoukry NH, et al., 2004). A produção de IFN-α durante a infecção pelo VHC pode, desta forma, contribuir indiretamente para a maturação de células TCD4+ em células Th1 (Jr DSCaMG, 2006). As células

dendríticas estão também envolvidas na modulação da atividade das células T CD8+. Os sinais co-estimulatórios que ocorrem durante a apresentação de antígenos a células TCD8+ podem determinar se a célula é, ou não, ativada. (Cooper S, et al., 1999; Shoukry NH, et al., 2004). Nomeadamente, as assinaturas PAMP presentes nos produtos de fagocitose das células dendríticas induzem, através da interação com TLR3, a produção de IFN-α (Schulz O, et al., 2005). O IFN-α produzido pelas células dendríticas induz, desta forma, a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas, que promovem a ativação de células T CD8+ (Jr DSCaMG, 2006). O IFN-α promove ainda ativação e proliferação das células Natural Killer (NK), que atuam através da lise das células infectadas (Biron CA, 1999; Loza & Perussia, 2004). Adicionalmente, as células NK ativadas produzem IFN-γ (Shoukry NH, et al., 2004). Os receptores de IFN-γ, uma vez ativados, levam à formação de homodímeros de moléculas STAT fosforiladas, que são translocados para o núcleo, atuando ao nível dos GAS (Gamma- Activated Sequence Elements), promovendo a transcrição dos genes que lhes estão associados. Nos hepatócitos, os genes sob o controlo de GAS apresentam uma sobreposição significativa com os que são expressos na resposta a IFN α/β. Os elementos GAS encontram-se ainda presentes nos genes cujos produtos estão envolvidos no processamento e apresentação de antígenos (Jr DSCaMG, 2006). Desta forma, a produção de IFN-γ poderá ser um fator importante no combate à infecção pelo VHC.

O VHC causa, na maioria dos pacientes infectados, uma infecção crônica, que surge associada a uma atenuação e/ou evasão da dos mecanismos de resposta ao VHC. A elucidação dos processos pelos quais o VHC atua torna-se necessária e indispensável ao desenvolvimento de novas estratégias de combate e prevenção da doença.

O VHC atenua a resposta inata antiviral de várias formas, ao nível da resposta IFN, mediante a ação das proteínas virais. A protease NS3/NS4A inibe a ação de TRIF e IPS-1, bloqueando a sinalização desencadeada por TLR3 e RIG-I. Por outro lado, a proteína core interfere ao nível da sinalização JAK/STAT e da produção de ISGs. Nomeadamente, inibe ação de STAT1, induzindo a sua degradação; ativa SOCS3, um inibidor da via JAK/STAT; ativa a proteína fosfatase 2A (PP2A) que, através da indução de outras moléculas inibitórias, reduz a atividade transcricional do complexo fator ISG3; inibe a ligação do complexo fator ISG3 aos

genes estimulados por interferon (Rehermann B, 2009). A proteína E2 inibe a atividade do receptor da proteína quinase R (PKR). A NS5A, desempenha um importante papel na capacidade de resposta ao à terapia baseada em interferon. Esta proteína interfere com a via 2-5 OAS/RNaseL, ligando-se à 2-5 OAS; liga-se diretamente ao PKR, e sub-regula a expressão de PKR; e induz IL-8, que inibe as funções antivirais desencadeadas por IFN (Ashfaq UA, et al., 2011).

De acordo com vários estudos (He XS, 2006), nos pacientes que desenvolvem infecção aguda, observa-se uma vigorosa resposta mediada por células T, específica ao VHC, nomeadamente, por células T CD4+ e T CD8+ (Takaki A, et al., 2000; Thimme R, et al., 2001; Lauer GM, et al., 2004). Esta resposta é detectada na fase inicial da doença, e prolonga-se durante vários anos após a resolução do vírus. Pelo contrário, os pacientes que desenvolvem infecção crônica, apresentam, normalmente, respostas T fracas e/ou de curta duração, bem como defeitos nas funções efetoras de células T específicas (He XS, 2006). As respostas mediadas por células T com este perfil resultam, normalmente, em um baixo controlo da viremia e na sua persistência (Thimme R, et al., 2001). As evidências anteriores sugerem que uma resposta eficaz no combate à infecção pelo VHC seja essencialmente do tipo Th1, o que leva a pensar que a resposta Th2 se encontre, neste caso, sub-regulada. Foi também demonstrado que os níveis de IL-4 e IL-10 se encontravam elevados em doentes hepatite C crônica (Tsai SL, et al., 1997), enquanto os pacientes que desenvolvem uma infecção crônica mostram uma resposta predominantemente Th2, que sub-regula a resposta Th1 (Rehermann and Nascimbeni, 2005). No entanto, embora alguns artigos tenham revelado baixos níveis de IFN-γ em pacientes VHC (Cecere A, et al., 2004), ou um não aumento nos níveis de citocinas Th1 (Shapiro S, et al., 1998), outros estudos revelaram que os níveis séricos das citocinas Th1, incluindo o IFN-γ e a IL-2, encontravam-se elevadas em pacientes infectados com VHC (Cacciarelli TV, et al., 1996; Cribier B, et al., 1998; Wan L, et al. 2009). Nos pacientes com infecção crônica, a presença de células T CD8+ específicas pode controlar parcialmente a replicação viral, contribuindo para a progressão da doença. No entanto, as respostas imunes celulares mediadas por células, como TCD4+ e por células T CD8+ citotóxicas, causam longas reações inflamatórias, que podem resultar em cirrose e hepatocarcinoma (Gremion & Cerny, 2005). Por outro lado, durante a infecção

aguda, observa-se, inicialmente, um período transiente de disfunção de células T CD8+ (Lechner F, et al., 2000; Thimme R, et al., 2001), sugerindo tal, que uma sub-regulação transiente de células T CD8+ poderá representar uma estratégia, no sentido se limitar os danos nos tecidos, causados pelas células T CD8+ citotóxicas, durante a fase inicial da infecção, quando se verifica um pico de replicação viral (He XS, 2006). Devido à elevada taxa de inserção de erros, por parte da RNA polimerase dependente de RNA, aquando da replicação, o escape mutacional do vírus à resposta imune adaptativa torna-se uma das principais estratégias de evasão da resposta imune pelo VHC. Nomeadamente, as alterações ao nível da sequência da região hipervariável da glicopoteína E2 resultam no escape do vírus à resposta mediada por células T (Ashfaq UA, et al., 2011). Foram também observadas substituições de aminoácidos virais que inibem o reconhecimento específico do VHC por células T em pacientes com infecção crônica (Chang KM, et al. 1997; Frasca L, et al., 1999). As mutações do VHC afetam a especificidade das respostas mediadas por células T CD8+ específicas, através da diminuição da afinidade de ligação entre o epítopo antigénico e a molécula MHC, diminuindo o reconhecimento pelos receptores T (TCR – T Cell Receptor) e afetando negativamente o processamento de antígenos do VHC (Ashfaq UA, et al., 2011). Um outro mecanismo de evasão possível é a indução de anergia nas células T específicas ao VHC, ou seja estas células perdem a sua funcionabilidade. As células T CD8+ específicas poderão ser afetadas na sua capacidade proliferativa, citotoxicidade, e na produção de TNF-α e IFN-γ (Spangenberg HC, et al. 2005; Ashfaq UA, et al. 2011). Podem encontrar-se células TCD8+ em diferentes estádios de diferenciação, sendo que as células TCD8+ completamente diferenciadas são essenciais para um controlo bem sucedido da infecção pelo VHC. Foi observado que pacientes respondedores à terapia manifestavam um surgimento mais rápido destas células, bem como uma maior frequência das mesmas. Desta forma, propôs-se que o VHC pudesse atuar de forma a bloquear ou a redirecionar a diferenciação de células TCD8+ (Caetano J, et al., 2008). Uma outra hipótese, é a possível infecção das células dendríticas (DCs – Dendritic cells) pelo VHC. Estas células são células muito importantes, não só no que diz respeito à apresentação de antígenos, mas também na indução da resposta imune adaptativa, de tolerância autoimune, e também no que diz respeito à imunidade inata anti-viral, mediante a produção de IFNs do tipo I (He XS, 2006). Alguns estudos mostraram a presença de sequências de RNA do VHC, incluindo, os

intermediários de cadeia negativa, em DCs isoladas a partir de pacientes com infecção crônica. (Bain et al., 2001; Goutagny et al., 2003; Tsubouchi et al., 2004) sugerem a possibilidade de replicação do VHC em DCs (He XS, 2006) reviu vários estudos *in vitro* que sugerem mecanismos de disfunção de DCs por parte do VHC. Contudo, estes tipo de estudos não reflete necessariamente o ambiente *in vivo*, sendo necessária ainda investigação adicional.

1.8 ELISPOT

Em 1983, os trabalhos que descrevem a técnica immunospot (ELISPOT), associada com enzimas, foram publicados por dois grupos; a primeira descrição aconteceu em um grupo de Perth, Austrália Ocidental, e a segunda, logo depois, a partir de um grupo em Gotemburgo, na Suécia (HandBook of ELISpot, 2005).

O enzyme-linked immunospot (ELISPOT) foi originalmente desenvolvido para a detecção de células B individuais, que segregam anticorpos específicos para o antígeno (HandBook of ELISpot, 2005). Este método foi adaptado para a detecção de células, que secretam citocinas individuais específicas ou outros antígenos (HandBook of ELISpot, 2005).

Ensaios de ELISpot estão bem adaptados para monitorizar as respostas imunes a vários tratamentos e terapias e têm sido utilizados para a quantificação das respostas das células antígeno-específico de T CD4 + e/ou T CD8 +. Outros métodos para a avaliação de respostas de células T antígeno-específicos, tais como ensaios de liberação de crómio, com quantificação por diluição limitante, são tediosos e requerem expansão *in vitro* de células T dias anteriores. Estes ensaios tipicamente não são adequados para medir as respostas das células T, que não frequentemente ocorrem em menos de 1 em 1000. O Ensaio ELISpot é altamente reprodutível, sensível e pode ser utilizado para medir as respostas com frequências bem abaixo de 1 em 100.000. Ensaios ELISpot não requerem expansão *in vitro* antes das células T, pois elas são adequados para análises de elevado rendimento, utilizando apenas pequenos volumes de células primárias. Como tal, as análises por

ELISPOT são ferramentas úteis para a pesquisa no desenvolvimento de vacinas e para o monitoramento de vários ensaios clínicos.

O ELISPOT vem sendo uma ferramenta útil e um método de escolha, inclusive em um número crescente na imunologia clínica, virologia clínica e laboratórios de patologia clínica, para a compreensão da imunidade a doenças infecciosas, monitoramento de respostas citotóxicas (por meio de medição da secreção de interferon-γ) na imunoterapia do cancro e ensaios para o desenvolvimento de vacinas virais, inclusive na maioria dos testes de vacinas contra o HIV (Arvilommi, 1996, HandBook of ELISpot, 2005).

A combinação da terapia com Interferon peguilado-alfa e Ribavirina foi até 2011, a terapia antiviral padrão para o VHC crônico e levava a uma resolução da infecção em apenas 45-80% dos indivíduos, dependendo do genótipo viral infectado (Manns et al., 2001; Hadziyannis et al., 2004). Compreender as razões pelas quais ocorre a falha da combinação terapêutica por alguns pacientes, é de grande importância na análise da sua eficácia e na otimização de estratégias de tratamento atuais e futuros.

A atividade imunomoduladora por Interferon alfa- peguilado e Ribavirina é capaz de induzir a resolução da infecção por VHC crônica tem sido bem documentada (Lohr et al., 1999, Luft et al., 1998, Yonghong Zhang et al., 2011). Interferon estimula a proliferação de células T de memória (Tough et al., 1996), melhora a diferenciação de células dendríticas (Santini et al., 2000) e regula positivamente a expressão classe I do Complexo Principal Histocompatibilidade sobre os hepatócitos (Willberg et al., 2007, Feld & Hoofnagle 2005). Durante as primeiras semanas de terapia combinada IFN-alfa e RBV, observam-se duas fases de declínio viral: a primeira fase seria rápido declínio na carga viral devido aos efeitos da terapia antiviral direta; na segunda identifica-se um decaimento de carga viral mais lento, dependente da eficiência da resposta de células T específicas do VHC envolvidas na eliminação dos hepatócitos infectados (Neumann et al., 1998). No entanto, há uma falta de evidências experimentais para compreender o efeito da resposta imune de células T específicas do VHC em relação a Resposta Virológica Sustentada (RVS) após combinação terapêutica .

Alguns estudos sugerem que a qualidade das respostas das células T, incluindo a capacidade proliferativa (Pilli et al., 2007) e polifuncionalidade (Badr et al., 2008) podem ser preditivos de eliminação viral da infecção por VHC. Uma resposta forte e persistente de células T a NS3 foi também observado como sendo crítica para a resolução da infecção VHC aguda (Diepolder et al., 1996). Há uma falta de análise abrangente de respostas globais de células T específicas do VHC e sua associação com a resposta virológica antes e durante a combinação terapêutica.

Baseado nessas incertezas o presente estudo tentará contribuir para a elucidação da influência do parasitismo por VHC na função de células TCD4+ e TCD8+ em pacientes naïve com indicação de tratamento com IFNpeg+RBV e comparar os dados obtidos antes, durante e pós-tratamento com os valores encontrados dos controles negativos, avaliando a influência do tratamento sobre a função dessas células.

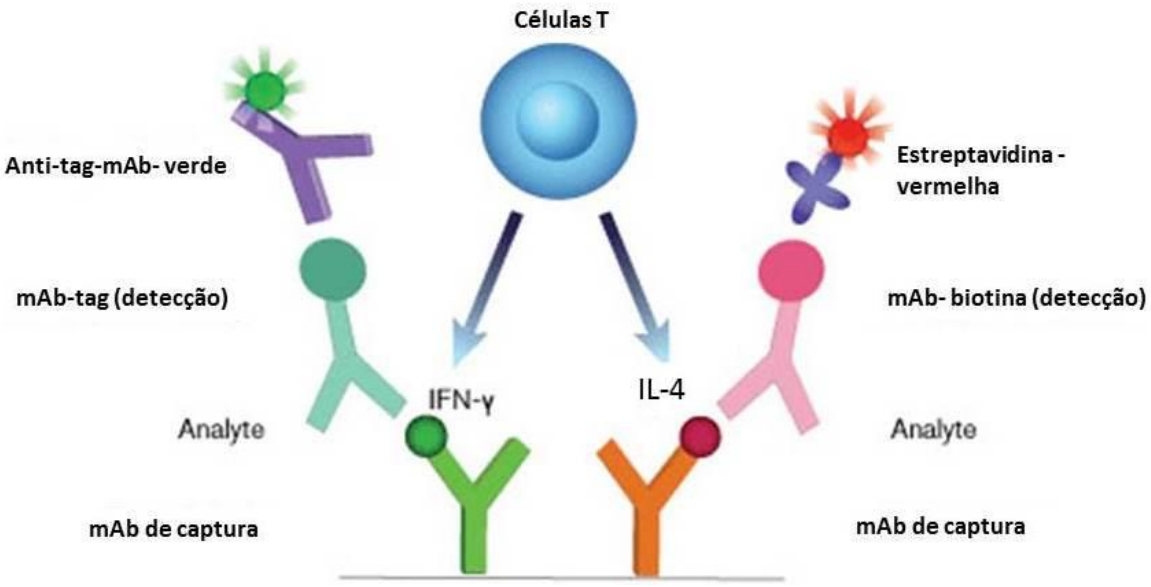

Figura 4: Princípio do ensaio de FluoroSpot. Fonte: Mabtech AB (adaptado)

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a função celular das PBMCs, mediante a infecção pelo VHC no sangue periférico de pacientes com Hepatite C crônica em pré-tratamento, durante e pós-tratamento com PegIFN-alfa e RBV.

2.2 Específicos

1. Verificar a presença do RNA-VHC nas PBMCs por RT-PCR em Tempo Real;
2. Verificar a influência de fatores do vírus e do hospedeiro, tais como genótipo, carga viral, idade, gênero, raça, polimorfismo IL28B e biópsia hepática sobre as células parasitadas pelo VHC e sua produção de citocinas;
3. Determinar a contagem e a função de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico desses pacientes;
4. Determinar a influência do parasitismo de linfócitos pelo VHC sobre a função dos linfócitos TCD4+ e TCD8+.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram estudados 52 pacientes com hepatite C crônica com indicação e em condições de tratamento; destes, 17 pacientes foram tratados com IFNalfa+RBV; 10 controles sadios foram incluídos.

Os pacientes foram então divididos em dois grupos:

Grupo 1: 52 pacientes com coleta de material única, antes do início do tratamento, nos quais se relacionou a contagem das células TCD4+ e TCD8+ e a resposta das PMBC ao estímulo com antígenos do VHC a fatores relacionados ao vírus (genótipo e carga viral) e ao hospedeiro (idade, gênero, raça, polimorfismo IL28B e histopatologia hepática).

Grupo 2: 17 pacientes, tratados com IFNalfa+RBV, com amostras colhidas antes, durante e após o tratamento; neste grupo estudou-se também a influência do tratamento sobre a presença do VHC nas PMBC e sobre a sua função, considerando a resposta ao tratamento, isto é, pacientes com Resposta Virológica Sustentada, Resposta com Recidiva ou Não Respondedores.

3.2 SELEÇÃO DE PACIENTES

A seleção dos pacientes foi feita de acordo com os critérios inicialmente propostos. Foram selecionados pacientes com hepatite crônica por VHC não tratados, atendidos no Ambulatório de Hepatites da Divisão de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e com indicação de tratamento, pelos critérios da portaria do Ministério da Saúde.

Foram excluídos pacientes com outras doenças hepáticas, tais como infecção pelo VHB, infecção pelo HIV, doenças autoimunes, esteatohepatite.

Para ingressar na pesquisa, cada paciente foi convocado para uma entrevista na qual foi explicado todo o projeto, bem como seus objetivos, prazos e cada um dos procedimentos a ser realizados. Uma vez esclarecidos e após consentirem em participar da pesquisa, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre a Esclarecido. Nessa mesma entrevista, foram aplicados os questionários de Identificação, Antecedentes Epidemiológicos e Hábitos àqueles pacientes que consentiram em respondê-lo.

