Cláudia Megumi Tani

**Perfil do HLA de classe II de pacientes com hepatite C e
características de hepatite auto-imune**

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

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado

São Paulo
2006

Aos meus pais,

Midore e Etsuko

Agradeço o amor, a atenção e o apoio.

Aos meus irmãos,

Gerson e Flávio

Fico muito feliz pela nossa união e
pelos momentos que compartilhamos.

Às minhas cunhadas,

Elizabeth e Maysa

Agradeço por todos estes anos,

pela ajuda e dedicação.

Aos meus sobrinhos queridos,

Renan, Vanessa, Rafael e Gabriel

Obrigada por toda a alegria que vocês trouxeram para a minha
vida.

Agradecimentos

Gostaria de dedicar esta tese a todos que me ajudaram concluí-la, sempre me apoiando em todos os momentos de dificuldades. Em especial, aos pacientes do nosso ambulatório de hepatologia, sem os quais este estudo não existiria. São vocês que contribuem para o nosso amadurecimento profissional e desenvolvimento científico. Meus sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado que desde a época de formação de residência médica da gastroenterologia, nos apoiou em todos os momentos de alegrias e dificuldades, sempre disponível, em qualquer momento do dia ou da noite. Durante este período de convivência aprendi muito e, com certeza, fez diferença no meu crescimento profissional e sem a sua ajuda esta tese não poderia ser finalizada. Pôde compreender as minhas limitações e me ajudou quando precisei.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho, muito além de ser o titular da Disciplina de Gastroenterologia, respeito-o pela sua dedicação, atenção e pelo ser humano que sempre demonstrou ser durante estes anos que tive o prazer de compartilhar. Sempre me apoiando nos períodos de dificuldades e não medindo esforços para contribuir que esta tese fosse finalizada, interrompendo, muitas vezes, seus afazeres para me atender.

Ao Prof. Dr. Antonio Atílio Laudanna pelo apoio desde a época da residência médica, preceptoria e pós-graduação para o desenvolvimento desta tese.

A todos os assistentes da gastroenterologia que me ajudaram na minha formação profissional e incentivo nestes anos de Hospital das Clínicas. Não conseguiria detalhar todos os nomes devido a grande equipe que os compõe, mas todos foram responsáveis pelo meu crescimento nesta instituição e família denominada Hospital das Clínicas.

Não poderia de deixar de agradecer a Prof. Dra. Dulce Reis Guarita que desde a época que eu ainda era uma residente de clínica médica me tratava com um carinho especial, sinceramente, um carinho materno, e após a minha chegada ao departamento de gastroenterologia esta atenção aumentou ainda mais. Sempre me confortando nos períodos mais difíceis da minha vida, da residência médica e nesta última etapa da tese, sempre disposta a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Aytan Miranda Sipahi, pela sua dedicação aos pacientes e residentes da gastroenterologia. Aos anos de convívio como preceptora. Muito nos ensinou e continua sempre ensinando.

A Dra. Denise Cerqueira Paranaguá Vezozzo, por sua competência, amabilidade e prontidão a nos ajudar.

Aos meus amigos de residência Dra. Luciana Lofêgo Gonçalves, Dra. Simone Barbosa Brainer e Dr. Carlos Felipe Bernardes Silva, sem vocês a residência médica ficaria muito mais difícil.

Aos assistentes, colegas e residentes (inúmeros desde a minha chegada a Gastroenterologia) da hepatologia, Prof. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita, Dra. Cláudia de Oliveira Marques, Dr. Alberto Queiroz Farias, Dra. Maira Solange Câmara dos Santos, Dra. Suzete Notaroberto, Dra. Luciana Oba Onishi Kikuchi e Dr. Celso Eduardo Lourenço Matielo e de nossos colegas que retornaram para a suas regiões Dr. Juliano Machado de Oliveira, Dra. Graciana Bandeira Salgado de Vasconcelos, Dra. Cíntia Mendes Clemente, Dra. Liliana Sampaio Costa Mendes e Dra. Cláudia Alves Couto.

Ao Dr. Paulo Lisboa Bittencourt pela possibilidade de trabalhar neste ramo laboratorial da biologia molecular, pela riquíssima tese de 1999, que forneceu importantes dados da população de pacientes com HAI tipo 1 e tipo 2, possibilitando uma análise comparativa com o meu grupo de estudo e sua disponibilidade de me ajudar quando solicitado, apesar de estarmos em serviços diferentes.

Ao amigo José Eymard Moraes de Medeiros Filho pela ajuda no protocolo, na minha formação de residência e presença nos momentos difíceis.

A amiga e companheira de ambulatório Dra. Regiane Saraiva de Souza Melo Alencar que nunca me abandonou nos períodos difíceis do protocolo, ambulatório e tese.

Aos amigos Dra. Marta Mitiko Deguti, Dr. Luiz Akira Hata, Arthur Jun Deguti Hata e Vinícius Yu Deguti Hata pela ajuda por todos estes anos e os próximos que virão. Marta, sem a sua ajuda esta tese realmente não

poderia ser concluída, não sei como agradecer toda a sua força e ajuda nestes momentos tão cruciais. Muito obrigada.

A equipe dos laboratórios do Instituto de Medicina Tropical, Kátia Maria de Oliveira, Francisca de Fátima Valentim e as amigas Clarice Pires Abrantes-Lemos, que mesmo com os seus problemas pessoais, nunca deixou de me atender as minhas solicitações e escutar as minhas lamúrias e Maria Cristina Nakhle por me ensinar e contribuir muito na extração de DNA e análise do HLA. Sem vocês esta tese não seria finalizada. Espero contar com vocês e continuar trabalhando nesta linha de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil Filho, por nos permitir utilizar a estrutura do Laboratório de Imunologia de Transplantes do Instituto do Coração para realizar a análise de HLA, ao Sr. Hércio Rodrigues e Sr. Germano Preuhs Filho, pela grande ajuda neste trabalho.

Aos amigos Sônia Maria Tozetti, Cláudia de Arruda e Ivan Roberto de Arruda Junior pela ajuda de ontem, hoje e amanhã. Encontrei no Hospital das Clínicas, uma nova mãe e irmãos.

As secretárias Fátima Gomes e Fabiana Renata Soares Bispo que sempre me auxiliaram e se desdobraram para contribuir para a finalização desta tese, em especial a Sra. Fabiana que, com muita paciência, nos pedidos de última hora, sempre se mostrou receptiva e lutando para um resultado positivo. Não tenho palavras para agradecê-las.

A enfermeira e amiga Sylvia Fernandes Assumpção e toda equipe de enfermagem do Hospital das Clínicas, pela ajuda na enfermaria e na nossa vida diária.

Aos funcionários do ambulatório da Gastroenterologia, Hepatologia e Transplante Hepático que nos permite trabalhar com mais conforto e agilidade.

Agradeço aos funcionários da secretaria da pós-graduação e equipe da biblioteca pelo auxílio, em especial a Sra. Marinalva de Souza Aragão.

A todos os meus amigos do Hospital Nipo Brasileiro, em especial Dr. Gelson Yoshikazu Oshiro, Dra. Flávia Barros de Azevedo pela amizade, companheira de plantão e de cursos de pós-graduação e Dr. Renato Wilberto Zilli, pelo companheirismo, ajuda e compreensão.

Ao projeto de Hepatologia-Hepatites/Câncer, sob os auspícios da Alves de Queiroz *Family Fundy for Research*, pelo auxílio à realização dessa pesquisa.

Não poderia de deixar de agradecer minha faculdade de origem e professores que contribuíram para a minha formação de graduação como médica: FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA SANTA CASA DE SÃO PAULO. Areguá!