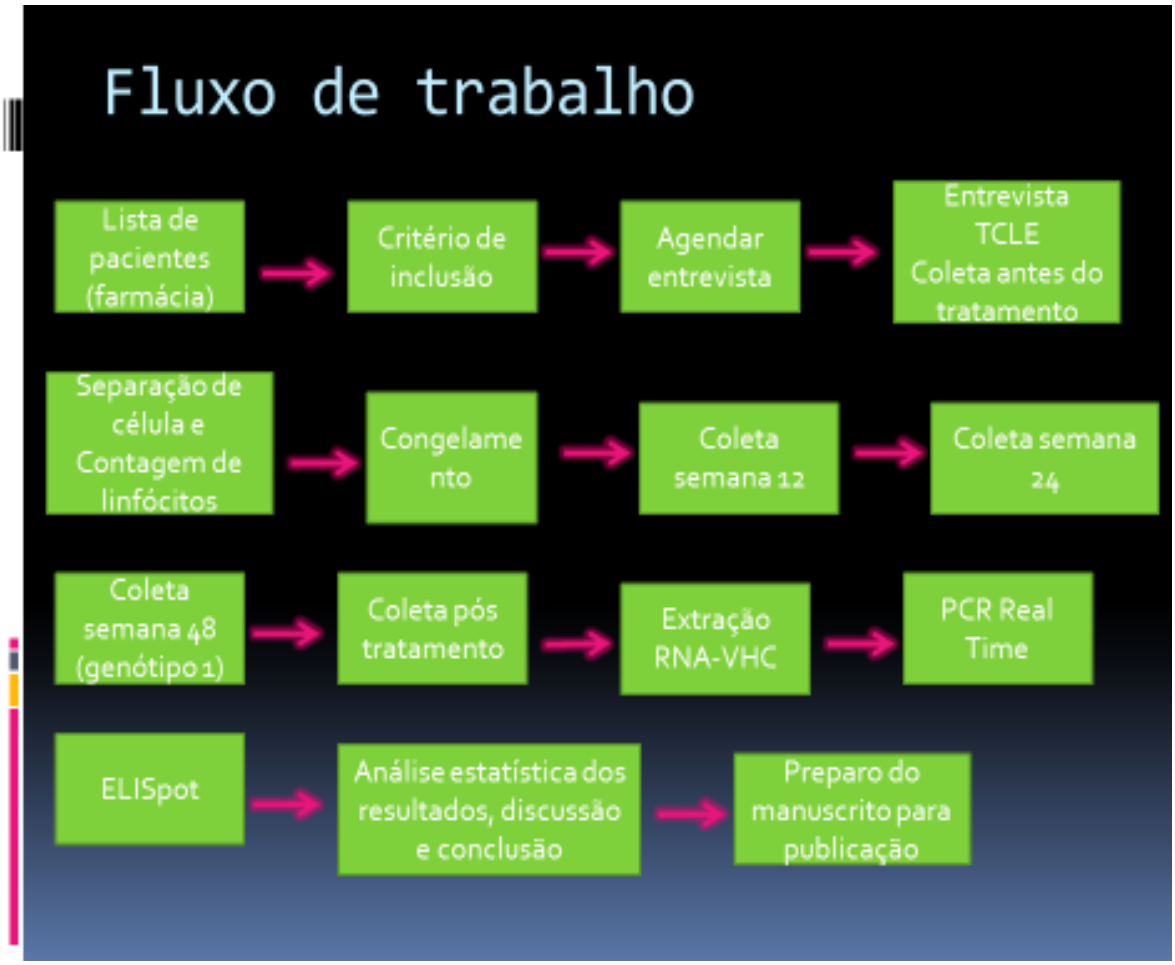

Figura 5: Representação esquemático do fluxo de trabalho utilizado para realização deste trabalho

3.3 COLETA E ANÁLISE DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os pacientes compareceram ao ambulatório para coleta de material para análise em um período que variou em cerca de dois meses antes do início do tratamento, durante as semanas 12, 24 ou 48 de tratamento, de acordo com o genótipo e em cerca de três meses após o término do mesmo (para aqueles que o concluíram até o presente momento).

Foram colhidos 30 mL de sangue total em tubo com anticoagulante a base de heparina e 12 mL de sangue total em tudo com EDTA como anticoagulante.

3.4 PURIFICAÇÃO DE DNA PARA ANÁLISE POLIMORFISMO DA IL28B

A extração de DNA (ácido desoxirribonucléico) a partir de sangue total foi realizada utilizando o kit QIAamp® DNA Mini, que por eluição purifica o DNA, que é isolado e permanece sem proteínas, nucleases e outros contaminantes. Este teste foi desenvolvido para uma rápida purificação de DNA e pode ser utilizado para sangue tratado com citrato, heparina, EDTA, plasma, soro, e outros materiais biológicos, sendo eles frescos ou congelados.

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram adicionados 20 µL de Proteinase K (para a lise celular), 400 µL de amostra e 200 µL de Buffer AL e agitou-se no vórtex por 15s. Após a agitação, foi realizada uma incubação em bloco de aquecimento à 56ºC por 10 minutos.

Ao final da incubação, uma rápida centrifugação foi necessária para remover gotas que podem ter ficado retidas na tampa do tubo, e em seguida adicionou-se 400 µL de etanol (96-100%) à amostra e agitou-se no vórtex por 15 segundos. Novamente foi realizada uma rápida centrifugação.

Todo o conteúdo da amostra foi transferido para a coluna, e duas lavagens foram realizadas para a eliminação de resíduos. Após as lavagens, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados à coluna 50 µL de Buffer AE (que por eluição separa os componentes, sendo que as moléculas de interesse são adsorvidas a coluna), após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada uma centrifugação por 2 minutos. Em seguida foram

adicionados 30 µL de Buffer AE à coluna e uma nova centrifugação de 2 minutos. Assim, o DNA purificado se solta da coluna em um volume final de 80 µL

3.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO GENE IL-28B POR PCR EM TEMPO REAL

O sistema *TaqMan* na reação de PCR em tempo real visa a detecção de sequências específicas por meio de uma sonda marcada com fluorocromo e quase totalmente complementar à sequência alvo, permitindo a hibridização e posteriormente a detecção do polimorfismo. A sonda possui em sua extremidade 5', um composto fluorescente, conhecido como reporter (responsável pela emissão do sinal que será detectado pelo aparelho). Na extremidade 3' encontra-se um composto chamado quencher que absorve a fluorescência emitida pelo reporter, numa distância de aproximadamente 22-30 pares de base, sendo que este é o tamanho ideal da sonda nesta reação. À medida que vai ocorrendo a amplificação, a taq polimerase que possui atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda, clivando-a. Assim, o reporter é liberado, gerando fluorescência (Kubista et al., 2006; Yang e Rothman, 2004).

A identificação dos genótipos do *SNP rs12979860* do gene IL-28B foi feita através da determinação da intensidade de fluorescência emitida na reação (Kubista et al., 2006; Mamotte, 2006).

Para a realização das reações foram sintetizados primers e sondas para a identificação do SNP rs12979860 presente no gene IL-28B, conforme as instruções do fabricante.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento: 12,5 µL de TaqMan® Master Mix (AmpliTaq Gold® DNA Polymerase Ultra Pure, desoxinucleotídeos [dNTP], ROX referência passiva), 1,25 µL de Genotyping Assay® (primers e sondas) e ao final foram adicionados 11,25 µL de DNA purificado. Os parâmetros (tempo de hibridação e extensão, temperaturas de desnaturação, hibridação e extensão, e o número de ciclos) foram testados e otimizados no termociclador Applied Biosystems StepOne™.

As condições em que ocorreram as reações para os *SNPs* rs12979860, foram as seguintes:

- um ciclo de desnaturação inicial de 95ºC por 10 minutos
- seguidos de 46 ciclos de: desnaturação a 95ºC por 30 segundos, pareamento a 57ºC por 1 minuto;
- um ciclo de extensão final a 60º por 30 segundos.

3.6 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Foram colhidos aproximadamente 30 mL de sangue total em tubo com anticoagulante a base de heparina. As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e separados o plasma da fração celular. A fração celular foi diluída em meio RPMI na proporção de 3 para 1 (3:1). Essa mistura foi delicadamente pipetada sobre Ficol-Hypaque (gradiente de concentração com densidade de 1.076), em tubo cônico de plástico, também na proporção 3:1, para que as partes não se misturassem. Os tubos foram centrifugados por 20 min. a 2200rpm para separação do anel de células mononucleares, que em seguida, com o auxílio de pipeta Pasteur, foi retirado e lavado três vezes em meio RPMI. Logo após, a concentração de células foi acertada para $2x10^6$. Às soluções de células adicionou-se o meio de congelamento, constituído de 90% de soro fetal bovino (SBF) e 10% de DMSO, na proporção de 1:1. Após isso, foram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento de análise.

3.7 CONTAGEM ABSOLUTA DOS LINFÓCITOS T

A contagem de células da subpopulação de linfócitos T CD4+ e CD8+ periféricas foram realizadas por citometria de fluxo, a partir de amostras de sangue colhidas com EDTA, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD45, anti- CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (BD Mult*TEST*), conjugados aos fluorocromos. Cinqüenta microlitros de sangue total foram incubados com 20 µL do reagente Mult*TEST*(*BD Biosciences,*

San Diego, CA, EUA). Após incubação de 15 minutos, as amostras foram lisadas por adição de 450 µL de solução *BD FACS Lysing*. Após nova incubação por 15 minutos, a aquisição foi realizada em citômetro*BD FACSCanto II* (BD) por meio do *software MultiSet*(BD). Os valores (células/mm3) destas populações celulares foram calculados com base em *beads* de referência presentes nos tubos empregados para os testes (*BD TruCount Tubes*, BD).

3.8 GENÓTIPO DO VHC E BIÓPSIA HEPÁTICA

Os dados foram obtidos a partir de exames laboratoriais de rotina requeridos em atendimento ambulatorial e armazenados no banco de dados da Base Digital para Verificação de Exames Laboratoriais do Hospital das Clínicas da FMUSP (Sistema HCmed) ou dos prontuários dos pacientes.

3.9 IDENTIFICAÇÃO DO RNA DO VHC EM PBMC

A extração de RNA viral a partir de células será realizada utilizando o kit QIAamp® Viral RNA Mini, que por eluição purifica o RNA viral. Este kit fornece um método fácil e rápido para a purificação de RNA viral, que pode ser utilizado em diversas tecnologias de amplificação. O RNA viral pode ser obtido de plasma, soro e células de fluídos corpóreos. As amostras devem ser frescas ou congeladas. Se congeladas as amostras elas poderão ser utilizadas, desde que não tenham sido submetidas ao processo de descongelamento mais que uma vez, já que isto pode diminuir o título viral e deve ser evitado para otimizar a sensibilidade do método.

Em um tubo de 1,5 mL devidamente identificado, foram adicionados 560 µL de Buffer AVL e 140 µL de amostra e em seguido foi agitado no vórtex por 15s. Após a agitação, foi realizada uma incubação a temperatura ambiente (15 a 25ºC) por 10 minutos.

Ao final da incubação, uma rápida centrifugação é necessária para remover gotas que podem ter ficado retidas na tampa do tubo, e em seguida foram

adicionados 560 µL de etanol (96-100%) à amostra que foi agitada no vórtex por 15 segundos. Novamente realizou-se uma rápida centrifugação.

Todo o conteúdo da amostra foi transferido para a coluna e o tubo foi centrifugado por 1 minuto. Duas lavagens foram realizadas para a eliminação de resíduos. Após as lavagens, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL. Foram adicionados à coluna 60 µL de Buffer AVE (que por eluição separa os componentes, sendo que as moléculas de interesse são adsorvidas a coluna), e após 1 minuto de incubação a temperatura ambiente foi realizada uma centrifugação de 1 minuto. Assim, o RNA purificado se solta da coluna.

3.10 QUANTIFICAÇÃO DE RNA-VHC

A quantificação de RNA foi realizada utilizando o fluorímetro Qubit® da empresa Invitrogen™. O Qubit é um fluorímetro de bancada que pode quantificar DNA, RNA e proteína, utilizando uma fluorescência ultra-sensível e precisa. O cálculo da quantificação é baseado na relação de dois padrões utilizados na calibração do aparelho, gerando um ajuste de curva algorítmica. Com o Qubit® RNA HS Assay Kit foi realizada a quantificação no Qubit®.

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 196 µL da Working Solution (194 µL de Qubit® RNA Buffer, e 2µL de Qubit® RNA Reagente) juntamente com 4 µL do RNA extraído e agitou-se no vórtex por 15 segundos. Após 2 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi realizada a quantificação pelo aparelho. Com esse kit, a leitura do aparelho pode variar entre 250pg/µL a 100 ng/µL de RNA por amostra.

3.11 ANÁLISE DA PRESENÇA/AUSÊNCIA DO RNA VHC EM PBMC POR PCR EM TEMPO REAL

A identificação da presença/ausência do RNA-VHC em PBMC foi realizada a partir das amostras de células com RNA purificado. Foram sintetizados dois primers

e uma sonda para a detecção ou não do VHC em PBMC, seguida da reação de PCR em tempo real, sistema *TaqMan*, no termociclador Applied Biosystems StepOne™.

As reações foram realizadas de acordo com o seguinte procedimento: 12,5 µL de TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix, 4,0 µL de Genotyping Assay® (primers e sonda VIC), 3,5 µL de água e ao final foram adicionados 30 µL de RNA purificado. Os parâmetros (tempo de hibridação e extensão, temperaturas de desnaturação, hibridação e extensão, e o número de ciclos) foram testados e otimizados no termociclador Applied Biosystems StepOne™.

As condições em que ocorreram as reações foram as seguintes:

- um ciclo de transcrição reversa de 50ºC por 5 minutos;
- inativação da transcrição reversa a 95ºC por 20 segundos;
- seguidos de 46 ciclos de: desnaturação a 95ºC por 15 segundos, pareamento a 60ºC por 1 minuto.

3.12 ANTÍGENOS DO VHC PARA ESTIMULAÇÃO DAS PBMCs

Para a estimulação celular nos ensaios ELISpot, FOI sintetizado um pool de péptideos em overlapping de 11aa, baseados na sequência do genótipo 1a do VHC (NIH AIDS Reference and Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: HCV 1a H77 Peptides), localizados na região estrutural (Core e E2) e na região não estrutural do vírus (NS3, NS4 e NS5), cobrindo toda a região codificada do VHC . Estes epítopos virais são consideradas os mais imunogênicos, dentro do genoma viral (Schulze zur Wiesch et al., 2005, Aberle et al., 2006). Da região de NS, a NS3 e NS4 são correspondentes a uma das regiões mais conservadas, enquanto, NS5 é um epítopo mais heterogêneo (Hijikata et al., 1991). Os peptídeos foram usado na concentração final de 2 mg/mL. Estes antígenos foram devidamente testados e padronizados para garantir a estimulação adequada das células utilizadas no ELISpot

Tabela 1: Relação da síntese do pool de peptídeos, baseados na sequência do genótipo 1a do VHC , localizados na região estrutural (Core e E2) e na região não estrutural do vírus (NS3, NS4 e NS5.

Identificação peptídeo	Proteína VHC	Sequência	Concentração	Purificação
PS57763-1	Core	DVKFPGGGQIVGGVYLLPRR-NH2	10.7mg	97,41%
PS57763-2	Core	VGGVYLLPRRGPRLG-NH2	10.5mg	98,90%
PS57763-3	Core	GAPLGGAARALAHGV-NH2	10.4mg	98,43%
PS57763-4	E2	GFATQRLTSLFALGPSQK-NH2	10.7mg	96,18%
PS57763-5	NS3	PAAYAAQGYIKVLVLNPSVAA-NH2	10.2mg	92,47%
PS57763-6	NS3	GYKVLVLNPSVAAT-NH2	10.2mg	98,78%
PS57763-7	NS3	GYKVLVLNPSVAATLGFGAY-NH2	10.1mg	90,23%
PS57763-8	NS3	VLVLNPSVA-NH2	10.2mg	96,15%
PS57763-9	NS3	VIKGGRHLIFCHSKKKCD-NH2	10.1mg	90,94%
PS57763-10	NS3	GINAVAYYRGLDVSVI-NH2	10.2mg	91,59%
PS57763-11	NS3	TPAETIVRLRAYMNTPGLPV-NH2	10mg	92,25%
PS57763-12	NS3	LRAYMNTPGLPVCQDH-NH2	10.2mg	98,17%
PS57763-13	NS3	ENLPYLVAYQATVCARAQAP-NH2	10.2mg	90,79%
PS57763-14	NS4a	VVLSGKPAIIPDREVLYREF-NH2	10.2mg	91,13%
PS57763-15	NS4b	IAPAVQTNWQKLETFWAKHM-NH2	10.3mg	90,79%
PS57763-16	NS4b	NFISGIQYLAGLSTLPGNPA-NH2	10.1mg	92,27%
PS57763-17	NS4b	GIQYLAGLSTLPGNPAIASL-NH2	10.2mg	90,70%
PS57763-18	NS4b	TLLFNILGGWVAA-NH2	10.1mg	90,69%
PS57763-19	NS4b	GPGEGAVOWMNRLIAFASRG-NH2	10.3mg	95,47%
PS57763-20	NS5a	VSVPAEILRKSRRFA-NH2	10.5mg	93,70%
PS57763-21	NS5b	KGGRKPARLIVFPDLGVRVC-NH2	10.3mg	93,16%
PS57763-22	ND5b	ARMILMTHFFSVLIARDQLE-NH2	10.3mg	92,84%
PS57763-23	NS5b	CGKYLFNWAVRTKLK-NH2	10.3mg	94,92%
PS57763-24	NS5b	CGKYLFNWAVRTKLKLTPIA-NH2	10.3mg	92,28%

3.13 ESTUDO DA FUNÇÃO DOS LINFÓCITOS POR ELISPOT

A função dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ foram avaliadas através da técnica ELISPOT. O Kit Human IFN-gamma/IL-4 Dual-Color FluoroSpot. Inicialmente, a membrana de PVDF foi pré molhada com etanol 70% e lavada com PBS três vezes antes da adição da solução de captura em cada poço. A placa foi incubada a 4°C overnight. A placa no dia seguinte foi lava com PBS e foi adicionado em cada poço a solução com os antígenos previamente preparados. Após serem descongeladas, as PBMCs foram ajustadas para 300.000 células / poço, em meio CTL-Test ™, e

adicionadas em cada poço e incubada 37°C em uma incubadora humidificada, 5-9% de CO_2 durante 48 horas. A placa após o período de estimulação celular, foram lavadas duas vezes com PBS e depois duas vezes com 0,05% de Tween-PBS e foi adicionado em cada poço solução de detecção IFN-γ/IL-4. Incubar a placa por 2 horas em temperatura ambiente. A placa foi lavada três vezes com 0,05% de Tween-PBS e adicionada à solução de terciária. Incubar a temperatura ambiente, 1hora. A placa foi decantada e lavada por três vezes com água destilada e secou durante 24 horas em temperatura ambiente. A contagem dos spots foi realizada em um leitor automatizado CTL-ImmunoSpot® S6 FluoroSpot Line (Cellular Technology Limited – CTL). Foi possível observar a formação de manchas (spots) para indicar a presença de IFN-γ/IL-4 das células secretoras. Cada spot representa uma célula secretora individual. Para controle negativo foram usada 10 amostras de PBMCs de anti-VHC-negativos saudáveis e testados com proteínas do VHC e mistura de peptídeos do VHC.

Para elucidar qual fração celular produziu a resposta anti-VHC específica, as PBMCs foram fracionadas e depletadas, utilizando-se o Kit Dynabeads FlowComp Human CD4 (Invitrogen Life Technologies) segundo as instruções do fabricante, das células CD4+ e CD8+ que também foram testadas no ensaio ELISpot.

3.14 METODOLOGIA APLICADA À ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.14.1 Regressão Linear

A regressão linear investiga e modela a relação entre uma resposta (Y) e uma preditora (X). A resposta deve ser contínua, no entanto podemos ter preditoras tanto contínuas quanto categóricas. Especificamente, a análise de regressão é frequentemente usada para determinar como a variável de resposta muda à medida que uma variável preditora específica muda.

3.14.2 Análise de Variância

A ANOVA com um fator pode ser utilizada para determinar se há diferenças estatisticamente significativas entre as médias de várias populações. A hipótese nula para o teste é de que todas as médias de população (médias de nível) são iguais. A hipótese alternativa é de que uma ou mais médias de população sejam diferentes das demais.

3.14.3 Teste de hipóteses para 2 amostras

Os procedimentos de teste e o intervalo de confiança do teste t para 2 amostras são usados para fazer inferências sobre a diferença entre as médias de duas populações, com base nos dados de duas amostras independentes e aleatórias dessas populações. Para usar os procedimentos do teste t para 2 amostras, as amostras devem ter distribuições normais. Se os dados da amostra não parecerem normalmente distribuídos, considerar o uso de um teste não paramétrico apropriado.

3.14.4 Teste de Kruskal-Wallis

O teste de Kruskal-Wallis possibilita fazer inferências sobre a igualdade de medianas para duas ou mais populações com base nos dados de amostras independentes, aleatórias, quando as distribuições das amostras não são normais.

Para todos os testes e análises foi utilizado o aplicativo Minitab na versão 17.1.0 Fonte: **www.minitab.com**

4. EXPECTATIVA DE RESULTADOS

Pretende-se, com a análise dos resultados deste trabalho, estabelecer parâmetros de prognóstico e resposta ao tratamento baseados na presença do VHC nas PBMCs, além de correlacionar as células TCD4+ e TCD8+ e sua produção de IL-4 e IFN gama com fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus.

Objetivamos, ainda, verificar o real significado do parasitismo prolongado dos linfócitos pelo VHC; acreditamos que esse parasitismo tenha influência (especialmente as células T CD4+), na alteração da capacidade proliferativa de células T CD4+ e TCD8+, bem como na produção alterada de citocinas liberadas por essas células, incluindo a citotoxicidade de T CD8+. Este fato pode nos levar a pensar que uma das causas pelas quais as PBMCs são incapazes de erradicar completamente o vírus sejam os defeitos funcionais determinados pelo parasitismo viral.

5. RESULTADOS

Na Tabela 2 estão apresentados os dados demográficos, clínicos, laboratoriais e os hábitos de 52 pacientes com Hepatite C crônica em condições e com indicação de serem tratados.

Tabela 2. Distribuição dos 52 pacientes com hepatite C crônica segundo dados demográficos, clínicos, laboratoriais e hábitos

Características	N	%
Gênero		
Masculino	23	44,3
Feminino	29	55,7
Etnia		
Negro	11	21,2
Não negro	41	78,8
Idade (anos)		
18 a 30	2	3,8
31 a 40	10	19,2
41 a 50	8	15,3
51 a 60	21	40,3
61 a 81	11	21,4
Genótipo Viral		
1	32	61,5
2	7	13,4
3	11	21,4
Não disponível	2	3,7
RNA-VHC PBMC pré		
Detectado	46	88,4
Não Detectado	4	7,6
Não disponível	2	4
Grau de Fibrose (METAVIR)		
F0-F2 baixo	38	73
F3-F4 alto	12	23
Não disponível	2	4
Desfecho Terapêutico (N=17)		
RVS	12	70,5
RVNS	2	11,7
NR	3	17,8
Genótipo IL28B		
T/T	18	34,6
C/T	22	42,3
C/C	12	23,1
Etilismo		
Sim	17	32,6
Não	35	67,4
Tabagismo		
Sim	13	25
Não	39	75
Uso de drogas Ilícitas		
Sim	8	15,4
Não	44	84,6

Na Tabela 3, estão relacionados os valores médios de células TCD4+ e TCD8+ assim como as células produtoras de citocinas IL-4 e Interferon gama de 17 pacientes tratados com PegIFNalfa + Ribavirina.

Tabela 3. Valores médios de CD4, CD8, IL-4 e IFN-γ em 17 pacientes tratados com IFNα+RBV em três momentos: antes, durante e após o tratamento.

	CONTROLE	**PACIENTES COM VHC**		
		PRÉ	**S12**	**FOLLOW UP**
CD4	1013,9	1342 **(p < 0,029)**	931,1 (p < 0,569)	885 (p < 0,395)
CD8	515,1	679,3 **(p < 0,056)**	369,6 **(p < 0,062)**	445 (p < 0,421)
IL-4 PBMC	4,25	2,35 (p < 0,161)	1,88 (p < 0,108)	4,7 (p < 0,780)
IL-4 CD4	7,5	7,98 (p < 0,845)	5,97 (p < 0,454)	6,16 (p < 0,522)
IFN γ PBMC	286,45	304,5 **(p < 0,009)**	310,4 **(p < 0,005)**	266,9 **(p > 0,014)**
IFN γ CD4	270,7	279,5 (p < 0,408)	271 (p < 0,979)	257,6 (p < 0,240)

Na Tabela 4 temos os valores da Carga Viral isto é, determinação quantitativa do RNA-VHC em 17 pacientes tratados com PegIFNalfa+RBV antes, durante e após o tratamento e o resultado virológico do tratamento.

Tabela 4. Carga viral antes, durante e após tratamento e resultado final do tratamento em 17 pacientes que receberam PegIFNalfa+RBV

N^{o} Paciente	**Pré Tratamento**	**Semana 12**	**Follow up**	**Resposta tratamento**
1	6,71	1,61	4,68	RVNS
2	3,21	ALD	ALD	RVS
4	4,69	ALD	ALD	RVS
5	6,17	2,31	ALD	RVS
6	5,28	3	DI	NR
10	DI	ALD	ALD	RVS
11	5,21	ALD	ALD	RVS
12	4,6	ALD	ALD	RVS
13	DI	DI	DI	RVS
17	4,17	ALD	ALD	RVS
18	6,14	ALD	ALD	RVS
19	6,02	DI	4,29	RVNS
20	5,78	DI	DI	NR
21	7,03	ALD	ALD	RVS
23	6,54	ALD	ALD	RVS
26	5,73	4,09	5,42	NR
27	4,97	DI	ALD	RVS

DI, dado indisponível; **ALD**, abaixo do limite de detecção; **RVS**, resposta virológica sustentada; **RVNS**, resposta virológica não sustentada; **NR**, não respondedor.

Quanto ao PCR do VHC nas células CD4 e CD8, apenas 4 entre 52 pacientes com Hepatite crônica por VHC apresentaram resultados não detectados (pacientes 12, 24, 39 e 44). Esses resultados negativos podem ter três explicações: falta de sensibilidade do método, inativação dos ácidos nucleicos pela manipulação das culturas das células ou ausência real do RNA-VHC nas células, o que julgamos pouco provável.

Nas Figuras 6 e 7 abaixo, mostramos alguns casos ilustrativos dos resultados das contagens de células CD4 e CD8 em citômetro de fluxo e as células produtoras de IL-4 e Interferon gama pelo Elispot.

1 2 3 4

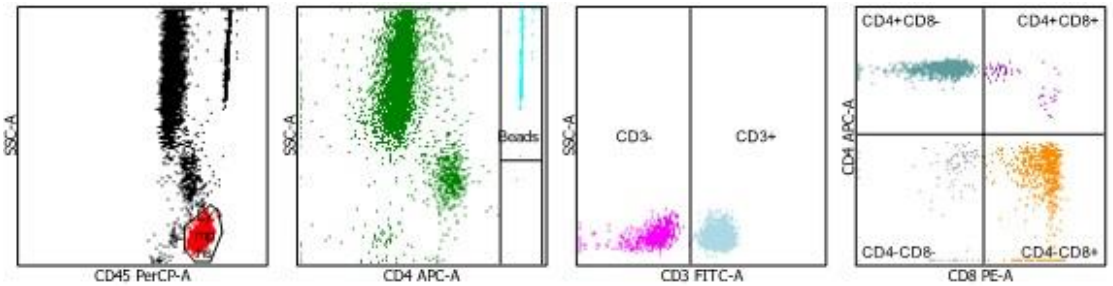

Figura 6. Representação por dot blot da contagem absoluta de linfócitos T CD4 e T CD8 de pacientes com Hepatite C crônica analisada por Citometria de Fluxo. Placa 1 representa a separação das células por tamanho e granulosidade com o gate identificando apenas células CD45+; Placa 2 representa a identificação das células T CD4; Placa 3 representa a separação das células que não expressam CD3 e células CD3+; placa 4 representa a identificação das células CD4+ e CD8-, CD4+ e CD8+, CD4- e CD8+, CD4- e CD8-.

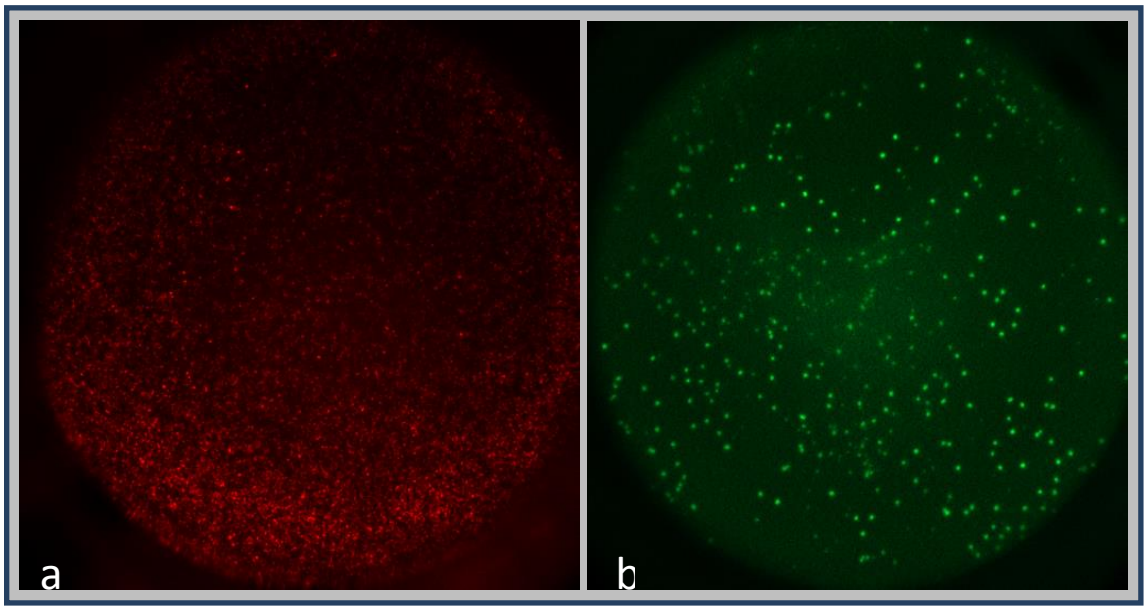

Figura 7. Imagens geradas pelo aparelho ImmunoSpot® em ensaio baseado em fluorescência, após a leitura da placa de Elispot, em pacientes com Hepatite C crônica. **A**: demonstra células mononucleares (CD4+ e CD8+) que produziram IL-4, cor vermelha; **B**: demonstra células mononucleares (CD4+ e CD8+) que produziram IFN-γ, cor verde.

5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICA

Todos os gráficos apresentados a seguir dizem respeito a valores cuja análise estatística mostrou resultados significantes.

Os resultados das análises estatísticas em relação ao número de linfócitos TCD4+ e TCD8+ obtidos dos pacientes do Grupo 2 (tratados) antes, durante e após o tratamento, podem ser verificados nos Gráficos 1 e 2.

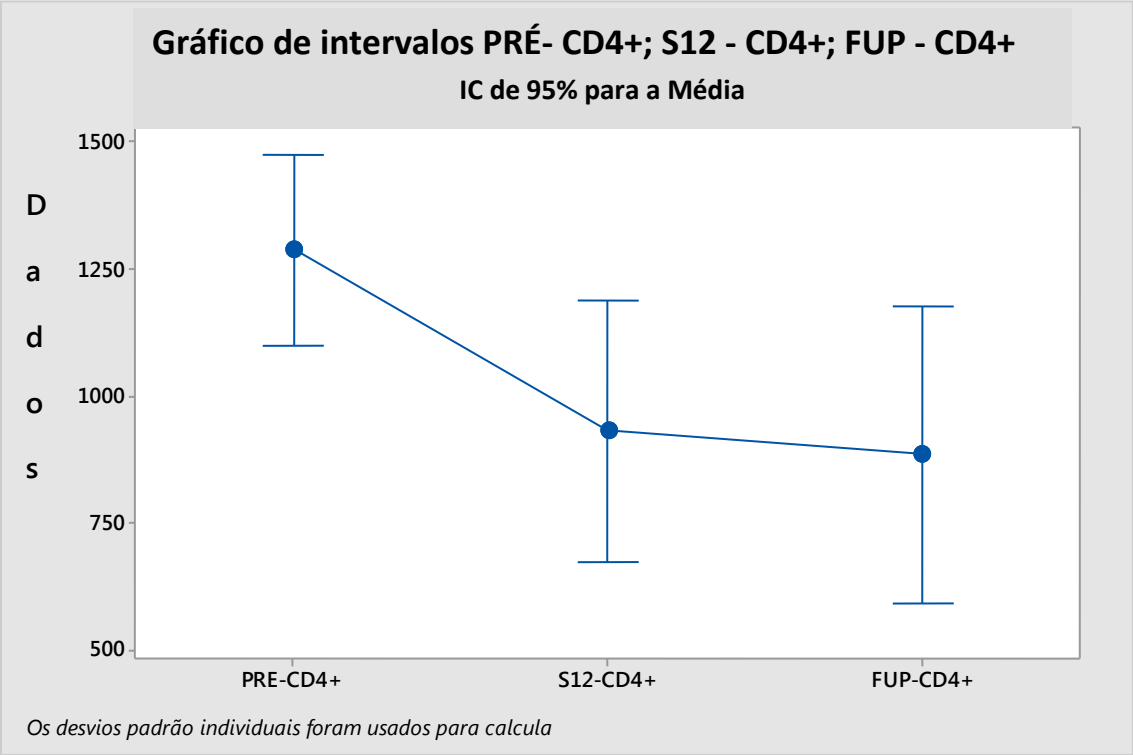

Gráfico 1 – Valores das médias de células TCD4+, nos pacientes do Grupo 2 antes, durante e após o tratamento .

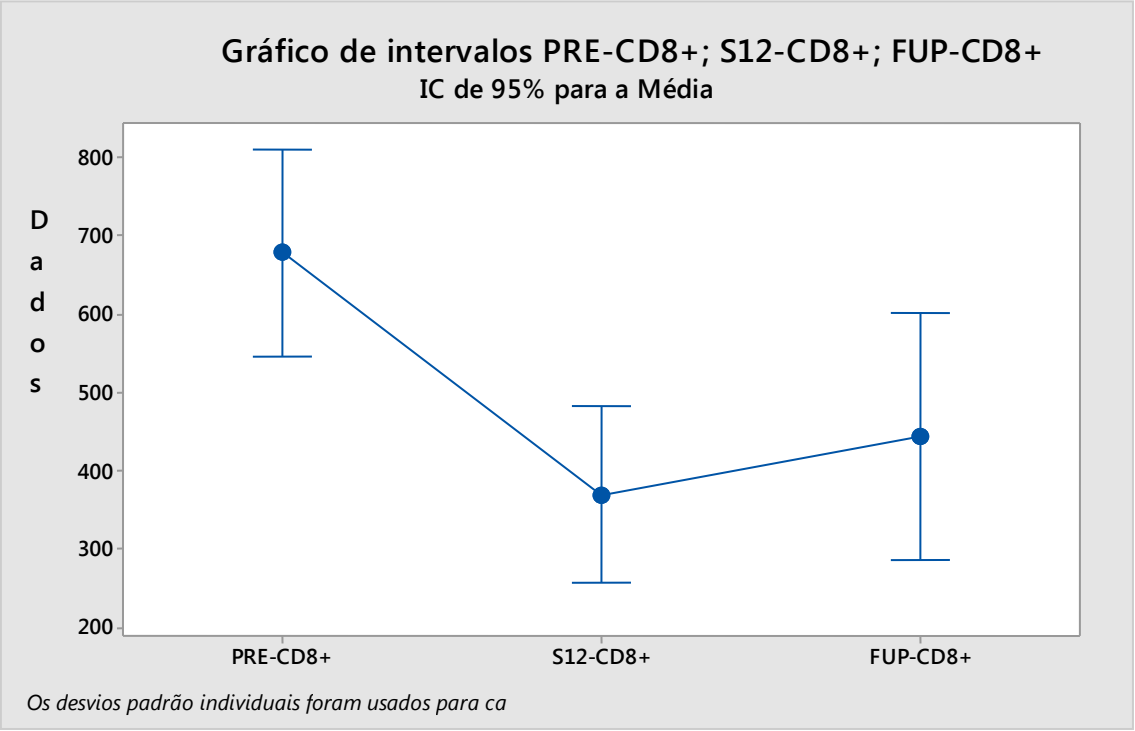

Gráfico 2 – Valores das médias de células TCD8+, nos pacientes do Grupo 2 antes, durante e após o tratamento .