Esta dissertação está de acordo com:

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 Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1.	Introdução	01
1.1.	Vírus da Hepatite C	01
1.1.1.	Definição	01
1.1.2.	Epidemiologia	04
1.1.3.	Manifestações clássicas	07
1.1.4.	Manifestações extra-hepáticas ou manifestações auto-imunes associadas	08
1.2.	Hepatite Auto-imune	10
1.3.	O Antígeno Leucocitário Humano	12
1.3.1.	Considerações Gerais	12
1.3.2.	HAI e HLA	18
1.4.	Hepatite Crônica pelo VHC e HLA	19
2.	Objetivos	22
3.	Casuística e Métodos	23
3.1.	Casuística	23
3.1.1.	Critérios de Inclusão	23
3.1.2.	Critérios de Exclusão	24

3.2.	Métodos	24
3.2.1.	Obtenção de dados clínicos	24
3.2.2.	Análise histopatológica	25
3.2.3.	Obtenção de dados laboratoriais	25
3.2.3.1.	Pesquisa de auto anticorpos hepáticos: levantamento dos auto anticorpos hepáticos realizados no período em estudo	25
3.2.3.2.	Técnica para pesquisa de auto-anticorpos hepáticos	26
3.2.3.2.1.	Reação de Imunofluorescência indireta	26
3.2.3.3.	Pesquisa de anticorpo antiactina (antimicrofilamentos)	27
3.2.4.	Pesquisa do HLA	28
3.2.4.1.	Extração de DNA de sangue periférico pela técnica de DTAB/CTAB	29
3.2.4.1.1.	Técnica de extração do DNA	29
3.2.4.2.	PCR-SSP (<i>Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers</i>)	30
3.2.4.2.1.	Princípio	30
3.2.4.2.2.	Etapas da reação	30
3.2.4.2.3.	Kit Comercial	30
3.2.4.2.4.	Micro SSP TM HLA DNA Typing Trays (One Lambda, Inc)	30
3.2.4.2.5.	<i>Primers</i> utilizados	31
3.2.4.2.6.	Gel de eletroforese	31
3.2.4.2.7.	Leitura e nomenclatura do produto de eletroforese	32

3.2.5.	Análise Estatística	32
4.	Resultados	34
4.1.	Casuística	34
4.2.1.	Dados Clínicos	34
4.2.2.	Análise histopatológica	35
4.2.3.	Dados laboratoriais	36
4.2.4.	Pesquisa dos alelos do HLA	48
5.	Discussão	57
6.	Conclusão	73
7.	Anexos	74
8.	Referências Bibliográficas	93

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: Graus Celsius

µl: Microlitro

AAA: Anticorpo antiactina

AAHS: Anticorpo antiantígeno hepático solúvel

AACH: Anticorpo anticitosol hepático

AACPA: Anticorpo anticélula parietal

AAE: Anticorpo antiendomísio

AAFP: Anticorpo antifígado e pâncreas

AAM: Anticorpo antimitocôndria

AAMFR-1: Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1

AAML-E: Anticorpo antimúsculo liso - padrão de estômago

AAML-G: Anticorpo antimúsculo liso - padrão de glomérulo

AAML-T: Anticorpo antimúsculo liso -padrão de túbulo

AAML-V: Anticorpo antimúsculo liso -padrão de vaso

AAN: Fator antinúcleo

ALT: Alanina Aminotransferase

ANCA: Anticorpo anticitoplasma de neutrófilo

Anti-IgG: Anti Imunoglobulina G

ANTITG: Anticorpo antitireoglobulina

ANTITPO: Anticorpo antitireóide peroxidase

AST: Aspartato Aminotransferase

AUTO-AC: Auto antianticorpo

CBP: Cirrose biliar primária

CEP: Colangite esclerosante primária

CH: Cirrose hepática

CHAA: Cirrose hepática acentuadamente ativa

CHC: Carcinoma hepatocelular

CHIA: Cirrose hepática intensamente ativa

CHMA: Cirrose hepática moderadamente ativa

CTAB: Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTAB: Brometo de dodeciltrimetilamônio

EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA: Enzima imuno-ensaio

F: Feminino

FA: Fosfatase alcalina

FMUSP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FR: Fator reumatóide

GAMAGLOB: Gamaglobulina

GGT: Gamaglutamil transferase

HAI: Hepatite auto-imune

HC: Hepatite crônica

HCAA: Hepatite crônica acentuadamente ativa

HCBA: Hepatite crônica de baixa atividade

HCDA: Hepatite crônica discretamente ativa

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

HCIA: Hepatite crônica intensamente ativa

HCl: Ácido Clorídrico

HCMA: Hepatite crônica moderadamente ativa

HLA: Antígeno leucocitário humano

IgG: Imunoglobulina G

Kb: Quilobases

M: Molar

M: Masculino

mA: Miliamper

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade humano

Na₂CO₃: Carbonato de sódio

Na₂HPO₄: Fosfato de sódio bibásico anidro

NaCl: Cloreto de sódio

NaH₂PO₄: Fosfato de sódio Monobásico anidro

NaHCO₃: Bicarbonato de sódio

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

PCR-SSP: Reação de polimerização em cadeia utilizando primers de
seqüências específicas (*polymerase chain reaction using sequence specific
primers*)

RNA: Ácido ribonucléico

Ro/SM/RNP: Anticorpo anti-antígenos nucleares extraíveis

Rpm: Rotação por minuto

Taq DNA polimerase: DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

TRIS base: Tris-hidroximetil aminometano base

VHC: Vírus da hepatite C

Vs: Versus

X: Vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O vírus da Hepatite C e genoma viral	03
Figura 2	Genótipos do VHC	04
Figura 3	Genes do MHC	16
Figura 4	MHC classe I e II	16
Figura 5	Distribuição dos portadores de VHC (n=1312) de acordo com sexo	34
Figura 6	Distribuição dos portadores de hepatite crônica pelo VHC, de acordo com a faixa etária (n= 1312)	35
Figura 7	Distribuição dos casos com biópsia hepática, segundo presença de marcadores histológicos compatíveis com HAI (n=951)	36
Figura 8	Pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44)	37
Figura 9	Distribuição do sexo dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44)	38
Figura 10	Distribuição da faixa etária dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44)	38
Figura 11	Distribuição dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI, de acordo com a etnia (n=44)	38
Figura 12	Distribuição dos casos com reatividade para o fator antinúcleo, segundo títulos (n=162)	39
Figura 13	Distribuição dos casos com reatividade para anticorpo antimúsculo liso - padrão de	

	estômago, segundo títulos (n= 62)	40
Figura 14	Distribuição dos casos com reatividade para o anticorpo antimúsculo liso – padrão de vaso, segundo títulos (n= 35)	40
Figura 15	Distribuição dos casos com reatividade para o anticorpo anti-músculo liso - padrão de glomérulo, segundo títulos (n= 62)	41
Figura 16	Fluxograma do levantamento retrospectivo dos auto-anticorpos em 1312 pacientes com hepatite crônica pelo VHC, e número de casos identificados por tipo de anticorpo	42/43
Figura 17	Distribuição dos pacientes com anticorpo antimúsculo liso - padrão de túbulo, segundo sexo (n=6)	44
Figura 18	Distribuição dos pacientes com anticorpo anti-músculo liso – padrão de túbulo, segundo faixa etária (n=6)	44
Figura 19	Distribuição dos pacientes com anticorpo anti-músculo liso – padrão de túbulo, segundo faixa etária (n=6)	45
Figura 20	Distribuição dos pacientes com anticorpo anti-microsoma de fígado e rim tipo 1, segundo sexo (n= 12)	45
Figura 21	Distribuição dos casos com anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1, segundo faixa etária (n=6)	46
Figura 22	Distribuição dos casos segundo níveis de gamaglobulina (n=1269)	47
Figura 23	Distribuição dos pacientes segundo níveis de ALT (n=1312)	48
Figura 24	Distribuição dos pacientes segundo níveis de AST (n=1312)	48