A análise desses gráficos mostra claramente que o número de linfócitos CD4 e CD8 apresentam uma queda importante na semana 12 (estatisticamente significante), tendendo a aumentar no follow up. Já a avaliação da função desses linfócitos, no que diz respeito à produção de IL-4 e Interferon gama nos mesmos períodos, pode ser observada nos resultados visualizados nos gráficos 3, 4 e 5, onde verificamos a produção de IL-4 pelos dois tipos de células diminuindo na semana 12 e aumentando no follow up, enquanto ocorre o contrário com a produção de IFN gama. Já as células CD4 apresentam queda progressiva de IFN gama ao longo do tratamento.

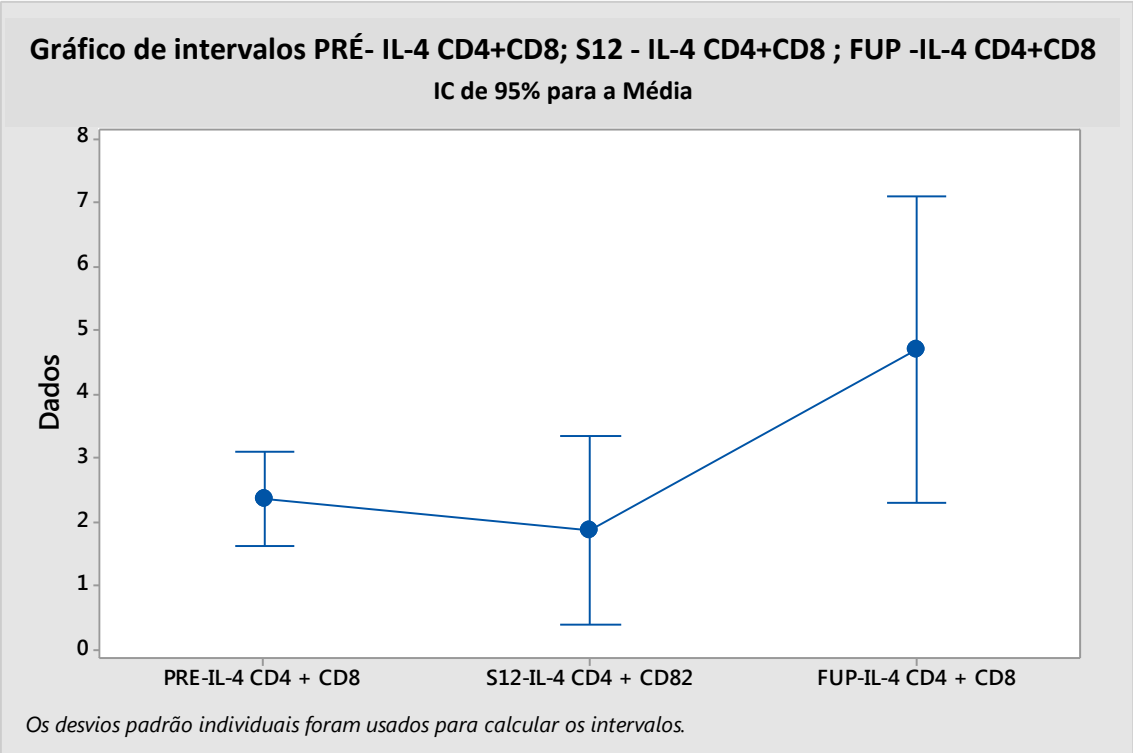

Gráfico 3- Valores médios de células produtoras de IL-4 pelas células CD4+ e CD8+ em três momentos: antes (pré), durante (s12) e depois (FUP) do tratamento.

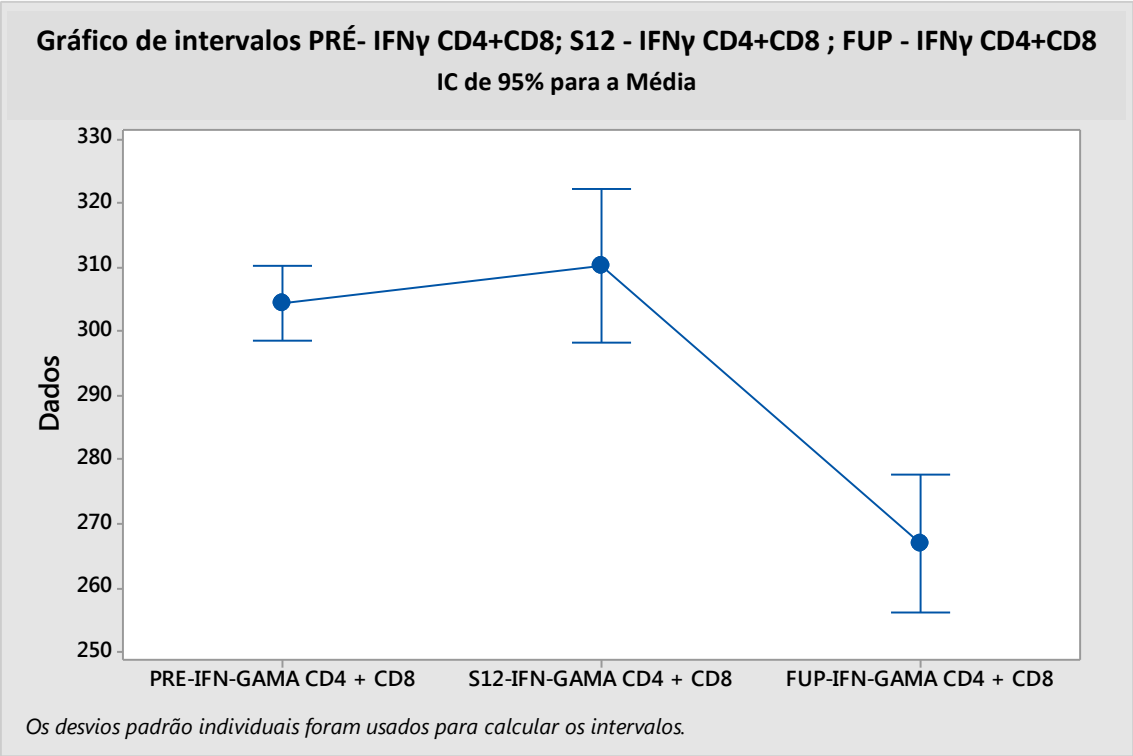

Gráfico 4- Valores médios de células produtoras de IFN-gama pelas células TCD4+ e TCD8+ em três momentos: antes, durante e depois do tratamento.

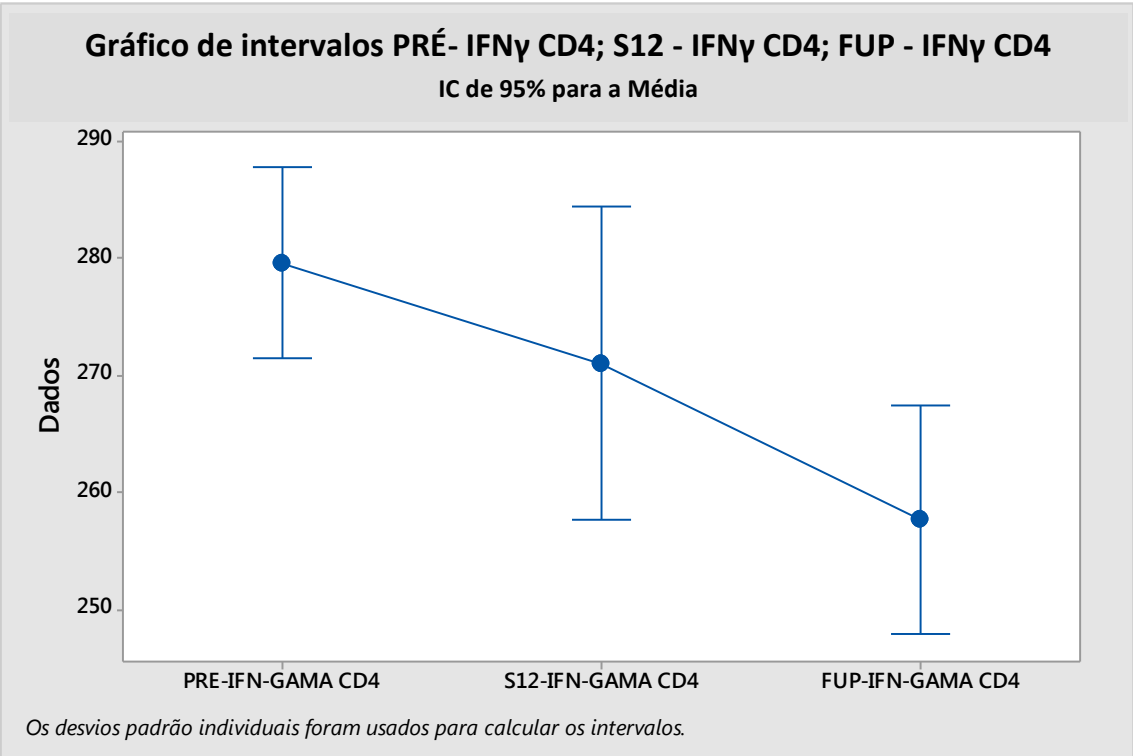

Gráfico 5- Valores médios de células produtoras de IFN-gama pelas células TCD4+ em três momentos: antes, durante e depois do tratamento.

Já em relação às células capazes de produzir IL-4 ocorre uma tendência de diminuição na semana 12 com nítido aumento no follow up. Por outro lado, as células CD4 produtoras de IFNgama, mostram uma tendência de aumento na semana 12 porém uma sensível queda no follow up, enquanto as células CD8 caem significativamente durante o tratamento e mantém essa queda no follow up. Gráficos das correlações significativas, com valor p < 0,100.

Gráficos 6 a 8 - Resultados para Grupo 1 Pacientes com Hepatite C crônica não tratados, condição PRÉ.

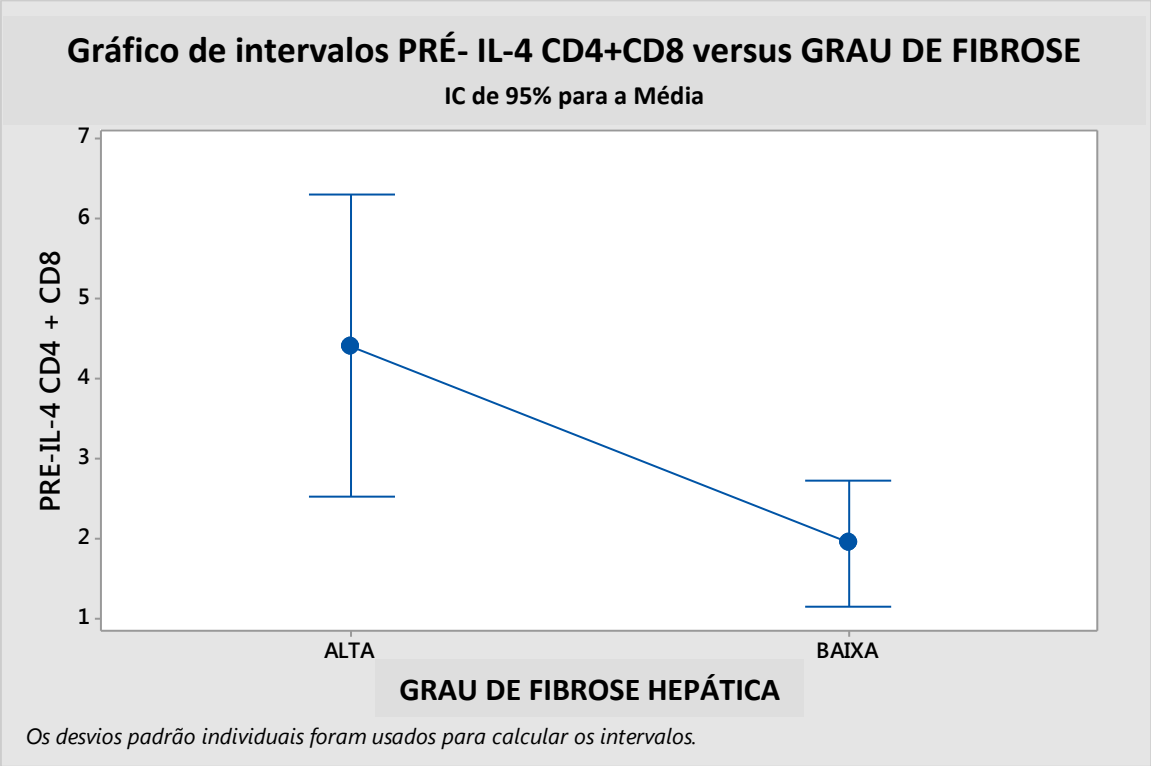

Gráfico 6 - Grau de fibrose hepática comparado com a produção de IL4 por PBMCs do grupo 1 (52 pacientes naive)

Gráfico de intervalos PRÉ- IL-4 CD4 versus GENÓTIPO VIRAL

IC de 95% para a Média

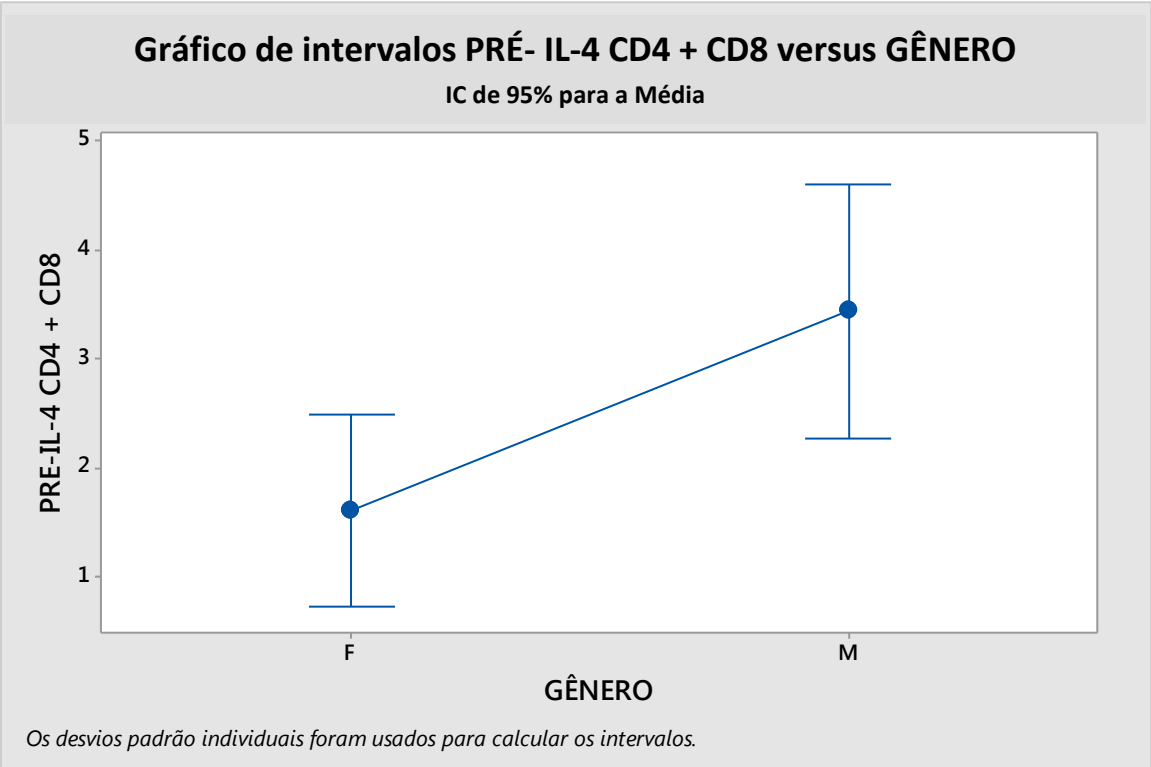

Gráfico 7 – Produção de IL4 por PBMCs comparado com o gênero do grupo 1 (52 pacientes naive)

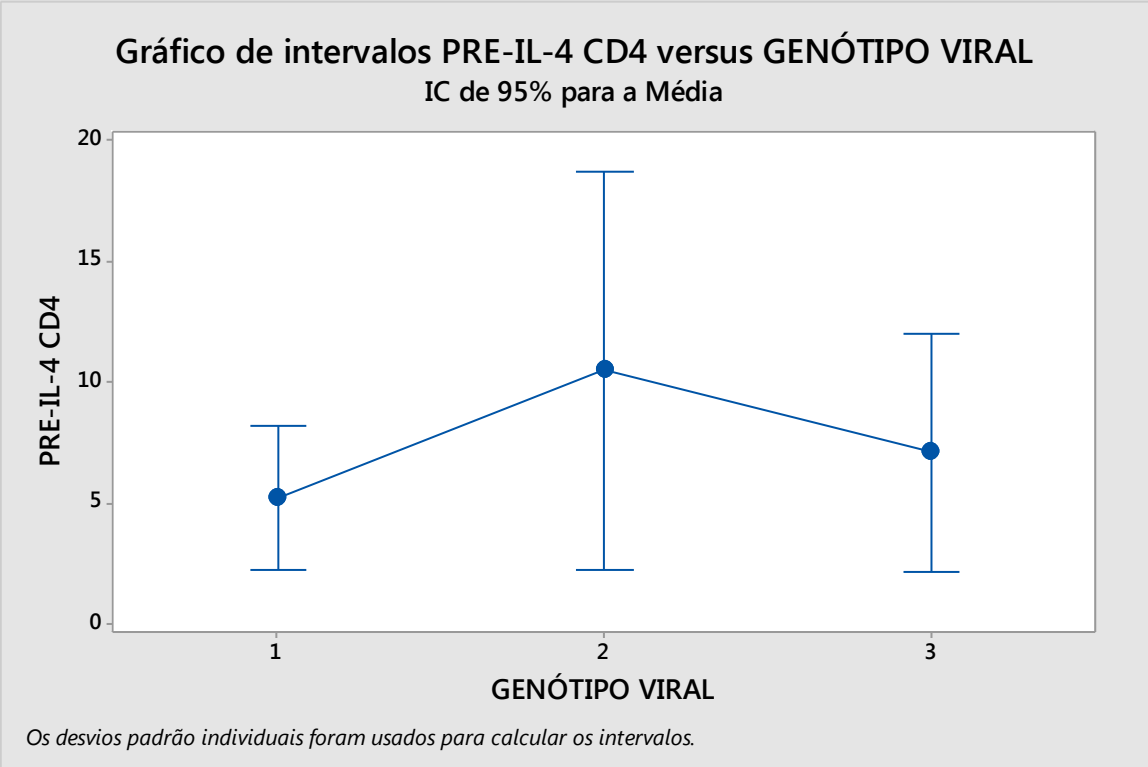

Gráfico 8 – Produção de IL-4 por células TCD4 comparada com o genótipo viral em pacientes näive.