Figura 25	Distribuição dos pacientes do sexo feminino nos grupos controle (n=29), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI (n=31), VHC com presença de AAMFR-1 (n=7) e VHC com presença de AAML-T (n=5) cujos perfis de HLA foram analisados	50
Figura 26	Distribuição segundo intervalo de faixa etária dos pacientes nos grupos controle (n=29), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI (n=31), VHC com presença de AAMFR-1 (n=7) e VHC com presença de AAML-T (n=5) cujos perfis de HLA foram analisados	51
Figura 27	Distribuição segundo níveis de gamaglobulina nos grupos controle (n=29), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI (n=31), VHC com presença de AAMFR-1 (n=7) e VHC com presença de AAML-T (n=5) cujos perfis de HLA foram analisados	51
Figura 28	Gel de eletroforese exemplificando a tipagem do HLA classe II de um paciente com VHC e critérios diagnósticos de HAI. Observam-se os alelos que correspondem aos equivalente sorológicos DR4, DR7, DR53, DQ2 e DQ3	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Propriedades das proteínas de MHC classe I e II humano	14
Tabela 2	Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI <i>versus</i> controle	53
Tabela 3	Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI <i>versus</i> controle	53
Tabela 4	Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI <i>versus</i> controle	54
Tabela 5	Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC com AAMFR-1 <i>versus</i> controle	55
Tabela 6	Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC com AAMFR-1 <i>versus</i> controle	55
Tabela 7	Frequência dos alelos de HLA DQB1* de portadores de VHC com AAMFR-1 <i>versus</i> controle	55
Tabela 8	Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC com AAML-T <i>versus</i> controle	56
Tabela 9	Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC com AAML-T <i>versus</i> controle	56
Tabela 10	Frequência dos alelos de HLA DQB1* de portadores de VHC com AAML-T <i>versus</i> controle	56
Tabela 11	Comparação dos resultados dos alelos de HLA de classe II encontrados, em comparação com outras publicações, em relação a susceptibilidade e a proteção à agressão hepática	65

RESUMO

TANI, C.M. **Perfil do HLA de classe II de pacientes com hepatite C e características de hepatite auto-imune.** São Paulo, 2006. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 108p.

Introdução: A infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC) é uma epidemia que atinge mais de 170 milhões de pessoas em todo o mundo e frequentemente associa-se a fenômenos de auto-imunidade. O papel dos alelos de HLA de classe II vem sendo estudado em diversas condições auto-imunes. **Objetivos:** investigar a presença de auto-imunidade em portadores de VHC; realizar análise de HLA de classe II em portadores de VHC com e sem marcadores de auto-imunidade. **Casística e Métodos:** obtiveram-se retrospectivamente os dados clínicos, laboratoriais, histológicos hepáticos de 1312 indivíduos com VHC, e definiu-se a presença de HAI associada segundo critérios adotados pelo Grupo Internacional de Estudos da HAI (escore ≥ 10). Constituíram-se os subgrupos: VHC + HAI (n=44); VHC + anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (AAMFR-1) (n=7); VHC+ anticorpo antimúsculo liso padrão tubular/antiactina (AAML-T/AAA) (n=5) e controle de pacientes com VHC sem características de auto-imunidade (n=29). A tipagem do HLA foi realizada em DNA leucocitário de sangue periférico, extraído pela técnica de DTAB/CTAB, seguido de SSCP com o kit Micro SSP™ HLA DNA Typing (One Lambda Inc., CA, USA). A análise estatística foi realizada com o teste de χ^2 de Pearson com correção de Yates ou teste exato de Fisher quando apropriado e nos casos de existência de associação foi calculado o coeficiente de Yule para quantificá-la. **Resultados:** observou-se no grupo VHC + HAI, em comparação com a casística geral predominância de idade >40 anos e níveis de ALT acima de três vezes o limite superior da normalidade, associação positiva com o HLA-DR4 (45,1% vs 3,4%, p=0,0006, coeficiente de Yule=0,92) e DQ3 (67,7% vs 37,9%, p=0,04, coeficiente de Yule=0,54) e associação negativa com o HLA-DR51 (9,6% vs 34,4%, p=0,04, coeficiente de Yule=-0,66) e DR2 (9,6% vs 34,4%, p=0,04, coeficiente de Yule=-0,66). Pacientes do grupo VHC + AAMFR-1 situaram-se em faixa etária inferior a 40 anos em relação ao grupo controle (p=0,001). **Conclusão:** Idade superior a 40 anos, níveis de aminotransferases elevados caracterizam os pacientes com VHC e marcadores de auto-imunidade; níveis elevados de gamaglobulinas não são observados em portadores de VHC + HAI; o grupo VHC + AAMFR-1 manifesta a doença em faixa etária inferior a 40 anos; há associação positiva dos alelos HLA-DR4 e DQ3 e associação negativa dos alelos HLA-DR51 e DR2 com o grupo VHC + HAI; não foi possível estabelecer na população estudada semelhanças de marcadores imunogenéticos com os da HAI tipo 1 e 2, devido à baixa frequência do AAA e AAMFR-1 na presente série.

Descritores: 1.Hepacivirus 2.Hepatite auto-imune 3.Auto-anticorpos 4.Antígenos HLA 5.Hepatite crônica

SUMMARY

TANI, C. M. **Class II HLA profile oh hepatitis C patients with autoimmune hepatitis features**. Sao Paulo, 2006. Thesis (Doctorate) – University of São Paulo School of Medicine. 108p.

Introduction: HCV chronic infection is an epidemic condition that affects more than 170 million of people around the world, and often is associated with autoimmunity phenomena. The role of HLA class II alleles has been studied in many autoimmune diseases. **Aim:** To investigate the presence of laboratory markers of autoimmunity and compatible anatomo pathologic histology for autoimmune hepatitis (AIH) in HCV patients; to perform HLA class II typing in HCV patients with and without autoimmunity markers. **Material and Methods:** Clinical, laboratory and liver histology data from 1312 HCV patients were obtained retrospectively. AIH was considered in association based on the International Group for the Study of AIH criteria score system (≥ 10). The following groups were constituted: HCV + AIH (n=44); HCV + anti-liver-kidney-microsome type 1 (LKM-1) (n=7); HCV + anti-smooth muscle/anti-actin antibodies (SMA/AAA) (n=5); control (HCV without autoimmunity) (n=29). HLA typing was performed DNA extracted from leucocyte from periferic blood by DTAB/CTAB techniques, followed by SSCP with Micro SSP™ HLA DNA Typing kit (One Lambda Inc., CA, USA). Statistical analysis was performed with Pearson's χ^2 test, with Yates correction or Fisher exact test, when appropriated; when significant association was detected, Yule coefficient was calculated. **Results:** Age > 40 years old and ALT three times above upper normal limit predominated in the HCV + AIH group, when compared with the whole cohort (n=1312). HLA typing in VHC+HAI group (n=31) revealed positive association with HLA-DR4 (45.1% vs 3.4%, p=0.0006, Yule=0.92) and DQ3 (67.7% vs 37.9%, p=0.04, Yule=0.54) and negative association with HLA-DR51 (9.6% vs 34.4%, p=0.04, Yule= -0.66) and DR2 (9.6% vs 34.4%, p=0.04, Yule=-0.66), when compared with VHC control (n=29). HCV + LKM-1 patients were younger than 40 years old at the time of initial disease manifestations (p=0,001). **Conclusion:** Age above 40 years old, ALT levels three times upper the normal limit, but not gamma globulin levels, characterize HCV + AIH; HCV + LKM-1 patients manifest disease before 40 years old; HLA-DR4 and DQ3 allele have a positive association and HLA-DR51 and DR2 have a negative association with the HCV + AIH group. It was not possible to establish immunogenetic markers of AIH type 1 and 2 because of low frequency of SMA and AAA in this series.

Descriptors: 1.Hepacivirus 2.Hepatitis autoimmune 3.Autoantibodies 4.HLA antigens 5.Hepatitis chronic

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Hepatite C

1.1.1. Definição

O vírus da hepatite C (VHC), reconhecido previamente como vírus não-A não-B, possui genoma de RNA, esférico e envelopado com diâmetro de 55 a 65 nm e pertence à família *Flaviviridae*. Diante das peculiaridades de sua seqüência genômica, foi classificado em gênero próprio, denominado de *Hepacivirius* (1).

Embora sua existência fosse reconhecida há décadas, foi somente em 1989 que Choo *et al* conseguiram isolá-lo (2). Para isso, obtiveram amostras de plasma de chimpanzés infectados com soros de portadores de hepatite crônica não-A não-B, e clonaram o vírus em um vetor, demonstrando sua presença por meio da expressão de proteínas que reagiram contra soro de pessoas infectadas.

O RNA genômico do VHC é composto de 9600 quilobases (kb) que resultam em pelo menos quatro proteínas estruturais e seis não estruturais que estão dispostas em fita de RNA de polaridade positiva, com uma única fase de leitura aberta. A tradução desta fita resulta na síntese de poliproteína de 3010 a 3033 aminoácidos, que, após sofrer ações enzimáticas de proteases e helicases virais e celulares do hospedeiro, origina as proteínas virais (3, 4, 5). Sua replicação ocorre preferencialmente em hepatócitos, sem lesão citopática direta significativa.

As proteínas estruturais provêm do quarto aminoterminal da poliproteína, e as não-estruturais da parte restante. As proteínas estruturais

constituem o core e o envelope. Core é a proteína do nucleocapsídeo viral, e envelope (E1 e E2) apresenta complexas interações protéicas durante a replicação viral e participa no processo de penetração do VHC em linfócitos e hepatócitos.

As proteínas não-estruturais são NS2, NS3, NS4 e NS5. NS2, possivelmente uma metaloprotease, tem como única função conhecida permitir sua própria clivagem em “*cis*” da proteína NS3, que é aquela que ocorre apenas dentro da mesma molécula da poliproteína que catalisa a reação. NS3 possui diversas funções biológicas como de protease, helicase e de trinucleotidase; NS4 é a região compreendida de duas proteínas NS4A cuja função é co-fator de NS3 e hiperfosforilação de NS5A e NS4B cuja função ainda é desconhecida. NS5 é composta de duas proteínas NS5A e NS5B, liberadas pela ação conjunta de NS3 e NS4A. As subpartes NS5A e NS5B possuem sinais para localização nuclear, o que sugere que participam do processo de replicação ligada à membrana.

Nas extremidades 5' e 3' do genoma viral localizam-se as regiões não traduzidas ou não codificadoras de proteínas. A região 5'NCR desempenha papel importante na replicação viral, pois possui um sítio de entrada interna de ribossomos, sendo responsável pela tradução do RNA viral. A sequência da região 3'NCR é formada por uma região específica, uma fita de poli-U, inúmeras repetições de C(U)_n e uma região altamente conservada (cauda 3'X). Essa região conservada forma uma estrutura secundária com papel importante no início da replicação viral, mediante interação com proteínas celulares e virais (6-9).

Figura 1. O vírus da Hepatite C e genoma viral

Atualmente, reconhecem-se seis genótipos distintos, com mais de 50 subtipos, além de inúmeras mutações genéticas (isoladas ou *quasispecies*) (Figura 2). As mutações são freqüentes e espalham-se de células a células,

fato que dificulta a resposta imunológica mediada pelos linfócitos T e o tratamento dessa infecção. A diferenciação dos genótipos é de grande relevância para o tratamento clínico, porque determina também variações na expectativa da resposta terapêutica. O genótipo 1 apresenta menor resposta ao tratamento com interferon, enquanto os genótipos 2 e 3 são mais susceptíveis ao esquema terapêutico vigente que associa interferon alfa (peguilado ou não) e ribavirina.

Figura 2. Genótipos do VHC

1.1.2. Epidemiologia

O VHC é um problema de saúde global, com cerca de 170 milhões de portadores em todo o mundo e 3 a 4 milhões de casos novos por ano. Estima-se que 1 a 3% da população mundial esteja infectada; entretanto, em algumas regiões, como na África saariana, essa taxa pode superar os 5%. Nos países localizados ao oeste do Oceano Pacífico, vivem cerca de 62

milhões de infectados; no sudeste asiático, 32 milhões; no leste do mediterrâneo são 21 milhões; e, no oeste europeu, 9 milhões. Nos Estados Unidos da América, durante o período de 1988 a 1994, 3,9 milhões de indivíduos estavam infectados pelo VHC e, nesse grupo, 2,7 milhões (74%) apresentavam infecção crônica, com prevalência nacional de 1,8%. Constatou-se maior prevalência na faixa etária de 30 a 49 anos de idade, e em indivíduos de origem afro-americana e espanhola (2, 10-12).

Atualmente, o maior fator de risco para a transmissão do vírus é o uso de drogas injetáveis, seguido pela via sexual, apesar do risco em relações monogâmicas ser menor que 5%. As fontes de infecção em portadores do VHC são: 60% usuários de drogas injetáveis, 15% transmissão sexual, 10% transfusão sangüínea, 4% ocupacional, 1% outras causas (nosocomial, iatrogênica e perinatal) e 10% causa desconhecida (13).

Atribuem-se ao VHC 10 a 12 mil óbitos por ano nos Estados Unidos. Cerca de 6% dos pacientes cirróticos apresentam descompensação do seu quadro clínico e tornar-se-ão potenciais candidatos ao transplante hepático; além disso, até 4% poderão desenvolver carcinoma hepatocelular a cada ano. Acredita-se que a causa de morte devido a cirrose e ao carcinoma hepatocelular deva duplicar ou triplicar nas próximas duas décadas, atingindo cifras de 165900 mortes devido à hepatopatia crônica pelo VHC e 27200 por carcinoma hepatocelular entre 2010 a 2019, só naquele país (10).

Embora não existam dados epidemiológicos amplos a respeito da infecção pelo VHC no Brasil, estudos em candidatos a doadores de sangue evidenciam que a maioria das regiões brasileiras tem moderada prevalência.

Todavia, em alguns estados tais como Acre, Pará e Rio de Janeiro, podem ser classificados como de alta prevalência (14). No município de São Paulo, a prevalência estimada é de 1,42% de infectados, segundo análise realizada na década de 90. A faixa etária mais afetada foi de adultos com idade acima de 30 anos, com pico de 3,8% entre os 50 e 59 anos de idade. Ademais, os resultados sugeriram maior frequência nos indivíduos de menor nível educacional, porém sem diferenças nos subdistritos da cidade (15). Em relação ao genótipo, sabe-se que, no Brasil, prevalece o genótipo 1, subtipo 1b, com variações segundo a região estudada. Apenas no Sul o genótipo 3 é o mais freqüente (16, 17).

No Setor de Hepatologia da Disciplina de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), análise de 628 infectados crônicos pelo VHC, entrevistados entre 1998 e 2001, revelou que 51% eram do sexo masculino, 65% da raça branca, 60% estavam com idade entre 40 e 60 anos, e a hemotransfusão antes de 1992 havia sido o fator de risco em 59% dos pacientes. O uso de drogas injetáveis foi referido em 12% dos pacientes, e 31% não apresentavam nenhum fator de risco detectável (18). Entre 2001 e 2003, uma análise de 700 pacientes, neste mesmo grupo revelou que a população predominantemente afetada possuía baixo nível educacional (60%) e atuava no setor terciário da economia. O genótipo 1 foi o mais comum (70%), seguido do genótipo 3. Raça caucasiana, alcoolismo de mais de 60 gramas de etanol por dia e idade acima de 55,8 anos estavam associados ao desenvolvimento de cirrose hepática (19).

1.1.3. Manifestações clássicas

A história natural da infecção pelo VHC ainda não está totalmente conhecida, visto que é diagnosticada, na maioria das vezes, em fase crônica. Após um período de infecção aguda, geralmente assintomática, acredita-se que a evolução para infecção crônica ocorra em 80 a 85% dos casos, com eliminação viral espontânea em 20% (20-22)A apresentação sob a forma de hepatite fulminante é rara (23).

Acredita-se que 30% dos pacientes cronicamente infectados evoluirão de forma assintomática, sem fibrose significativa ou evidências de disfunções hepáticas graves, apesar das aminotransferases hepáticas persistentemente elevadas (24, 25). Em 30% dos casos, a infecção crônica pelo VHC, acompanhada de elevação persistente das aminotransferases, levará a lesão hepática progressiva com fibrose. O processo culmina com cirrose hepática e suas conseqüências, tais como a hipertensão portal e insuficiência hepática grave, podendo, ainda, haver o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Nos 40% restantes, a evolução é variável dependendo de fatores adversos relacionados.