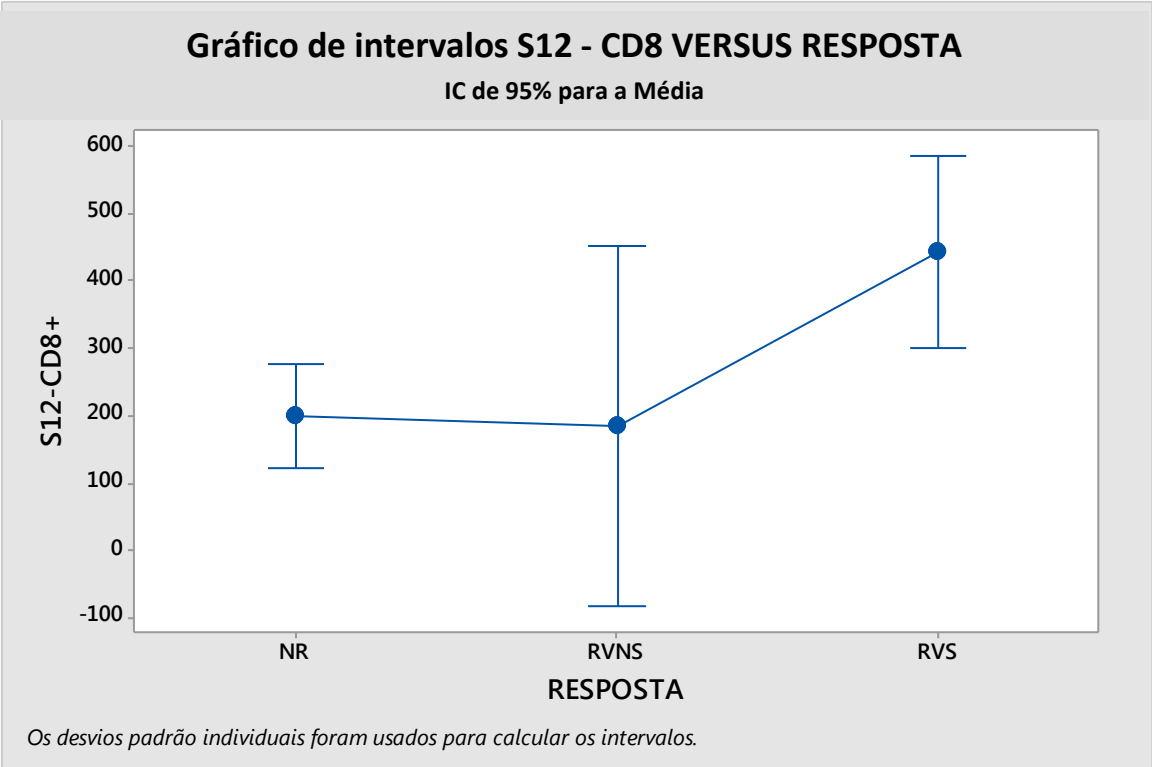

Gráfico 9 - Pacientes com hepatite C crônica tratados com amostras em 3 momentos: pré tratamento, durante e depois do tratamento. Correlação entre o número de células CD8 na semana 12 e a resposta ao tratamento.

Observa-se a correlação entre a média de células CD8 na semana 12 e a RVS com valores estatisticamente significantes.

Gráficos 10 a 12 - Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica com controle normais, condição PRÉ, todas com valores estatisticamente significantes.

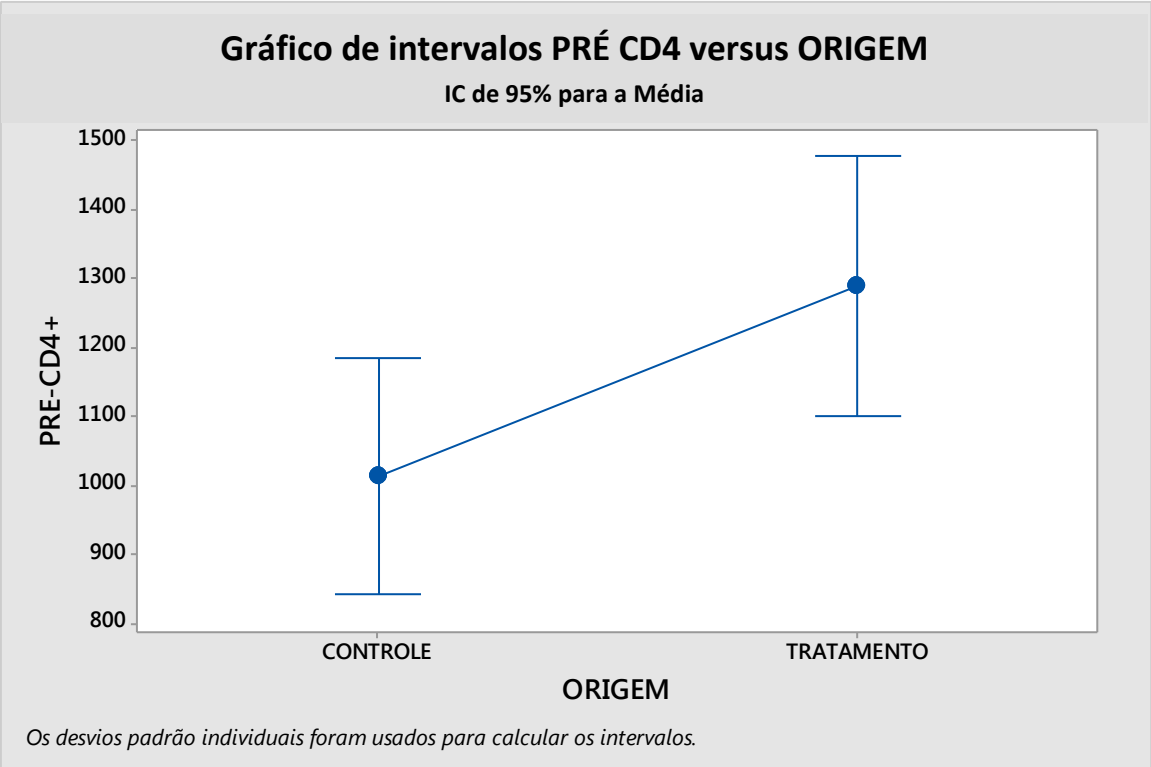

Gráfico 10 – Nível de Células T CD4+ em grupo controle normais e pacientes com Hepatite C crônica näive

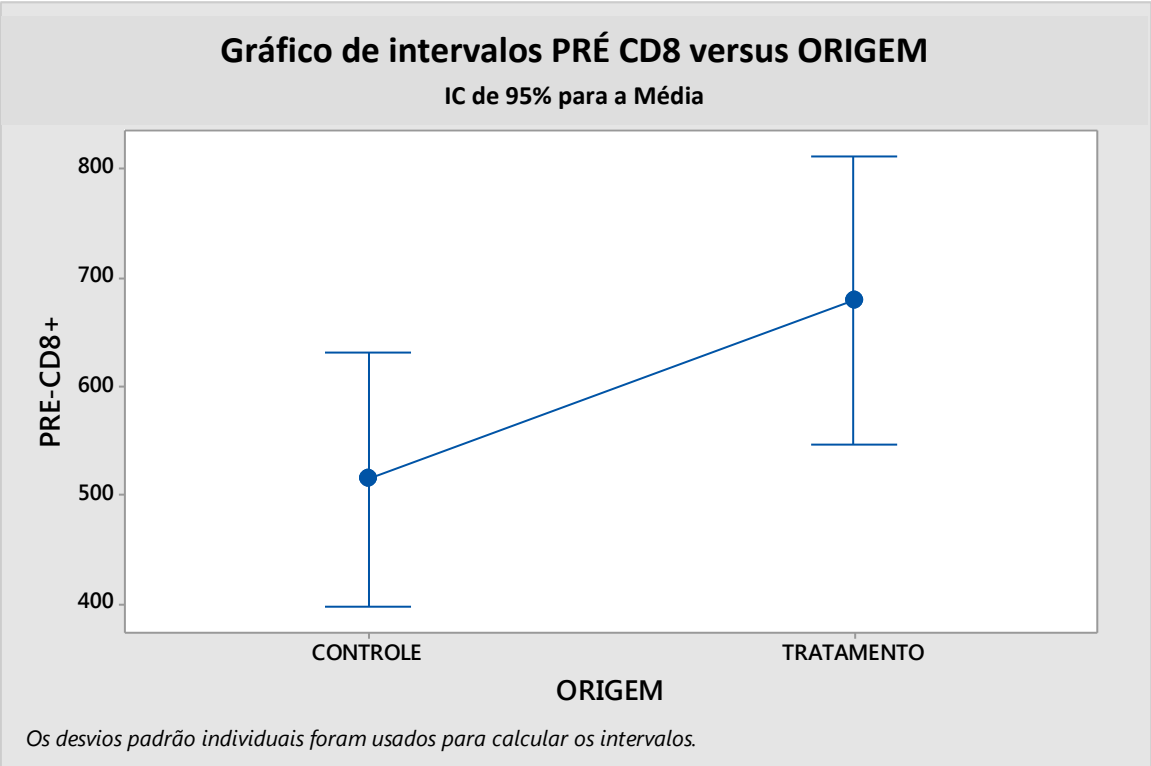

Gráfico 11 - Nível de Células T CD8+ em grupo controle normais e pacientes com Hepatite C crônica näive.

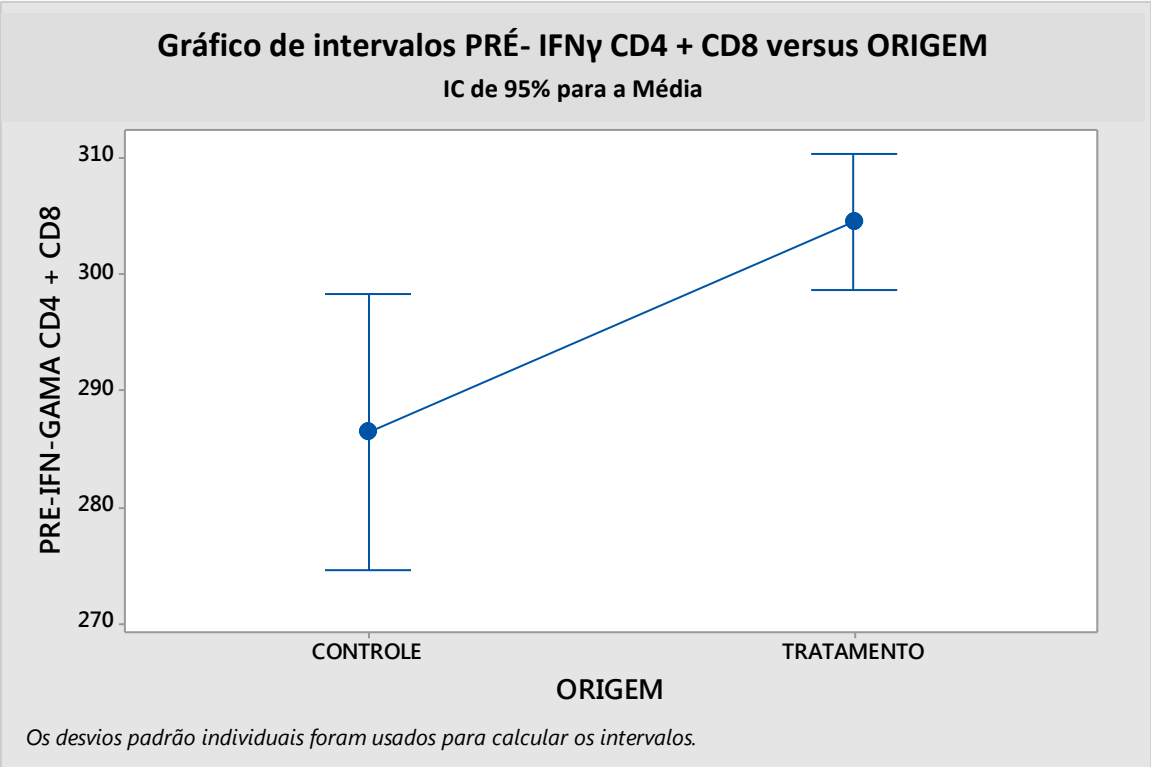

Gráfico 12 - Produção de IFN-γ de PBMCs em controles saudáveis e pacientes VHC+ näive.

Gráficos 13 e 14 - Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica com controles normais, condição SEMANA 12

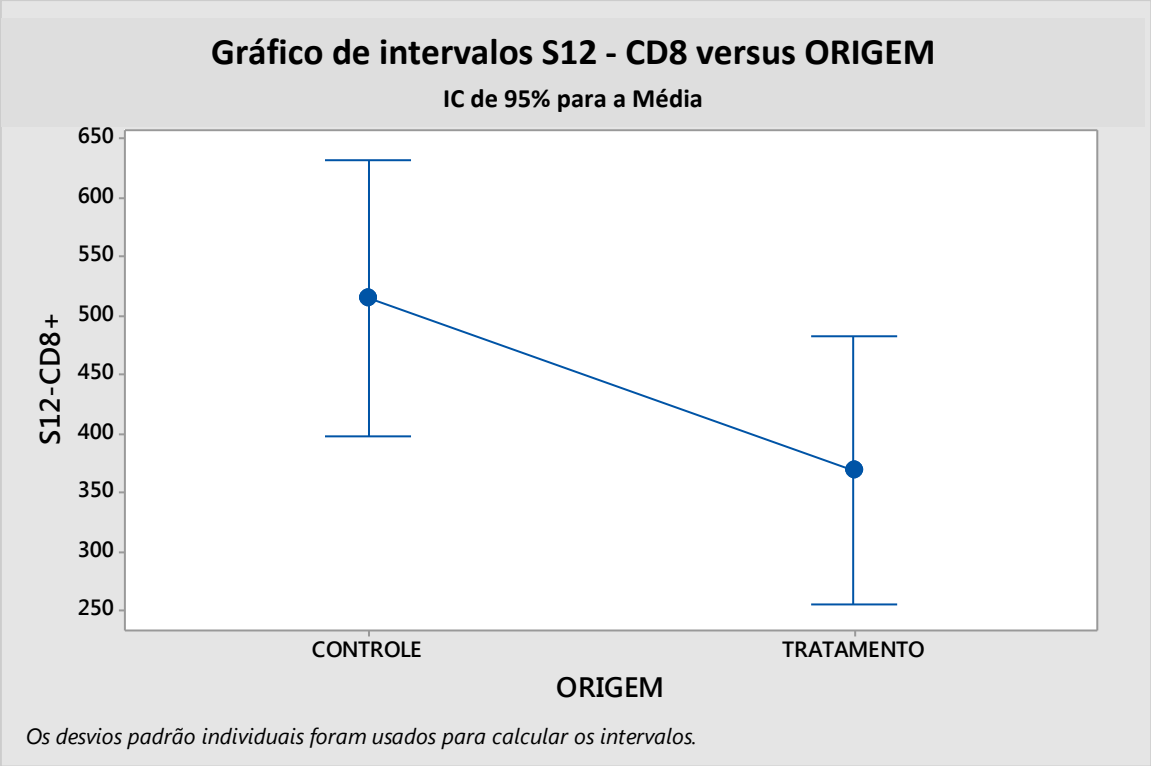

Gráfico 13 – Níveis de células T CD8+ de pacientes com Hepatite C crônica na semana 12 de tratamento com IFN e RBV e pacientes controles.

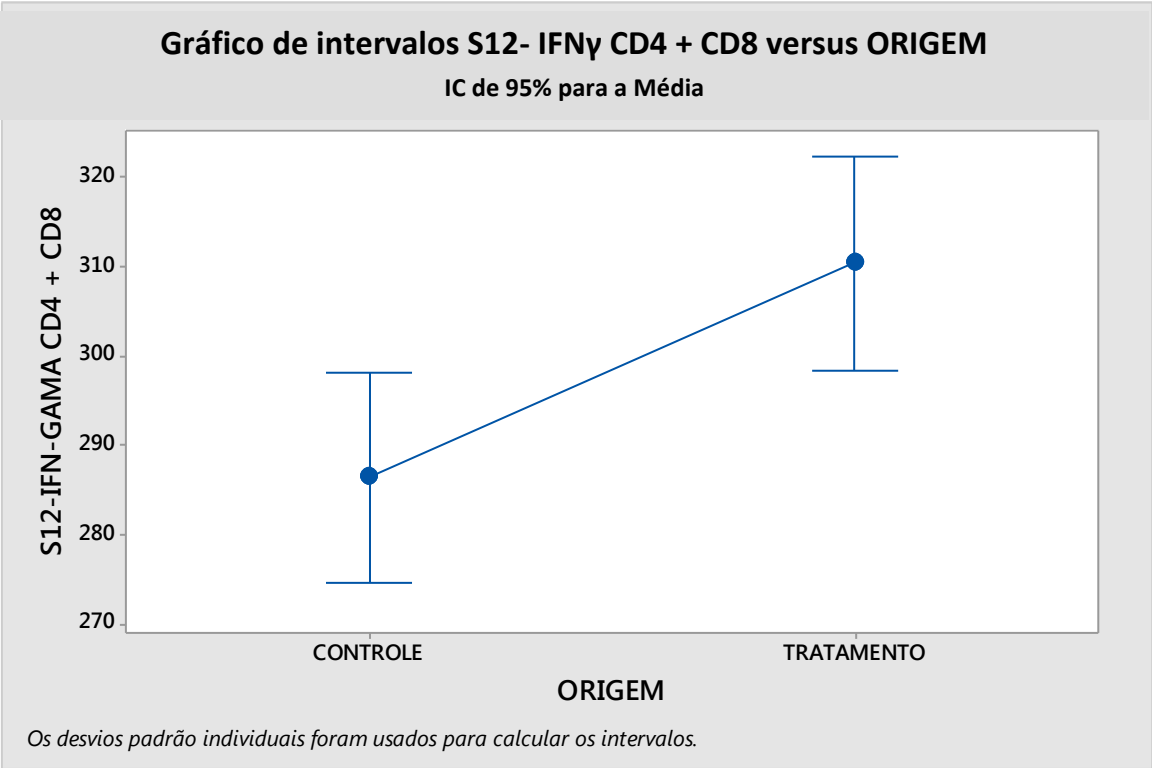

Gráfico 14 – Produção de IFN-γ por PBMCs na semana 12 de tratamento em pacientes com Hepatite C e controles.