Com a infecção crônica estabelecida, a eliminação viral espontânea é improvável. Ainda são obscuros os mecanismos de lesões hepatocelulares e a formação da fibrose na infecção crônica pelo VHC. Estudos demonstram os fatores relacionados ao pior prognóstico da infecção: aquisição da infecção em idade avançada, ingestão alcoólica, coinfecção com o HIV e outros vírus hepatotrópicos (26, 27).

Nos pacientes com cirrose hepática instalada há as complicações oriundas da hipertensão portal e o risco de surgimento de carcinoma hepatocelular em 4% dos casos (13). Com base nos conhecimentos atuais a respeito da patogênese da infecção do VHC é difícil compreender o mecanismo da carcinogênese. O VHC é um vírus RNA, replica no citoplasma por meio de transcriptase reversa, não se integra ao genoma celular e não tem ação predominantemente citopática. As proteínas virais expressadas nos hepatócitos estimulam o sistema imune do indivíduo infectado a destruir as células infectadas. Os efeitos da necrose inflamatória e da morte celular levam à proliferação dos hepatócitos, com ciclo celular acelerado e conseqüente acúmulo progressivo de mutações e instabilidade genômica. A análise de cDNA por técnica de *microarray* demonstra que um total de 53 genes estão desregulados em nódulos displásicos e macronódulos regenerativos em estádios finais da cirrose. Várias proteínas estão associadas a hepatocarcinogênese, especialmente o core e NS5 (28).

1.1.4. Manifestações extra-hepáticas ou manifestações auto-imunes associadas

Diversas manifestações extra-hepáticas, freqüentemente de natureza auto-imune, podem ocorrer em associação à infecção crônica pelo VHC. Pode haver envolvimento sistêmico (crioglobulinemia, fadiga) ou acometimento de órgãos e aparelhos, tais como sistema nervoso (encefalomielite progressiva, neuropatia sensorial crônica, síndrome de Guillain-Barré, neuropatia periférica), pele e mucosas (vasculites, prurido,

porfiria cutânea tarda, urticária, eritema nodoso, granuloma angular, líquen plano), sistema endócrino (disfunções tireoidianas), sistema urinário (glomerulonefrite membranoproliferativa), sistema hematopoiético (anemia aplásica, linfoma de células B, trombocitopenia auto-imune), e reumatológico (síndrome *sicca*, poliartralgia) (28, 29).

Até 70% dos pacientes infectados pelo VHC podem ter auto-anticorpos detectados no soro, a depender do critério e da metodologia utilizada. Podem ser detectados fator reumatóide, crioglobulinas, anticorpo anticardiolipina, anticorpo antineutrofílico citoplasmático (ANCA), além de anticorpos tireoideanos e hepáticos. Destes, 20 a 30% podem desenvolver manifestações clínicas de auto-imunidade (30).

A manifestação extra-hepática mais documentada é a crioglobulinemia mista (tipo II ou III) que afeta 36 a 54% dos pacientes. Caracteristicamente, detectam-se complexos proteicos sensíveis a temperatura no soro do paciente. O quadro clínico abrange artralgia, púrpura, fraqueza, vasculite sistêmica e glomerulonefrite. A crioglobulinemia parece estar associada ao haplótipo do antígeno leucocitário humano (HLA) B8-DR3 do paciente e não associado ao subtipo do VHC (31).

As alterações tireoidianas são também freqüentemente observadas. Sabe-se que portadores de VHC apresentam maior freqüência de hipotireoidismo e dos auto-anticorpos antitireoglobulina e antiperoxidase. (32). Acredita-se que exista uma predisposição genética ao desenvolvimento destas alterações que ocorrem tanto pela presença do VHC, quanto pelo tratamento com o interferon. A disfunção tireoideana desencadeada pelo

interferon ocorre em até 6,2% dos casos, é quase sempre subclínica e a resolução espontânea ocorre em 60% dos casos. Há maior incidência de hipotireoidismo (3,9%) do que de hipertireoidismo (2,3%). A explicação para esse fato seria uma reação auto-imune ou uma desregularização do sistema imune com efeito inibitório direto nos tireócitos nos pacientes que desenvolveram hipotireoidismo, sem auto-imunidade (33, 34). O complexo principal de histocompatibilidade humano (MHC) pode ter importância na gênese das manifestações auto-imunes relacionadas ao VHC ou ao tratamento com interferon (35).

Existe também associação da hepatite crônica pelo VHC com hepatite auto-imune (HAI), sendo detectados no soro do paciente o anticorpo antinúcleo (AAN) e anticorpo antimúsculo liso (AAML) e em particular o anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (AAMFR-1) (29, 36).

1.2. Hepatite Auto-imune

Originalmente descrita por Mackay em 1956, a HAI é doença inflamatória crônica do fígado, que leva a destruição progressiva do parênquima hepático e, na ausência de tratamento imunossupressor, evolui freqüentemente para cirrose. Acomete preferencialmente mulheres, há níveis séricos elevados de gamaglobulinas, presença de auto-anticorpos circulantes e, no estudo anátomo-patológico hepático observam-se infiltrado inflamatório portal com predomínio de plasmócitos, hepatite de interface e formação de rosetas de hepatócitos (37). Para se diagnosticar a doença utiliza-se sistema de escore definido pelo grupo internacional de HAI (Anexo

1), segundo revisão atualizada em 1999 (38).

A HAI é classificada em dois grupos, de acordo com os auto-anticorpos circulantes. O tipo 1 apresenta positividade para o AAN e para o AAML, com reatividade presumível contra o anticorpo antiactina (AAA). O tipo 2 caracteriza-se pela presença de AAMFR-1 em associação ou não com a reatividade do anticorpo anticitosol hepático tipo 1 (AACH-1). Foi sugerido terceiro tipo com positividade para o anticorpo antiantígeno hepático solúvel (AAHS)/anti-fígado e pâncreas (AAFP). No entanto, a existência desse grupo é amplamente questionada.

A maioria dos auto-anticorpos circulantes na HAI não apresenta especificidade para determinado órgão e nem é reconhecidamente patogênica. A reatividade está dirigida contra o DNA nuclear, enzimas e proteínas estruturais nucleares e citoplasmáticas. A agressão hepatocelular é mediada por citotoxicidade celular direta ou mediada por anticorpos (39), desconhecendo-se ainda o alvo antigênico desencadeador da doença. Linfócitos T ativados, principalmente CD4+, são encontrados em sangue periférico e nos espaços portais hepáticos.

Os principais *loci* envolvidos na predisposição genética à HAI encontram-se no MHC, no braço curto do cromossoma 6, codificando diferentes antígenos de HLA de acordo com a população analisada. Em relação à HAI tipo 1, verifica-se nos Estados Unidos e na Europa, uma predisposição genética relacionada aos haplótipos HLA-DR3 e DR4, codificadas pelos alelos DRB1*0301 e DRB1*0401 (40, 41). No Japão, México e Argentina os antígenos HLA-DR4 codificados pelos alelos

DRB1*0405, DRB1*0404 e DRB1*0405 (42-44) e no Brasil e na Argentina aos antígenos HLA-DR13 (42, 45, 46), codificados pelo alelo DRB1*1301. Em relação à HAI tipo 2 no Brasil, há maior associação ao HLA-DR7 (47). Os pacientes com reatividade para o AAAHS/LP apresentam suscetibilidade relacionada ao HLA-DR3 (48).

As formas de apresentação são variadas, porém a mais freqüente lembra quadros de hepatite aguda, com icterícia, colúria e acolia fecal em mulheres jovens, além de adinamia e astenia. Outra forma é a de descompensação de cirrose hepática, como ascite e hemorragia digestiva alta. A hepatite fulminante é pouco freqüente, mais comum nos pacientes portadores de HAI tipo 2 e HAI sem auto-anticorpos circulantes, denominada HAI sem marcadores. Manifestações extra-hepáticas, especialmente artralgia, são sintomas comuns. É freqüente que, no início, os pacientes sejam investigados com suspeita de doenças reumatológicas, principalmente lúpus eritematoso sistêmico e doença reumatóide (49).

1.3. O Antígeno Leucocitário Humano

1.3.1. Considerações Gerais

O antígeno leucocitário humano (HLA, da sigla em inglês para *human leucocitary antigen*) foi descrito por Dausset em 1958(50), que observou a presença de anticorpos no soro de pacientes politransfundidos contra antígenos leucocitários heterólogos. Posteriormente, tais antígenos foram associados também à rejeição contra transplantes e considerados equivalentes aos antígenos principais de histocompatibilidade descritos em

camundongos (50).

O papel do HLA como moléculas apresentadoras de antígenos só foi esclarecido na década de 80 (51) e grande parte do avanço no estudo dessas moléculas foi resultante dos esforços internacionais de pesquisadores que organizaram sucessivos encontros a partir de 1972 (52, 53).

O HLA é um nome geral dado a um grupo de genes na região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no cromossomo 6 humano, que codifica proteínas apresentadoras de antígenos na superfície celular. O HLA é utilizado em conjunção de números e letras para designar um alelo específico no *loci* do HLA. Os genes de HLA mais estudados são nove, classificados em: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRA e HLA-DRB1. Uma outra forma de classificação utilizada é aquela que os agrupa em MHC classe I e classe II.

A mais importante função conhecida pelas proteínas de HLA é a apresentação de peptídeos processados (antígenos) para as células T, embora devam existir ainda papéis adicionais desempenhados a serem conhecidos.

As proteínas do MHC de classe I e II são estruturas semelhantes. Ambos são heterodímeros transmembrana com um domínio extra-celular N-terminal que se liga a antígenos apresentadores de células T. A presença de domínios similares a imunoglobulinas nas proteínas de classe I e II sugerem que as proteínas de MHC e os anticorpos apresentam uma origem histórica comum. A Tabela 1 sumariza as principais características e propriedades do

MHC de classe I e II.

Tabela 1. Propriedades das proteínas de MHC classe I e II humano

	CLASSE I	CLASSE II
<i>Loci</i> genético	HLA-A, HLA-B, HLA-C	DP, DQ, DR
Estrutura da cadeia	Cadeia α + β 2 microglobulina	Cadeia α + cadeia β
Distribuição celular	A maioria das células nucleadas Células T citotóxicas	Células apresentadoras de antígenos (incluindo células B), células epiteliais do timo e células T auxiliaadoras
Fonte de fragmento peptídico envolvido na apresentação do antígeno	Proteínas produzidas no citoplasma	Membrana plasmática endocitada e proteínas extra-celulares
Domínio polimórfico	α 1 + α 2	α 1 + β 1
Reconhecimento de co-receptores	CD8	CD4

As proteínas de classe I do MHC consistem de uma cadeia α transmembrana, codificada por um gene de classe I do MHC e por uma pequena proteína extra-celular chamada β 2 microglobulina. A proteína β 2 microglobulina não abrange a membrana e não é codificada no grupo dos

genes do MHC. A cadeia α (45 kDa) é dividida em $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e o domínio $\alpha 3$ e a $\beta 2$ microglobulina (12 kDa), que estão próximos à membrana, são similares a um domínio de imunoglobulina. Essas duas cadeias ligam-se não covalentemente por pontes de dissulfeto formadas entre os domínios $\alpha 2$, $\alpha 3$ e β . Os dois domínios do N-terminal da cadeia α , que estão longes da membrana, contêm o aminoácido polimórfico (variável) que são reconhecidos pelas células T nas reações de transplante. Estes domínios ligam-se a peptídeos e apresentam-nos para as células T citotóxicas (54).

As proteínas de classe II do MHC também são heterodímeros com dois domínios conservados similares à imunoglobulina, próximos da membrana e com dois domínios N-terminal polimórficos (variáveis) longe da membrana. Ambas as cadeias α (35kDa) e β (28 kDa) são codificadas por genes presentes no MHC e ambas abrangem a membrana. A cadeia α e β ligam-se de forma não-covalente e possuem, cada uma, dois domínios extracelulares, respectivamente, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, $\beta 2$. Existem, ainda, uma região transmembrana e uma porção intracitoplasmática. As moléculas de HLA classe II apresentam extremidades abertas e podem acomodar peptídeos maiores, com cerca de 12 a 25 aminoácidos. As cadeias laterais destes peptídeos ligam-se às moléculas de HLA nos bolsões presentes na sua fenda e a afinidade de ligação da molécula com os antígenos dependem de características físico-químicas dos aminoácidos presentes nos bolsões. Os dois domínios polimórficos apresentam antígenos para células T auxiliaadoras (54, 55)

Figura 3. Genes do MHC

Figura 4. MHC classe I e II

A molécula de HLA DR possui apenas uma espécie da cadeia alfa, codificado pelo gene HLA-DRA. Na cadeia beta, há os genes DRB1, DRB3, DRB4 e DRB5. DRB2 é um pseudogene. DRB6 é um gene truncado, mas

que pode ser transcrito em humanos (56). A especificidade do HLA DR está determinada na subunidade alfa da molécula de HLA (57). No DR, a cadeia leve é polimórfica. As múltiplas cadeias leves e pesadas do HLA DR são codificadas em uma região de 5 centimorgans do cromossomo humano 6p21.1 (58). O polimorfismo identificado sorologicamente dos antígenos de HLA DR é determinado em duas regiões de variabilidade, com 6 aminoácidos, localizados nos primeiros 35 resíduos da região N-terminal da cadeia beta (59).

As proteínas de classe I e II são cruciais na apresentação de antígenos para as células T citotóxicas e auxiliaadoras, respectivamente. A proteína de classe I é expressa na maioria das células vertebradas e as proteínas de classe II estão normalmente restritas a células que interagem com as células T auxiliaadoras, como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Ambas as classes de proteínas do MHC têm um canal de ligação peptídica, em que se ligam pequenos fragmentos derivados de proteínas. Cada proteína de MHC pode ligar a um grande e característico grupo de peptídeos, que são produzidos intracelularmente pelas proteínas de degradação: as proteínas do MHC de classe I geralmente ligam-se a fragmentos produzidos no citosol, enquanto as proteínas de classe II do MHC ligam-se a fragmentos produzidos no compartimento endocitótico. A seguir, os peptídeos do MHC são transportados para a superfície celular. Complexos que contêm peptídeos de proteínas estranhas são reconhecidos por receptores de células T, que interagem com o peptídeo e a parede do canal de ligação peptídica. As células T também expressam co-receptores

de CD4 e CD8, que reconhecem regiões não-polimórficas das proteínas de MHC da célula alvo: células T auxiliaadoras expressam CD4, que reconhecem proteínas de classe II do MHC, enquanto células T citotóxicas expressam CD8, que reconhecem proteínas de classe I do MHC.

O polimorfismo das moléculas de HLA e a magnitude do repertório de receptores dos linfócitos T e B proporcionam ao organismo a capacidade de reconhecer e destruir a grande maioria dos patógenos presentes no meio ambiente. Porém essa diversidade também acarreta maior propensão ao desenvolvimento de auto-imunidade (60-62).

A maioria das doenças auto-imunes foi associada aos alelos de HLA de classe II, particularmente aos *loci* DRB1 e DQB1 (63-65). A associação de determinado haplótipo de HLA com uma doença específica é geralmente investigada mediante estudo de caso-controle, cujas frequências das especificidades de HLA são comparadas entre pacientes e indivíduos sadios de uma mesma população.

1.3.2. HAI e HLA

Os estudos iniciais de associação de HLA e hepatite auto-imune foram realizados nas décadas de 80 e 90, em pacientes caucasóides de descendência européia. Naquela época, os critérios internacionais de diagnóstico de hepatite auto-imune ainda não estavam padronizados e o VHC não havia sido isolado (66-71).

O avanço das técnicas de biologia molecular possibilitou a identificação das variantes alélicas dos antígenos HLA-DR associados à HAI

em diferentes grupos étnicos. A HA1 tipo 1 está associada ao haplótipo A1-B8-DR3-DQ2 em caucasianos (72) e com DR4 em pacientes japoneses (43).