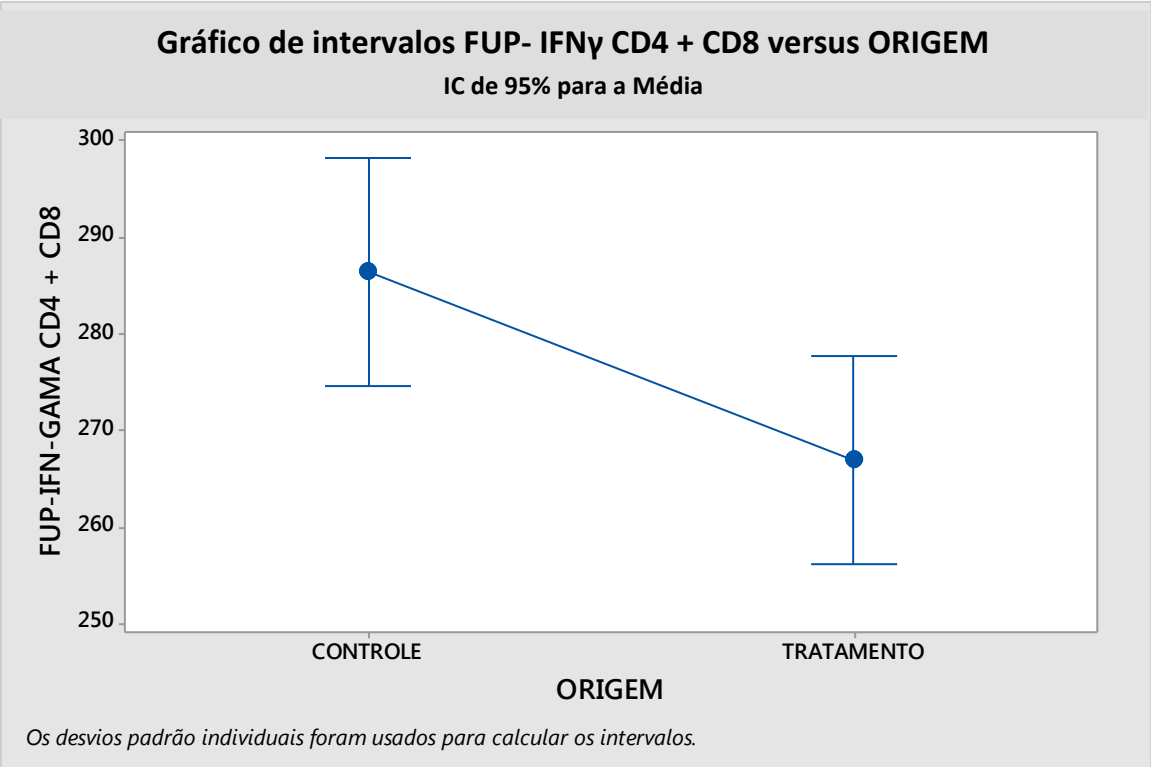

Gráfico 15 - Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica com controles normais, condição FOLLOW UP

Nos pacientes do Grupo 1, não tratados, comparamos as contagens de células TCD4+ e TCD8+ e sua produção de IL4 e Interferon gama com controles sadios, analisando sua relação com fatores do vírus (CV e genótipo) e do hospedeiro (gênero, idade, raça, IL28B e histopatologia hepática) e obtivemos os resultados que estão resumidos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados para Grupo 1 Pacientes com Hepatite C crônica não tratados.

	Grau de Fibrose	Genótipo IL28B	Genótipo Viral	Etnia	Gênero	Idade	Carga Viral PRÉ
PRÉ-CD4+	0,665	0,562	**0,052**	0,436	0,125	0,529	0,207
PRÉ-CD8+	0,662	0,178	0,786	0,556	0,618	**0,035**	0,275
IL-4 CD4+CD8	**0,029**	0,922	0,656	0,266	**0,007**	0,970	0,670
IL-4 CD4	0,224	0,311	**0,100**	0,777	0,134	0,223	0,866
IFN γ CD4+CD8	0,261	0,691	0,247	0,960	0,614	0,143	0,875
IFN γ CD4	0,907	0,791	0,702	0,910	0,367	0,710	0,712

Obs: em negrito os valores considerados estatisticamente significantes.

Tabela 6. Pacientes com hepatite C crônica tratados com amostras em 3 momentos: pré tratamento, durante e depois do tratamento.

VARIÁVEL	MOMENTO	RESPOSTA
TCD4	PRE	0,142
	SEMANA 12	0,125
	FOLLOW UP	0,127
TCD8	PRE	0,201
	SEMANA 12	**0,044**
	FOLLOW UP	0,127
IL-4 CD4+CD8	PRE	0,758
	SEMANA 12	0,379
	FOLLOW UP	0,334
IL-4 CD4	PRE	0,750
	SEMANA 12	0,170
	FOLLOW UP	0,248
IFN γ CD4+CD8	PRE	0,868
	SEMANA 12	0,697
	FOLLOW UP	0,269
IFN γ CD4+	PRE	0,839
	SEMANA 12	0,407
	FOLLOW UP	0,228

Na tabela 7, podemos observar um aumento no nível de linfócitos TCD4+ na semana antes dos pacientes iniciarem o tratamento com IFN e RBV. No entanto, o nível de linfócitos TCD8+ antes de iniciar o tratamento encontrava-se em níveis normais 679 mm^3, o que difere na semana 12 com uma queda dos valores para 369 mm^3 e uma recuperação no follow up 445 mm^3. Os valores de células mononucleares do sangue periférico produtoras de IL-4 foram menores quando comparado com os linfócitos TCD4+ isolados. Na semana pré-tratamento (baseline) as células produtoras de IFN-γ é maior quando comparado com as células CD4 isoladas (com depleção dos linfócitos TCD8+). Foi possível observar um aumento nas células produtoras de IL-4 (PBMCs) no follow up quando comparada com as outras semanas de acompanhamento dos pacientes. Os linfócitos produtores de IL4 mantem a mesma média nas três semanas que foram analisadas.

Tabela 7. Comparação de Pacientes com Hepatite C crônica que receberam tratamento com IFNalfa+RBV, em três momentos, com controles normais.

	PRE	**SEMANA12**	**FOLLOW UP**
CD4+	**(p 0,029)**	(p 0,569)	(p 0,395)
CD8+	**(p 0,056)**	**(p 0,062)**	(p 0,421)
IL4 CD4+CD8	(p 0,161)	(p 0,108)	(p 0,780)
IL4 CD4+	(p 0,845)	(p 0,454)	(p 0,522)
IFN γ CD4+CD8	**(p 0,009)**	**(p 0,005)**	**(p 0,014)**
IFN γ CD4+	(p 0,408)	(p 0,979)	(p 0,240)

6. DISCUSSÃO

O vírus da Hepatite C é bem conhecido pela sua propensão de estabelecer infecção crônica em mais de 70% de adultos imunocompetentes infectados. Diferentemente do HIV, o VHC não se integra ao genoma do hospedeiro e diferentemente do VHB, o VHC não forma um minicromossoma viral (cccDNA) para garantir a sua persistência. Em vez disso, a habilidade de persistência do VHC é baseada na sua capacidade de interagir, suprimir ou evadir-se de mecanismos imunes, dos quais normalmente se espera a eliminação das células infectadas por vírus. Esse processo começa em um longo período de incubação de cerca de oito semanas, durante o qual o VHC mantém altos títulos no sangue a despeito da ativação da imunidade inata. O VHC aparenta não ser reconhecido pelo sistema imune adaptativo até que células T VHC-específicas e a resposta de anticorpos apareçam 8 a 12 semanas após a infecção.

Entretanto, ao contrário do HIV, 20 a 30% dos pacientes com infecção aguda pelo VHC são capazes de erradicar o vírus espontaneamente. O *clearance* espontâneo está associado com a resposta imune adaptativa e com polimorfismos simples de nucleotídeos (SNPs) próximos ao gene IFN lambda, na região IL28B; esses SNPs são também fortes preditores da resposta induzida pelo tratamento. O clareamento espontâneo do VHC ocorre quase exclusivamente no primeiro ano, usualmente nos primeiros seis meses da infecção, enfatizando mais uma vez que o vírus ganha uma vantagem crucial sobre o sistema imune do hospedeiro a medida que o tempo passa. Várias pesquisas *in vitro* e algumas pesquisas *in vivo* tem mostrado diferentes mecanismos pelos quais o VHC atua sobre a resposta imune do hospedeiro. É possível que uma das causas desse fenômeno seja a disfunção das células T (CD4+ e CD8+) em função de seu parasitismo pelo vírus da Hepatite C.

Pretendemos, com este trabalho, verificar a influência do parasitismo das células mononucleares do sangue periférico pelo vírus da hepatite C. É nossa hipótese, ainda não demonstrada de maneira definitiva *in vivo* na literatura, que a função das PMBC na infecção pelo VHC estaria comprometida, sendo um dos fatores da altíssima ocorrência de evolução para a cronicidade da infecção do hospedeiro humano pelo VHC. Objetivamos, ainda, verificar se esse parasitismo tem alguma influência (especialmente as células T CD4+) na diminuição da capacidade proliferativa de células T CD4+ e TCD8+, bem como na produção insuficiente de

citocinas liberadas por essas células, incluindo citotoxicidade reduzida de T CD8+. Este fato nos leva a pensar que as PBMCs podem ser incapazes de erradicar completamente o vírus devido aos seus defeitos funcionais.

Outro objetivo seria verificar a influência de diferentes fatores relacionados ao VHC (genótipo, carga viral) e ao hospedeiro (idade, gênero, raça, polimorfismo IL28B, histopatologia hepática) na função das PMBC em vigência de infecção por esse vírus.

Para a consecução desses objetivos, foram estudados 52 pacientes com hepatite crônica pelo VHC e com parasitismo comprovado por PCR das células mononucleares do sangue periférico e 10 controles sadios. Dezessete desses pacientes foram tratados com PegIFNalfa + Ribavirina, sendo estudados em três momento: antes, durante e após o tratamento. As células TCD4+ e TCD8+, após serem quantificadas e mantidas em cultura, foram estimuladas por antígenos do VHC e sua resposta foi avaliada através da produção de duas interleucinas: IFN-γ e IL-4. Através do Elispot foi realizada a leitura e a quantificação das células produtoras das citocinas produzidas, possibilitando então a comparação da função dessas células nas diferentes situações propostas e com os controles.

Neste trabalho, resolvemos analisar uma citocina proinflamatória, o IFN-γ, e uma citocina antinflamatória, a IL-4. As duas citocinas IL-4 e IFN-γ desempenham funções importantes na geração e regulação das respostas imunes. Aspecto nuclear dessas ações diz respeito as suas mútuas funções antagonista. Primeiro IL-4 promove a diferenciação e estabilidade de células Th2 e inibe a diferenciação de células Th1. Já o IFN-γ tem função de inibir a diferenciação de células Th2 e a estabilização de células Th1. Segundo, IL-4 e IFN-γ também afetam a mudança de classes de anticorpos e a expressão de receptores Fc diferencialmente, o que afeta fortemente os mecanismos efetores que seguem a produção de anticorpos. Terceiro, atividades dos macrófagos induzidas ou exacerbadas pelo IFN-γ, assim como a expressão de certas citocinas, moléculas de superfície e enzimas são antagonizadas pela IL-4. Em conjunto, essas funções de IL-4 e IFNgama IFN-γ colocam essas duas citocinas em posições cardeais na regulação das reações imunes.

É, todavia importante ressaltar que a grande maioria dos trabalhos nessa área (VHC e PMBC) tem sido realizada *in vitro.* Esta é uma das poucas pesquisas realizadas em humanos, com casuística relativamente grande de pacientes acompanhados em nossos ambulatórios e que pretende não só corroborar algumas

das premissas estabelecidas na bancada como também trazer novas informações sobre a influência da infecção dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ pelo VHC.

Inúmeras pesquisas tem mostrado uma relação entre a infecção crônica pelo VHC e os subtipos de linfócitos no sangue periférico. Linfócitos representam as principais células imunes e realizam a base da resposta imune do hospedeiro; a sua contagem em números relativos pode refletir o nível da imunidade. Trabalhos tem mostrado um aumento do número de células TCD8+ e uma diminuição de células TCD4+, assim como da relação CD4+/CD8+ em pacientes com infecção crônica pelo VHC, comparadas com controles normais (Huang Y et al., 2013).

Nossos resultados mostraram um aumento de células CD4 e CD8 parasitadas pelo VHC antes do tratamento, com valores estatisticamente significantes quando comparadas aos controles normais apenas no caso das CD4. Ocorreu, porém, um nítido prejuízo na produção de interleucinas por estas células parasitadas, particularmente a produção de Interferon gama, com valores altamente significantes (0,009) como vemos nas Tabelas 2 e 6 e no Gráfico 9. Ainda nesse aspecto, na Tabela 2 e nos Gráficos 10 a 14, o fenômeno se modifica na semana 12 onde podemos ver o aumento de células CD4 no pré-tratamento, porém com diminuição na semana 12 e no follow up; entretanto a produção de IL-4 pelas células CD4 aumenta na semana 12 e cai novamente no seguimento; com as células CD8 ocorre leve queda na semana 12 porém uma tentativa de recuperação no follow up; sua produção de IFN-γ cai na semana 12 e no follow up para números estatisticamente significantes. É a chamada “exaustão” de função destas células já descrita *in vitro* por alguns autores.

Trabalhos realizados *in vitro* mostram clara influência da infecção dos linfócitos pelo VHC, caracterizada pela falência da resposta imune celular e inata, incluindo hiporresposta das células T helper (CD4+) e exaustão das células T citotóxicas (TCD8+); entretanto verificou-se uma função aumentada das células CD4+CD25+FOXP3 além de falência na função de células dendríticas. Apesar dessa falência influenciar negativamente os TCD4+, existe paralelamente uma estimulação de IL-2 e outras citocinas, o que muitas vezes estimula uma resposta imune desfavorável, levando a ocorrência de doenças autoimunes (Kondo & Shimosegawa, 2013), com manifestações extra-hepáticas da infecção.

Outra pesquisa recente mostra que a infecção pelo VHC modifica o fenótipo das células T, causando uma diminuição da capacidade de proliferação dos linfócitos TCD4+ (MacParland et al., 2015).

Em importante e recente revisão (Holz & Rehermann, 2015) os autores ressaltam que os mecanismos que determinam o prejuízo de função de células TCD4+ ainda permanecem parcialmente desconhecidos. O recente desenvolvimento de drogas diretamente ativas contra o VHC pode nos ajudar a responder a questão sobre qual a extensão e quais os mecanismos que levam à exaustão das células T podem ser revertidos e as funções efetoras dessas células podem ser recuperadas.

Por outro lado, inoculando células T *in vitro* com soros de pacientes em tratamento da Hepatite crônica por VHC com PegIFN+RBV, verificou-se que a resposta específica das células T durante o tratamento com terapia dupla mantém altos níveis na semana 12, naqueles pacientes que terão resposta sustentada ao contrário dos que não apresentarão RVS, nos quais a função das células T cai na semana 4 e se mantém baixa na semana 12 (Zhang et al., 2012).

Este aspecto ficou claramente demonstrado em nossos resultados *in vivo* (Gráfico 9), corroborando as observações obtidas pelos trabalhos mencionados realizados *in vitro*.

Já com relação à influência do parasitismo de células CD4 e CD8 pelo VHC sobre aspectos relacionados ao vírus e ao hospedeiro, podemos verificar nos Gráficos 6 a 8 e na Tabela 4 que o número de células CD4 assim como a produção de IL-4 é maior no genótipo 2 do que no genótipo 3 do que no genótipo1. O número de células CD8 diminui com a progressão da faixa etária, a produção de IL-4 por células CD4 e CD8 e maior nos pacientes com fibrose alta do que nos com fibrose baixa assim como é maior no gênero masculino. Todas as demais correlações não apresentaram resultados com significância estatística. Estes dados poderão ser muito úteis nas futuras observações desses pacientes que serão tratados com esquemas de DAAs sem interferon alfa.

7. CONCLUSÃO

A investigação sobre os mecanismos de resposta imunológica específica para antígenos do VHC é importante para uma melhor compreensão da epidemiologia e patogênese da infecção, bem como a eficiência de tratamento antiviral. Embora as respostas vigorosas multiespecíficas das células T CD4 + e TCD8 + estarem correlacionadas positivamente a resolução espontâneo ou induzido por tratamento, algumas questões importantes permanecem obscuras. Por exemplo: as causas da ativação imunitária específica fraca para o VHC em pacientes cronicamente infectadas, o esgotamento do sistema imune, infecção oculta e variabilidade do antígeno viral. O último é um desafio particular para desenvolver uma vacina eficaz anti-VHC. Finalmente, as questões metodológicas podem explicar diferenças e inconsistências nos resultados apresentados de resposta imune específica do VHC.

Foi possível verificar a presença do RNA-VHC em 88,4% das amostras das células mono nucleares do sangue periférico de pacientes com hepatite C crônica por RT-PCR em Tempo Real;

Foi verificado a influência de fatores do vírus e do hospedeiro, tais como genótipo 1 mais prevalente (61,5%) entre os pacientes com hepatite C crônica, confirmando com os dados encontrados na literatura; o número de células CD4+ produtoras de IL-4 foi aumentado em pacientes com o genótipo 2; em relação a idade, 40,3% dos pacientes com hepatite C crônica, tinha idade entre 51 a 60 anos; a incidência do gênero feminino com hepatite C foi observado em 55,7%, enquanto no gênero masculino 44,3%; a PBMCs produtoras de IL-4 foram mais prevalentes no grupo do gênero masculino quando comparado com o grupo feminino; a maioria dos pacientes eram não-negros (78,8%); o polimorfismo da IL28B mais prevalente foi C/T (42,3%), seguido o genótipo T/T (34,6%); no entanto, 73% dos pacientes desenvolveram até o grau de fibrose 2 e apenas 23% grau de fibrose hepática grau 3 e 4; podemos concluir que quanto maior o grau de fibrose hepática por hepatite C maior eram o numero de PBMCs produtoras de IL-4.

A função de linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico dos pacientes estudos foram prejudicadas quanto ao nível de células produtoras da citocinas IL-4 e IFN- γ, o que acreditamos influenciar na infecção crônica e dificuldade para eliminação do vírus.