No HC-FMUSP, estudo abrangendo 143 portadores de HAI revelou que os haplótipos de HLA variaram de acordo com o tipo sorológico da doença: os antígenos HLA DR13 e/ou DR3 conferiram susceptibilidade à HAI tipo 1, enquanto o HLA DQ7 foi relacionado à resistência. A associação com os antígenos HLA DR13 e/ou DR3 foi mais freqüentemente observada na infância e se correlacionou com a reatividade para o anticorpo antiactina, isolada ou associada à do AAN. Os alelos do HLA DR13 e DR3 influíram na idade de apresentação da HAI tipo 1, mas não identificaram pacientes com variáveis clínicas e laboratoriais peculiares. Os haplótipos de HLA DR7 e/ou DR3 conferiram predisposição à HAI tipo 2 e a associação da doença com o HLA DR7 correlacionou-se com a reatividade para o AAMFR-1, isolada ou associada à do AACH-1 (73).

1.4. Hepatite Crônica pelo VHC e HLA

A hepatite crônica pelo VHC pode cursar com variações na sua apresentação clínica, desde a infecção assintomática, com baixa agressão hepática, até a cirrose hepática e suas conseqüências. (74) analisaram o haplótipo do HLA de classe II comparativamente entre hepatopatas pelo VHC assintomáticos e cirróticos, e observaram que os alelos DRB1*12 (*1201 e *1202), DQB1*0301 e DRB3*03 estavam associados a casos mais brandos, enquanto o alelo DQB1*0503 foi menos comum nesse grupo de pacientes.

Há estudos mostrando a importância da associação de perfis de HLA e a infecção pelo VHC em relação à evolução, à carga viral e ao clareamento do vírus. O clareamento viral espontâneo do VHC foi associado aos alelos DQB1*0301 ou DRB1*1101 e DRB1*1104 9 (75). As cargas virais mais baixas foram associadas aos alelos A*34, B*56, DRB1*1502, enquanto cargas elevadas ao alelo B*4001. Por fim, a evolução da doença com maior dano hepático foi associada com variantes polimórficas DR14 e DR3 (76-78).

Trabalhos de Zavaglia *et al.* (79, 80) demonstraram a influência de fatores imunogenéticos tanto na suscetibilidade, como na proteção, à evolução da doença hepática crônica pelo VHC. Demonstrou-se frequência maior de HLA-B14 em pacientes com hepatite crônica persistente ou hepatite C ativa. A frequência de HLA-DR5 foi menor em pacientes com sorologia positiva para a hepatite C que no grupo controle, constituído por indivíduos sadios. Concluiu-se que na Itália pacientes com HLA-DR5 apresentaram fator protetor contra a contaminação pelo VHC. Em outro trabalho do mesmo autor, demonstrou-se que o transdímero DQA1*0201-DQB1*0201 levou a maior suscetibilidade à infecção crônica pelo VHC e o haplótipo DRB1*1104, DQA1*0501, DQB1*0301 protegem da infecção crônica.

Vejbaesya *et al.* (81) estudaram dois grupos de pacientes com sorologia positiva; um grupo com RNA do VHC positivo pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e o outro grupo com RNA do VHC negativo. Não houve diferença na frequência de HLA-A e HLA-B de classe II em ambos os grupos. A frequência de DRB1*0301 e de DQB1*0201 foi

significativamente maior no grupo com infecção persistente do que no grupo com infecção transitória. Em contrapartida, DRB1*0701 e DQA1*0201 foram significativamente menos freqüentes nos indivíduos infectados com o VHC.

Estudos Khakoo *et al.* de (82) revelaram que o HLA C influenciaria diretamente na resolução da infecção pelo VHC, já que, diante de interações inibidoras das células *natural killer* (NK), determinariam imunidade anti-viral em brancos e negros com baixa carga infecciosa.

Jurado *et al.*(83) estudaram o perfil de HLA em quarenta e nove pacientes com hepatite crônica e com reatividade do AAMFR-1 classificados em dois grupos: grupo A, composto de 15 portadores de altos títulos AAMFR-1, aminotransferases em níveis altos e sorologia para VHC negativa e o grupo B composto de 34 pacientes com sorologia positiva para o VHC, títulos mais baixos de AAMFR-1 e aminotransferases com níveis mais baixos (HAI tipo 2). O grupo controle para o grupo A consistia de 60 pacientes espanhóis saudáveis e 39 pacientes portadores de VHC sem a presença do AAMFR-1 para o grupo B. No grupo A, a freqüência dos alelos DR3 e DQ2 foi significativamente maior nos pacientes do que no grupo controle. No grupo B, o alelo DR7 foi encontrado em 82,3% dos pacientes e em 43,6% no grupo controle, com diferença estatística significativa, e a freqüência do alelo DQ2 estava aumentada nos pacientes, mas não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle.

Baseados nessas informações, o presente estudo propõe analisar o haplótipo de HLA nos portadores de infecção crônica pelo VHC, com características de HAI.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

Os objetivos do presente projeto são:

- 2.1. Investigar a presença de marcadores laboratoriais de auto-imunidade e aspectos anátomo-patológicos compatíveis com HAI em portadores de infecção pelo VHC;
- 2.2. Analisar os alelos de HLA em portadores de VHC com e sem marcadores de auto-imunidade, estabelecendo diferenças entre esses dois grupos.
- 2.3. Comparar os alelos de HLA dos portadores de VHC com características de auto-imunidade com os dos portadores de HAI.

CASUÍSTICA e MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1.CASUÍSTICA

Os pacientes estudados foram provenientes dos ambulatórios de Hepatologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), matriculados no período entre janeiro de 1997 a maio de 2006, com o diagnóstico de hepatite crônica pelo VHC. Os pacientes foram divididos em grupos, com e sem características de auto-imunidade associada.

3.1.1. Critérios de Inclusão:

Foram incluídos os indivíduos que preencheram todos os critérios a seguir:

3.1.1.1. sorologia positiva para VHC (ELISA de terceira geração) e presença de RNA viral confirmada por técnica de PCR;

3.1.1.2 Consentimento do paciente por escrito, após esclarecimento verbal e escrito. Anexo 2

Os pacientes com hepatite crônica pelo VHC selecionados para pesquisa do HLA de classe II DR e DQ foram aqueles que atingiram o escore de >10 (provável ou definitivo), segundo os critérios diagnósticos do grupo internacional de estudos da HAI (Anexo 1) (diagnóstico provável de HAI) ou reatividade para o anticorpo antiactina ou AAMFR-1 com títulos acima $\geq 1/40$. Pacientes com o anticorpo antimúsculo liso com padrão glomerular positivo com títulos $\geq 1/40$ foram selecionados para pesquisa posterior do anticorpo antimúsculo liso - padrão de túbulo e do anticorpo

antiactina em células de fibroblastos.

O grupo controle foi composto por 29 pacientes com hepatite crônica pelo VHC sem nenhum marcador de hepatite auto-imune.

3.1.2. Critérios de Exclusão:

3.1.2.1. Recusa por parte do paciente de participar da pesquisa;

3.1.2.2. Impossibilidade de obtenção de amostras de sangue e DNA;

3.1.2.3. Ausência de dados no prontuário médico.

3.2. MÉTODOS

A partir do número total inicial, foram pesquisados os auto-anticorpos hepáticos e outros auto-anticorpos circulantes, as características histológicas da biópsia hepática (quando realizada), e os parâmetros bioquímicos como níveis de aminotransferases e de gamaglobulina. Estes dados foram obtidos retrospectivamente, através de levantamento de resultados dos exames realizados na rotina do Laboratório Central e dos laudos do Serviço de Anatomia Patológica, disponíveis no sistema informatizado do HC-FMUSP.

3.2.1. Obtenção de dados clínicos

Os dados clínicos foram obtidos retrospectivamente por revisão de prontuários, realizada por único pesquisador. Foram obtidos os seguintes dados: sexo, data de nascimento, forma mais provável de aquisição da infecção pelo VHC quando descritos, antecedentes de uso de drogas ilícitas e de ingestão alcoólica, doença auto-imune associada, histórico de

medicações utilizadas, antecedentes de doença auto-imune em familiares de primeiro grau.