A influência do parasitismo de linfócitos pelo VHC sobre a função dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ foi mostrada com um aumento de células CD4 e CD8 parasitadas pelo VHC antes do tratamento, com valores estatisticamente significantes quando comparadas aos controles normais apenas no caso das CD4. Ocorreu, porém, um nítido prejuízo na produção de interleucinas por estas células parasitadas, particularmente a produção de Interferon gama, com valores altamente significantes ($p = 0,009$).

Em conclusão, os resultados desta pesquisa confirmam a importante influência do parasitismo das células CD4 e CD8 em suas funções, na evolução da infecção persistente do hospedeiro humano pelo VHC. Com a conquista de novos tratamentos, baseados em drogas com ação antiviral direta e isento de Interferon alfa, estudos analisando a produção de diferentes citocinas poderão contribuir de maneira decisiva sobre o conhecimento nessa área.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Aberle JH, Formann E, Steindl-Munda P et al. Prospective study of viral clearance and CD4+ T-cell response in acute hepatitis C primary infection and reinfection. J Clin Virol 2006; 36: 24–31.

Afdhal N. The natural history of hepatitis C. Seminars in Liver Disease. 2004; 24: suppl.2, 3-8.

Afzal S, Idrees M, Ali M, Ilyas M, Hussain A, Akram M, Butt S, Saleem S, Rehman IU, Ali L, Shahid M 2011. Envelope 2 protein phosphorylation sites S75 & 277 of hepatitis C virus genotype 1a and interferon resistance: a sequence alignment approach. *Virol J 8(71):* 2-6.

Amon, J. J., R. S. Garfein, et al. (2008). "Prevalence of hepatitis C virus infection among injection drug users in the United States, 1994-2004." Clin Infect Dis **46**(12): 1852-1858.

Ank N, West H, Bartholdy C, Eriksson K, Thomsen AR, et al. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo. J Virol. 2006;80(9): 4501–9.

Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S*, et al.* The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. Liver Int2010,30:342-355.

Ashfaq, U. A., T. Javed, et al. (2011). "An overview of HCV molecular biology, replication and

Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. Gastroenterology. 2001;120:512–524.

Baldo V, Baldovin T, Trivello R, Floreani A. Epidemiology of hepatitis C. Current Pharmaceutical Design. 2008;14: 1646-1654.

Barone A A, Cavalheiro NP, Suematsu S. Response in patients with chronic HCV Hepatitis to treatment with Interferon-alpha. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, Salvador, 1999;3(3): 118-128

Bartenschlager, R., L. Ahlborn-Laake, et al. (1994). "Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing." J Virol **68**(8): 5045-5055.

Barth, H., A. Ulsenheimer, et al. (2005). "Uptake and presentation of hepatitis C virus-like particles by human dendritic cells." Blood **105**(9): 3605-3614.

Behrens, S. E., L. Tomei, et al. (1996). "Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus." EMBO J **15**(1): 12-22.

Bernard N. Fields, D. M. K., Peter M. Howley (2007). Fields Virology. L. W. Wilkins.

Biron, C. A. (1999). "Initial and innate responses to viral infections--pattern setting in immunity or disease." Curr Opin Microbiol **2**(4): 374-381.

Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, et al. (2000). "Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture." Science **290**(5498): 1972-1974.

Boccato S. et al. Fibrosis progression in initially mild chronic hepatitis C. Journal of Viral Hepatitis. 2006 May;13(5):297-302.

Bowen DG, Walker CM. Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. Nature. 2005 Aug 18;436(7053):946-52.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST,Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico das hepatites virais. Brasília, 2012.

Brass, V., E. Bieck, et al. (2002). "An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A." J Biol Chem **277**(10): 8130-8139.

Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1992). "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4942-4946.

Cacciarelli, T. V., O. M. Martinez, et al. (1996). "Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa." Hepatology **24**(1): 6-9.

Caetano, J., A. Martinho, et al. (2008). "Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV." J Virol **82**(15): 7567-7577.

Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection.Gut. 2005; 54(5):682-5.

Cavalheiro Nde P, Barone AA, Tengan FM. HCV serotypes in Brazilian patients. Int J Infect Dis. 2002 Sep;6(3):228-32.

Cavalheiro NdeP, Filgueiras TC, Melo CE, Morimitsu SR, de Araújo ES, Tengan FM, Barone AA. Detection of HCV by PCR in serum and PBMC of patients with hepatitis C after treatment.Braz J Infect Dis. 2007b;11(5):471-4

Cavalheiro NP. Sexual transmissionofhepatitis C. Review. Ver InstMedTropSao Paulo 2007a; 49:271-7.

Cecere, A., F. Marotta, et al. (2004). "Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different citokine profile." Panminerva Med **46**(3): 171-187.

Chang, K. M., B. Rehermann, et al. (1997). "Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the hepatitis C virus." J Clin Invest **100**(9): 2376-2385.

Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. International Journal of Medical Sciences. 2006; 3(2):47-52.

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;244(4902):359-62.

Colonna, M., G. Trinchieri, et al. (2004). "Plasmacytoid dendritic cells in immunity." Nat Immunol **5**(12): 1219-1226.

Cooper, S., A. L. Erickson, et al. (1999). "Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus." Immunity **10**(4): 439-449.

Cribier, B., C. Schmitt, et al. (1998). "Production of cytokines in patients infected by hepatitis C virus." J Med Virol **55**(2): 89-91.

Deuffic-Burban S, Poynard T, Sulkowski MS, Wong JB . Estimating the future health burden of chronic hepatitis C and human immunodeficiency virus infections in the United States. J. Viral Hepat.2007 Feb;14(2):107-15.

Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1995). "Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection." Lancet **346**(8981): 1006-1007.

Diepolder, H. M., R. Zachoval, et al. (1996). "The role of hepatitis C virus specific CD4+ T lymphocytes in acute and chronic hepatitis C." J Mol Med (Berl) **74**(10): 583-588.

Dustin, L. B. and C. M. Rice (2007). "Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C." Annu Rev Immunol **25**: 71-99.

Esteban, J. I., S. Sauleda, et al. (2008). "The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe." J Hepatol **48**(1): 148-162.

Fan, Z., Q. R. Yang, et al. (1999). "Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein." J Med Virol **59**(2): 131-134.

Flamm, S. L., R. A. Parker, et al. (1998). "Risk factors associated with chronic hepatitis C virus infection: limited frequency of an unidentified source of transmission." Am J Gastroenterol **93**(4): 597-600.

Fletcher, N. F., J. P. Yang, et al. (2010). "Hepatitis C virus infection of neuroepithelioma cell lines." Gastroenterology **139**(4): 1365-1374.

Focaccia, R., O. J. da Conceicao, et al. (1998). "Estimated Prevalence of Viral Hepatitis in the General Population of the Municipality of Sao Paulo, Measured by a Serologic Survey of a Stratified, Randomized and Residence-Based Population." Braz J Infect Dis **2**(6): 269-284.

Frasca, L., P. Del Porto, et al. (1999). "Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells." J Immunol **163**(2): 650-658.

Fried M, Shiffman M, Reddy K, Smith C, et al.Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002, 347:975-982

Garfein, R. S., D. Vlahov, et al. (1996). "Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses." Am J Public Health **86**(5): 655-661.

Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, Penin F, Couzigou P, Inchauspe G, Bain C. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. J Infect Dis. 2003;187:1951–1958.

Grakoui, A., D. W. McCourt, et al. (1993). "Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites." J Virol **67**(5): 2832-2843.

Gremion, C. and A. Cerny (2005). "Hepatitis C virus and the immune system: a concise review." Rev Med Virol **15**(4): 235-268.

Guidotti, L. G. and F. V. Chisari (2001). "Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response." Annu Rev Immunol **19**: 65-91.

Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. Ann Intern Med. 2004 Mar 2;140(5):346-55.

Handbook of ELISPOT methods and protocols / edited by Alexander E.Kalyuzhny. p. ; cm. -- (Methods in molecular biology ; 302), 2005.

He, X.-S. (2006). Regulation of Adaptive Immunity by HCV. Hepatitis C Virus, Genomes and Molecular Biology. S.-L. Tan. Horizon bioscience.

Holz L, Rehermann B. T cell responses in hepatitis C virus infection: Historical overview and goals for future research. Antiviral research 2015 114:96-105.

Huang Y, Zheng MJ, XU YH. Genetics and Molecular Research 2015 14(3): 10057-10063.

Hugle, T., F. Fehrmann, et al. (2001). "The hepatitis C virus nonstructural protein 4B is an integral endoplasmic reticulum membrane protein." Virology **284**(1): 70-81.

Iles, J. C., G. L. Abby Harrison, et al. (2013). "Hepatitis C virus infections in the Democratic Republic of Congo exhibit a cohort effect." Infect Genet Evol **19**: 386-394.

Jr, D. S. C. a. M. G. (2006). HCV Regulation of Host Defense. Hepatitis C Virus, Genomes and Molecular Biology. S.-L. Tan. Horizon bioscience.

Kaneko, T., Y. Tanji, et al. (1994). "Production of two phosphoproteins from the NS5A region of the hepatitis C viral genome." Biochem Biophys Res Commun **205**(1): 320-326.

Karmochkine, M., F. Carrat, et al. (2006). "A case-control study of risk factors for hepatitis C infection in patients with unexplained routes of infection." J Viral Hepat **13**(11): 775-782.

Khan, A., Y. Tanaka, et al. (2009). "Epidemic spread of hepatitis C virus genotype 3a and relation to high incidence of hepatocellular carcinoma in Pakistan." J Med Virol **81**(7): 1189-1197.

Khudyakov, Y. (2012). "Molecular surveillance of hepatitis C." Antivir Ther **17**(7 Pt B): 1465-1470.

Kondo Y, Shimosegawa T. Direct effect of hepatitis C virus on the lymphoid celld. World J Gastroenterol 2013 19(44): 7889-7895.

Krieger, N., V. Lohmann, et al. (2001). "Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations." J Virol **75**(10): 4614-4624.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjörback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med. 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125

Kuby, R. A. G. J. (2003). Immunology.

Kupfer, B. (2012). HCV Structure and Viral Replication The Flying Publisher, Short Guide to Hepatitis C

Lauer GM. & Walker BD. Hepatitis C virus infection. The New England Journal of Medicine 345 (1): 41-52, 2001.

Lauer, G. M., E. Barnes, et al. (2004). "High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection." Gastroenterology **127**(3): 924-936.

Lavillette D, Pecheur EI, Donot P, Fresquet J, Molle J, Corbau R, Dreux M, Penin F, Cosset FL 2007. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol 81(16):* 8752-8765.

Le Guillou-Guillemette H, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel Fabiani F 2007. Genetic diversity of the hepatics C virus: impact and issues in the antiviral therapy. World J Gastroenterol 13(17): 2416-2426.

Lechner, F., D. K. Wong, et al. (2000). "Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus." J Exp Med **191**(9): 1499-1512.

Lin, C., J. W. Wu, et al. (1997). "The hepatitis C virus NS4A protein: interactions with the NS4B and NS5A proteins." J Virol **71**(9): 6465-6471.

Lohmann, V., F. Korner, et al. (1999). "Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line." Science **285**(5424): 110-113.

Loza, M. J. and B. Perussia (2004). "Differential regulation of NK cell proliferation by type I and type II IFN." Int Immunol **16**(1): 23-32.

Lundin, M., H. Lindstrom, et al. (2006). "Dual topology of the processed hepatitis C virus protein NS4B is influenced by the NS5A protein." J Gen Virol **87**(Pt 11): 3263-3272.

Lyra AC, Fan X, Bisceglie AM 2004. Molecular biology and clinical implication of hepatitis C virus. Braz J Med Biol Res 37(5): 691-695

Macdonald, A., K. Crowder, et al. (2004). "The hepatitis C virus NS5A protein binds to members of the Src family of tyrosine kinases and regulates kinase activity." J Gen Virol **85**(Pt 3): 721-729.

MacParland SA, Chen AY, Corkum CP, Pham TN, Michalak TI. Patient-derived hepatitis C virus inhibits $CD4^+$ but not $CD8^+$ T lymphocyte proliferation in primary T cells. Virol J. 2015 Jun 19;12:93.

MacParland SA, Pham TN, Guy CS, Michalak TI. Hepatitis C virus persisting after clinically apparent sustained virological response to antiviral therapy retains infectivity in vitro. Hepatology. 2009;49:1431-1441.

Magiorkinis, G., E. Magiorkinis, et al. (2009). "The global spread of hepatitis C virus 1a and 1b: a phylodynamic and phylogeographic analysis." PLoS Med **6**(12): e1000198.

Mamotte CD. Genotyping of single nucleotide substitutions. Clin Biochem Rev. 2006 Feb;27(1):63-75.

Manns M, McHutchison J, Gordon S, Rustgi V, Shiffman M, Reindollar R, et al.Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. Lancet 2001,358(9286) :958-965.

Markov, P. V., J. Pepin, et al. (2009). "Phylogeography and molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 2 in Africa." J Gen Virol **90**(Pt 9): 2086-2096.

Mathy, J. E., S. Ma, et al. (2008). "Combinations of cyclophilin inhibitor NIM811 with hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B polymerase inhibitors enhance antiviral activity and suppress the emergence of resistance." Antimicrob Agents Chemother **52**(9): 3267- 3275.

McHutchison J. Understanding hepatitis C. Am J Manag Care 2004, 10:S21-29.

McLauchlan, J. (2000). "Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes." J Viral Hepat **7**(1): 2-14.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Boletim epidemiológico:hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ. Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiablefactors. Gastroenterology. 2008;134(6):1699-714.

Neddermann, P., A. Clementi, et al. (1999). "Hyperphosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein requires an active NS3 protease, NS4A, NS4B, and NS5A encoded on the same polyprotein." J Virol **73**(12): 9984-9991.

Paludan SR. Interleukin-4 and Interferon-γ: The Quintessence of a Mutual Antagonistic Relationship. Scand J Immunol 1998 48: 459-468.

Pawlotsky JM, Chevaliez S, McHutchison JG. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. Gastroenterol.2007;132:1979-1998.

Pawlotsky JM. New Hepatitis C Therapies. Semin Liver Dis 2014 34(01):07-08.

Pereira, L. M., C. M. Martelli, et al. (2013). "Prevalence and risk factors of Hepatitis C virus infection in Brazil, 2005 through 2009: a cross-sectional study." BMC Infect Dis **13**: 60.

Pham TN, Macparland SA, Coffin CS, Lee SS, et al .Mitogen-induced upregulation of hepatitis C virus expression in human lymphoid cells. J Gen Virol. 2005 Mar;86(Pt 3):657-66

Piccininni, S., A. Varaklioti, et al. (2002). "Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein." J Biol Chem **277**(47): 45670-45679.

Ploss, A., M. J. Evans, et al. (2009). "Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells." Nature **457**(7231): 882-886.

Pol S, Corouge M. Treatment of hepatitis C: current status and perspectives. Rev Prat. 2014 May;64(5):605-12.

Polyak, S. J., K. C. Klein, et al. (2006). Assemble and Interact: Pleiotropic Functions of the HCV Core Protein. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. S. L. Tan. Norfolk (UK).

Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, Lai CL. Viral hepatitis C. Lancet. 2003 Dec 20;362(9401):2095-100.

Rehermann, B. (2009). "Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence." J Clin Invest **119**(7): 1745-1754.

Rehermann, B. and M. Nascimbeni (2005). "Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection." Nat Rev Immunol **5**(3): 215-229.

Roberts EA, Yeung L. Maternal-infant transmition of hepatitis C virus infection. Hepatology. 2002;36(5), suppl.1:106-113.

Rocha-Perugini, V., C. Montpellier, et al. (2008). "The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry." PLoS One **3**(4): e1866.

R-Viso AT, Duarte MIS, Pagliari C, Fernandes ER, Brasil RA, Benard G, Romano CC, Oguduku D, Cavalheiro NP, Melo CE, Barone AA. Tissue and serum imune response in chronic hepatitis C wirh mild histological lesions. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010 105(1): 25-32.

Sabahi A. Hepatitis C Virus entry: the early steps in the viral replication cycle.Virol. J.2009;6:117.

Samreen B, Khaliq S, Ashfaq UA, Khan M, Afzal N, Shahzad MA, Riaz S, Jahan S 2012. Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. *Infect Genet Evol 12*: 1699-1709.

Santolini, E., G. Migliaccio, et al. (1994). "Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein." J Virol **68**(6): 3631-3641.

Scarselli, E., H. Ansuini, et al. (2002). "The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus." EMBO J **21**(19): 5017-5025.

Schulz, O., S. S. Diebold, et al. (2005). "Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virusinfected cells." Nature **433**(7028): 887-892.

Serebrov, V. and A. M. Pyle (2004). "Periodic cycles of RNA unwinding and pausing by hepatitis C virus NS3 helicase." Nature **430**(6998): 476-480.

Shapiro, S., V. Gershtein, et al. (1998). "mRNA cytokine profile in peripheral blood cells from chronic hepatitis C virus (HCV)-infected patients: effects of interferon-alpha (IFNalpha) treatment." Clin Exp Immunol **114**(1): 55-60.

Sharma, A., A. Chakraborti, et al. (2009). "Elevation of interleukin-18 in chronic hepatitis C: implications for hepatitis C virus pathogenesis." Immunology **128**(1 Suppl): e514-522.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. Lancet InfectiousDiseases 2005;5: 558-567.

Shiffman, M. L. (2011). Chronic Hepatitis C Virus: Advances in Treatment, Promise for the Future.

Shirota, Y., H. Luo, et al. (2002). "Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity." J Biol Chem **277**(13): 11149-11155.

Shoukry, N. H., A. G. Cawthon, et al. (2004). "Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection." Annu Rev Microbiol **58**: 391-424.

Soldan, K., J. A. Barbara, et al. (2003). "Estimation of the risk of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus infectious donations entering the blood supply in England, 1993-2001." Vox Sang **84**(4): 274-286.

Spaan M, Janssen HLA, Boonstra A. Immunology of hepatitis C virus infections. Clinical Gastroenterology. August 2012 Volume 26, Issue 4, pages 391-400.

Spangenberg, H. C., S. Viazov, et al. (2005). "Intrahepatic CD8+ T-cell failure during chronic hepatitis C virus infection." Hepatology **42**(4): 828-837.

Stockman, L. J., S. M. Guilfoye, et al. (2014). "Rapid hepatitis C testing among persons at increased risk for infection--Wisconsin, 2012-2013." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **63**(14): 309-311.

Strahotin CS & Babich M 2012. Hepatitis C variability, patterns of resistance, and impact on therapy. Adv Virol.: 1-10

Su, A. I., T. Wiltshire, et al. (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6062-6067.

Subouchi E, Akbar SM, Horiike N, Onji M. Infection and dysfunction of circulating blood dendritic cells and their subsets in chronic hepatitis C virus infection. J Gastroenterol. 2004a;39:754–762.

Sulkowski MS, Gardiner DF, Rodriguez-Torres M, et al. Daclatasvir plus Sofosbuvir for Previously Treated or Untreated Chronic HCV Infection. The New England Journal of Medicine. 2014 April 10;370(15):1469

Suzuki R, Suzuki T, Ishil K, Matsuura Y, Miyamura T 1999. Processing and functions of hepatitis C virus proteins. *Intervirology 42:* 145-152.

Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T 2007. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol 42:* 411-423.

Takaki, A., M. Wiese, et al. (2000). "Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C." Nat Med **6**(5): 578-582.

Tanaka, Y., F. Kurbanov, et al. (2006). "Molecular tracing of the global hepatitis C virus epidemic predicts regional patterns of hepatocellular carcinoma mortality." Gastroenterology **130**(3): 703-714.

Tang H, Grisé H 2009. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci 117*: 49–65.

Taylor DR, Shi ST, Lai MM. Hepatitis C virus and interferon resistance. Microbes Infect. 2000;2(14):1743-56.

Tellinghuisen, T. L., J. Marcotrigiano, et al. (2004). "The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein." J Biol Chem **279**(47): 48576-48587.

Thimme R, Neumann-Haefelin C, Boettler T, Blum HE. Adaptive immune responses to hepatitis C virus: from viral immunobiology to a vaccine. Biol. Chem. 2008;389:457-467.

Thimme, R., D. Oldach, et al. (2001). "Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection." J Exp Med **194**(10): 1395-1406.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature. 2009;461(7265):798–801.

Tong et al., 2008. Tong X, Bogen S, Chase R, et al: Characterization of resistance mutations against HCV ketoamide protease inhibitors. Antiviral Res. 2008; 77: pp. 177 185

Tram NQ Pham, Tomasz I Michalak. Occult persistence and lymphotropism of hepatitis C virus Infection. World J Gastroenterol 2008 May 14; 14(18): 2789-2793

Tsai, S. L., Y. F. Liaw, et al. (1997). "Detection of type 2-like T-helper cells in hepatitis C virus infection: implications for hepatitis C virus chronicity." Hepatology **25**(2): 449-458.

Wan, L., Y. J. Kung, et al. (2009). "Th1 and Th2 cytokines are elevated in HCV-infected SVR(-) patients treated with interferon-alpha." Biochem Biophys Res Commun **379**(4): 855- 860.

Ward, J. W. (2013). "The hidden epidemic of hepatitis C virus infection in the United States: occult transmission and burden of disease." Top Antivir Med **21**(1): 15-19.

Wasley, A. and M. J. Alter (2000). "Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends." Semin Liver Dis **20**(1): 1-16.

Who. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. J Viral Hepat. Jan 1999;6(1):35-47.

Williams, I. T., B. P. Bell, et al. (2011). "Incidence and transmission patterns of acute hepatitis C in the United States, 1982-2006." Arch Intern Med **171**(3): 242-248.

Wohnsland A, Hofmann WP, Sarrazin C 2007. Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev 20(1)*: 23-38.

Wolk, B., D. Sansonno, et al. (2000). "Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracyclineregulated cell lines." J Virol **74**(5): 2293-2304.

Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations ad future applications in acute-care settings. Lancet Infect Dis. 2004 Jun;4(6):337-48.

Yao, N., P. Reichert, et al. (1999). "Molecular views of viral polyprotein processing revealed by the crystal structure of the hepatitis C virus bifunctional protease-helicase." Structure **7**(11): 1353-1363.

Zarife, M. A., L. K. Silva, et al. (2006). "Prevalence of hepatitis C virus infection in northeastern Brazil: a population-based study." Trans R Soc Trop Med Hyg **100**(7): 663-668.

Zeisel, M. B., G. Koutsoudakis, et al. (2007). "Scavenger receptor class B type I is a key host factor for hepatitis C virus infection required for an entry step closely linked to CD81." Hepatology **46**(6): 1722-1731.

Zeuzem S, Andreone P, Pol S, Lawitz E, Diago M, Roberts S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. N Engl J Med2011,364:2417-2428.

Zhang Y, Liu Y, Zhao Y, Shi L, Ma L, Yan H, Wu H, Wei L, Dong T, Chen X. Hepatitis C virus nonstructural protein specific T cells are associated with virological responses to combination therapy in chronic HCV patients. Liver Int. 2012 Jan;32(1):102-9.

Zibbell, J. E., K. Iqbal, et al. (2015). "Increases in hepatitis C virus infection related to injection drug use among persons aged ≤30 years - Kentucky, Tennessee, Virginia, and West Virginia, 2006-2012." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **64**(17): 453-458.

Zignego AL, Giannini C, Monti M, Gragnani L. Hepatitis C virus lymphotropism: lessons from a decade of studies. DigLiverDis. 2007;39

ANEXOS

Anexo 1

Tabela 8. Distribuição dos 10 casos do grupo controle, segundo dados demográficos.

Características	N	%
Gênero		
Masculino	3	30
Feminino	7	70
Etnia		
Negro	1	10
Não negro	9	90
Idade (anos)		
18 a 30	2	20
31 a 40	4	40
41 a 51	4	40

Tabela 9 Dados específicos de todos os pacientes com hepatite C crônica coletados antes, durante e após tratamento com IFN e RBV.

NÚMERO	GÊNERO	IDADE	ETNIA	GRAU DE FIBROSE	GENÓTIPO IL-28B	GENÓTIPO VIRAL
1	F	65	MULATO	ALTA	T/T	1
2	M	53	BRANCO	ALTA	C/T	1
3	M	51	BRANCO	BAIXA	C/C	2
4	F	69	BRANCO	BAIXA	C/T	3
5	F	43	BRANCO	BAIXA	C/T	1
6	F	52	MULATO	BAIXA	T/T	1
7	M	53	BRANCO	ALTA	C/C	3
8	F	61	BRANCO	BAIXA	T/T	1
9	M	67	BRANCO	ALTA	C/T	1
10	M	57	BRANCO	BAIXA	T/T	1
11	M	60	BRANCO	BAIXA	C/C	3
12	M	61	BRANCO	BAIXA	C/C	1
13	F	36	BRANCO	ND	C/T	3
14	F	59	BRANCO	BAIXA	C/T	1
15	F	57	BRANCO	BAIXA	C/T	1
16	M	31	BRANCO	BAIXA	C/T	1
17	F	26	BRANCO	BAIXA	T/T	1
18	M	30	MULATO	BAIXA	T/T	2
19	F	60	BRANCO	BAIXA	C/C	3
20	F	35	BRANCO	BAIXA	T/T	1
21	M	50	BRANCO	BAIXA	C/T	3
22	F	54	BRANCO	BAIXA	C/T	2
23	F	60	BRANCO	BAIXA	C/T	2
24	M	61	MULATO	BAIXA	C/C	2
25	F	62	BRANCO	ALTA	T/T	3
26	M	57	BRANCO	BAIXA	T/T	1
27	F	37	BRANCO	BAIXA	T/T	1
28	M	35	BRANCO	BAIXA	C/C	3
29	F	35	NEGRO	BAIXA	C/T	1
30	F	52	NEGRO	BAIXA	C/T	1
31	F	43	BRANCO	BAIXA	C/C	1
32	F	48	BRANCO	BAIXA	T/T	3
33	F	81	AMARELO	ALTA	C/C	2
34	M	59	BRANCO	BAIXA	C/T	1
35	F	37	BRANCO	ALTA	C/C	1
36	M	53	BRANCO	BAIXA	C/T	1
37	M	49	BRANCO	BAIXA	T/T	3
38	M	49	BRANCO	ALTA	C/T	3
39	M	58	MULATO	ALTA	C/C	1
40	M	56	BRANCO	ALTA	T/T	1
41	M	55	BRANCO	BAIXA	C/C	1
42	F	39	BRANCO	BAIXA	C/T	1
43	F	50	BRANCO	BAIXA	C/T	ND
44	F	35	MULATO	BAIXA	C/T	1
45	F	58	BRANCO	ALTA	T/T	1
46	M	61	NEGRO	BAIXA	T/T	1
47	F	43	BRANCO	BAIXA	T/T	1
48	F	39	MULATO	BAIXA	T/T	1
49	F	66	BRANCO	ALTA	C/T	2
50	M	52	BRANCO	BAIXA	C/T	ND
51	F	74	BRANCO	S/ DADOS	T/T	1
52	M	52	BRANCO	BAIXA	C/T	1

Anexo 2

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA**DA**
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M □□□□F □

DATA DE NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD(.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: .....

SEXO: M □□□□F □

DATA DE NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO..... Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:.....TELEFONE DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: *"VÍRUS DA HEPATITE C E CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO"*

PESQUISADOR: *ANTÔNIO ALCI BARONE*

CARGO/ FUNÇÃO: *PROFESSOR TITULAR*

INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL Nº: *12047*

UNIDADE DO HCFMUSP: *LIM 47–DIVISÃO DE CLÍNICA DE MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS*

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: *05/06/2012 A 05/06/2015 – 36 MESES*

---

1. Desenho do estudo e objetivo(s) "essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa ANALISAR A IMPORTÂNCIA DA PRESENÇA DO VÍRUS DA HEPATITE C EM ALGUNS GLÓBULOS BRANCOS DO SEU SANGUE".

2. Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros: ALÉM DOS PROCEDIMENTOS HABITUAIS PARA O DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E ACOMPANHAMENTO DE SUA HEPATITE PELO VÍRUS C, SERÃO COLHIDOS 20 MILILITROS DE SEU SANGUE PRÉ TRATAMENTO, DURANTE E PÓS TRATAMENTO. NESSE MATERIAL, SERÃO REALIZADOS EXAMES PARA DETECTAR A PRESENÇA DO VÍRUS C NOS LINFÓCITOS (UM TIPO DE GLÓBULOS BRANCOS) E SERÃO REALIZADOS TESTES PARA ESTUDAR A FUNÇÃO DESSAS CÉLULAS E CARACTERIZAÇÃO MOLELULAR/GENÉTICA.

3. Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados – coleta de sangue por punção periférica de veia no antebraço.
4. PODERÁ RESULTAR UM DOLORIMENTO NO LOCAL DA PUNÇÃO NO SEU ANTEBRAÇO E EVENTUALMENTE, UM PEQUENO HEMATOMA (PEQUENO INCHAÇO ARROXEADO) NO LOCAL.
5. SOMENTE AO FIM DO ESTUDO PODEREMOS CONCLUIR A PRESENÇA DE ALGUM BENEFÍCIO PARA O PRÓPRIO PACIENTE OU PARA TODOS OS PACIENTES PORTADORES DE HEPATITE CRÔNICA PELO VÍRUS C.
6. Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente possa optar: NÃO HÁ.
7. Garantia de acesso: em qualquer data do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são o Dr. ANTÔNIO ALCI BARONE e GABRIELLA TEIXEIRA GARCIA que podem ser encontrados no endereço : AV. DR. ENÉAS DE CARVALHO AGUIAR, 500 – 1º ANDAR, SALA 12, Telefone (11)3085-1601 ou (11)3061-7031. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Telefone: 3069-6442, ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442, ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
8. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
9. Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
10. Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
11. Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
12. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas;
13. Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e material coletado somente para essa pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Hepatite por VHC e células mononucleares do sangue periférico".

Eu discuti com o Dr. ANTÔNIO ALCI BARONE e a GABRIELLA TEIXEIRA GARCIA sobre a minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no momento do atendimento neste Serviço.

_____ Data:____/____/____

Assinatura do Paciente/ Representante Legal

_____Data: ____/____/____

Assinatura da Testemunha*

*para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____Data: ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Anexo 3

VÍRUS DA HEPATITE C e CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Pesquisador responsável: Prof. Antonio Alci Barone

IDENTIFICAÇÃO /DADOS DEMOGRÁFICOS (PACIENTE)

1. Número do Paciente: |___|___|___|___|[Espaço reservado para a coordenação]
2. RGHC: |___|___|___|___|___|___|___|___|___|___|
3. NOME: _____
4. IDADE: |___|___|anos
5. SEXO: 1. Masc |___| 2. Fem |___|
6. DATA DE NASCIMENTO: |___|___|/|___|___|/|___|____|___|___|

ENDEREÇO (PACIENTE)

7. Avenida, Rua: _____
8. Bairro: _____
9. Cidade: _____
10. CEP: _____
11. Tel.: _____ Cel.: _____

ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS (PACIENTE)

12. DOADOR DE SANGUE (MOTIVO DA CONSULTA): |___|0. Não |___|1. Sim
13. TRANSFUSÃO DE SANGUE ATÉ 1992: |___|0. Não |___|1. Sim
14. SE SIM, ANO: |___|___|___|___| 8888. Não se aplica |___|
15. TRANSFUSÃO DE SANGUE APÓS 1992: |___|0. Não |___|1. Sim
16. SE SIM, ANO: |___|___|___|___|8888. Não se aplica |___|
17. DROGA INJETÁVEL: |___|0. Não |___|1. Sim
18. SE SIM, ANO DE INICIO: |___|___|___|___|
19. DROGA INALATÓRIA: |___|0. Não |___|1. Sim
20. SE SIM, ANO DE INICIO: |___|___|___|___|
21. TATUAGEM: |___|0. Não |___|1. Sim
22. SE SIM, ANO (PRIMEIRA TATUAGEM): |___|___|___|___|
23. ACUPUNTURA: |___|0. Não |___|1. Sim
24. SE SIM, ANO DE INICIO: |___|___|___|___|

25. "PIERCING": |___|0. Não |___|1. Sim
26. SE SIM, ANO (PRIMEIRO): |___|___|___|___|
27. PARCEIRO HCV: |___|0. Não |___|1. Sim
28. Em caso afirmativo, nome: _____ 8. Não se aplica |___|
29. Em caso afirmativo, ano da primeira relação: |___|___|___|___|
30. FAMILIAR HCV (mora ou morou junto): |___|0. Não |___|1. Sim
31. Em caso afirmativo, nome: _____ 8. Não se aplica |___|
32. Em caso afirmativo, **ano de início de convivência**: |___|___|___|___|
    último ano: |___|___|___|___|

HÁBITOS (PACIENTE)

33. TABAGISMO: |__|__| CIGARROS POR DIA 8. Não se aplica |___|
34. INGESTÃO DE ÁLCOOL: 1. Social |___| 2. Importante |___| 8. Não se aplica |___|

EXAMES LABORATORIAIS INICIAIS HCV (PRONTUÁRIO)

35. DATA DO PRIMEIRO ANTI-HCV ou RNA-HCV: |___|___|/|___|___|/|___|___||___|___|
36. GENOTIPO: |___|___|
37. AST (o mais próximo da biópsia): |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|__|
    9999 = Ignorado |___|
38. ALT (o mais próximo da biópsia): |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
39. GGT (o mais próximo da biópsia): |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

EXAMES LABORATORIAIS PRÉ-TRATAMENTO (ATE 3 MESES ANTES DO TRATAMENTO) (PRONTUÁRIO)

40. RNA – HCV (PCR quantitativo): |___|___|___|___|___|___|___| UI/ml
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
41. RNA – HCV (Células):|___|___|___|___|___|___|___| _____
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
42. CONTAGEM CÉLULAS CD4+: |___|___|___|___|
43. CONTAGEM CÉLULAS CD8+: |___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
44. AST : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
45. ALT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
46. GGT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
47. HB : |___|___|.|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
48. HT : |___|___| % data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| |___| 9999 = Ignorado |___|

49. LEUCÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
50. LINFÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
51. PLAQUETAS : |___|___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

BIÓPSIA HEPÁTICA (PRONTUÁRIO)

52. DATA da Biópsia: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
53. ESTRUTURAL: |___|
54. INFILTRADO INFLAMATÓRIO PORTAL: |___|
55. INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERIPORTAL: |___|
56. INFILTRADO INFLAMATÓRIO SEPTAL: |___|
57. MARCADORES ETIOLÓGICOS: _____

TRATAMENTO (PRONTUÁRIO)

58. TRATAMENTO DROGA (S): _____
59. TRATAMENTO INÍCIO: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
60. TRATAMENTO FIM: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
61. TRATAMENTO INTERRUPÇÃO: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
62. MOTIVO DA INTERRUPÇÃO: _____
    08/08/8888 = Data não se aplica |___|

EXAMES LABORATORIAIS SEMANA 12 (PRONTUÁRIO)

63. RNA – HCV (PCR quantitativo): |___|___|___|___|___|___|___| UI/ml
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
64. RNA – HCV (Células):|___|___|___|___|___|___|___| _____
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
65. CONTAGEM CÉLULAS CD4+: |___|___|___|___|
66. CONTAGEM CÉLULAS CD8+: |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
67. AST : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
68. ALT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|9999 = Ignorado |___|
69. GGT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
70. HB : |___|___|.|___|___| data: |__|__|/|__|__|/|__|__|__|__| 9999 = Ignorado |___|
71. HT : |___|___| % data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
72. LEUCÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

73. LINFÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
74. PLAQUETAS : |___|___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

EXAMES LABORATORIAIS SEMANA 24 (PRONTUÁRIO)

75. RNA – HCV (PCR quantitativo):|___|___|___|___|___|___|___| UI/ml
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
76. RNA – HCV (Células):|___|___|___|___|___|___|___| _____
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
77. CONTAGEM CÉLULAS CD4+: |___|___|___|___|
78. CONTAGEM CÉLULAS CD8+: |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
79. AST : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|9999 = Ignorado |___|
80. ALT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
81. GGT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
82. HB : |___|___|.|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|9999 = Ignorado |___|
83. HT : |___|___| % data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
84. LEUCÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
85. LINFÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
86. PLAQUETAS : |___|___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

EXAMES LABORATORIAIS SEMANA 48 (PRONTUÁRIO)

87. RNA – HCV (PCR quantitativo): |___|___|___|___|___|___|___| UI/ml
    data:|___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
88. RNA – HCV (Células):|___|___|___|___|___|___|___| _____
    data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
89. CONTAGEM CÉLULAS CD4+: |___|___|___|___|
90. CONTAGEM CÉLULAS CD8+: |___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
91. AST : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
92. ALT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
93. GGT : |___|___|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
94. HB : |___|___|.|___|___| data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
95. HT : |___|___| % data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___| 9999 = Ignorado |___|
96. LEUCÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|

97. LINFÓCITOS : |___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|
98. PLAQUETAS : |___|___|___|___|___|___|data: |___|___|/|___|___|/|___|___|___|___|
    9999 = Ignorado |___|