3.2.2. Análise histopatológica

As biópsias hepáticas, realizadas neste período, foram obtidas do arquivo de dados da anatomia patológica disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. Estas biópsias foram classificadas conforme as normas do consenso nacional sobre classificação das hepatites crônicas, segundo a rotina do serviço (Anexo 3) (84). As alterações histológicas sugestivas de HAI consideradas foram atividade peri-portal 4, atividade parenquimatosa 3 e 4, presença de rosetas, infiltrado inflamatório com predomínio de plasmócitos ou necrose hepatocitária confluyente.

3.2.3. Obtenção de dados laboratoriais

Foram obtidas as seguintes variáveis laboratoriais: ALT, AST, gama glutamil transferase, fosfatase alcalina, auto-anticorpos hepáticos e outros auto-anticorpos circulantes. Os dados foram preferencialmente aqueles do período da admissão na instituição ou do momento do diagnóstico.

3.2.3.1. Pesquisa de auto anticorpos hepáticos: levantamento dos auto anticorpos hepáticos realizados no período em estudo:

Foram obtidos os resultados da pesquisa de auto-anticorpos hepáticos realizados rotineiramente no laboratório de provas funcionais da Disciplina de Gastroenterologia Clínica do Departamento de Gastroenterologia da FMUSP.

Dos casos que apresentaram Anticorpo antimúsculo liso - padrão de glomérulo (AAML-G), 38 possuíam soro disponível, sendo que seis desses apresentaram positividade para o Anticorpo antimúsculo liso -padrão de túbulo (AAML-T). Assim, dos 38 casos foram reavaliados em relação ao anticorpo antiactina (AAA).

Em especial, para se identificar os pacientes portadores do Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim (AAMFR-1), partiu-se da lista de resultados da rotina de auto-anticorpos do Laboratório de Provas Funcionais do Departamento de Gastroenterologia no período de 2000 a março de 2006. Quando havia positividade deste marcador, investigou-se a presença do VHC. Além disso, os 1312 casos com sorologia positiva para o VHC também foram checados em relação à reatividade para o AAMFR-1.

As técnicas utilizadas estão descritas a seguir.

Os materiais, soluções, reagentes e equipamentos estão listados no Anexo 4.

3.2.3.2. Técnica para pesquisa de auto-anticorpos hepáticos (85):

3.2.3.2.1. Reação de Imunofluorescência indireta:

Para a reação de imunofluorescência indireta utilizaram-se cortes de fígado, rim e estômago de rata, congelados lentamente em nitrogênio líquido e estocado a -80°C . Posteriormente os blocos com os fragmentos dos três órgãos foram submetidos a cortes com criostato, a -25°C , com espessura de 4 μm , e dispostos em lâminas que, depois de estabilizadas em temperatura

ambiente, foram envoltas em papel alumínio e armazenado a -20°C .

Em cada corte foram aplicados 100 μl de soros diluídos a 1/40 e 1/80 em PBS-Tween 20, como triagem. As lâminas foram incubadas a 37°C por trinta minutos em câmara úmida. Posteriormente foram submetidas a duas lavagens com PBS, por cinco minutos cada. O substrato foi incubado com o conjugado imunoglobulina de carneiro marcada com isotiocianato de fluoresceína diluída em PBS, por mais 30 minutos, a 37°C , em câmara úmida, com duas lavagens subseqüentes em PBS, como descritas acima. Em seguida, realizou-se a leitura em microscópio de imunofluorescência.

3.2.3.3. Pesquisa de anticorpo antiactina (antimicrofilamentos)

Após seleção de amostras positivas para o anticorpo antimúsculo liso, padrão glomerular com títulos $\geq 1/40$, a pesquisa do anticorpo antiactina foi realizada em cultura de fibroblastos humanos (prepúcio de menino submetido a postectomia). Em toda reação foram incluídos controles positivos e negativos.

Os soros foram diluídos a 1/10 e 1/40 em PBS com EDTA 0,034M. Após adicionar 50 μl dos soros diluídos, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS, sendo de cinco minutos cada lavagem. Utilizaram-se 50 μl da solução de conjugado, anti-IgG humano marcado com fluoresceína diluído em PBS. Incubaram-se as lâminas, novamente por 30 minutos a 37°C em câmara úmida que foram lavadas duas vezes com PBS, cinco minutos cada lavagem. Finalizou-se a reação montando-se a lâmina

com glicerina tamponada com fosfato pH 8,6 e lamínula. Sempre foi tomado o cuidado para as células não secarem.

3.2.4. Pesquisa do HLA

A pesquisa do HLA foi realizada a partir de amostras de DNA extraídas de sangue periférico, de acordo com técnicas estabelecidas no Laboratório de Imunopatologia de Transplantes, Prof. Dr. Jorge Kalil Filho Setor de HLA, Biologia Molecular.

O grupo controle do estudo consistiu de portadores de VHC que não apresentaram marcador de auto-imunidade. Inicialmente utilizaram-se, para a extração de DNA, amostras de sangue congeladas a -20°C nos últimos anos; porém, não se obteve material adequado. Partiu-se, então, para nova coleta de sangue periférico e extração de DNA de material a fresco, com melhores resultados. No período da segunda quinzena de março de 2006 foram colhidas aleatoriamente 29 amostras de sangue de pacientes com hepatite crônica pelo VHC sem os critérios de auto-imunidade previamente estabelecidos, que retornaram em consulta ambulatorial de rotina.

Foram analisados os alelos do HLA dos pacientes que apresentaram escores do grupo internacional de estudos da HAI ≥ 10 , pacientes AAMFR-1 e anti-VHC positivos e pacientes com AAML-T e AAA, que corresponderam aos casos do grupo de estudo.

As técnicas utilizadas estão descritas a seguir.

3.2.4.1. Extração de DNA de sangue periférico pela técnica de DTAB/CTAB (86)

3.2.4.1.1. Técnica de extração do DNA

Centrifugaram-se as amostras de sangue por 10 minutos a 1500 rpm e separou-se um mililitro de buffy coat transferindo 500 µl da suspensão celular. Adicionaram-se 500 µl de DTAB 12% e homogeneizou-se a solução por inversão por 15 a 30 segundos. Incubou-se o *buffy coat* por cinco minutos a 68°C (65 a 72°C) em banho-maria. Adicionou-se um mililitro de clorofórmio e homogeneizou-se imediatamente por inversão vigorosamente durante 15 a 30 segundos. Centrifugou-se por dois minutos a 10000 rpm para a formação de três camadas. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo de 1,5 ml contendo um mililitro de CTAB 0,5% e inverteu-se o tubo até formar o precipitado. Após esse procedimento, centrifugou-se por 2 minutos a 10000 rpm. Dissolveu-se o *pellet* em 300 µl de NaCl 1.2 M e ressuspendeu-o posteriormente. Adicionaram-se 750 µl de etanol 100% à temperatura ambiente e aguardou-se a precipitação do DNA e centrifugou-se por dois minutos a 13000 rpm. Lavou-se uma vez com um mililitro de etanol a 70% e centrifugou-se novamente por dois minutos a 13000 rpm. Descartou-se o etanol e secaram-se as paredes do tubo sem tocar no DNA. Por final dissolveu-se o DNA em 200 µl de água bidestilada Mili Q em autoclave e suspendeu a mistura delicadamente até sua dissolução completa.

3.2.4.2. PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*)

3.2.4.2.1. Princípio:

Para a reação de amplificação dos genes HLA-DR e DQ utilizaram-se iniciadores específicos para polimorfismo no éxon 2. A presença do alelo ou grupo de alelos foi baseada na presença ou ausência do produto amplificado. Esse método é considerado de baixa/média resolução, pois não permite, em grande parte, a definição de um alelo específico, mas sim um grupo de alelos, que correspondem às especificidades sorológicas.

3.2.4.2.2. Etapas da reação:

- Amplificação (termociclador): 30 ciclos
- Detecção (Eletroforese em gel de agarose+ brometo de etídio)
- Análise e interpretação dos resultados

A análise do conjunto de bandas positivas identificou a presença de alelo ou de grupos de alelos. Foi realizada com o auxílio de software fornecido pelo fabricante, ou manualmente, de acordo com o mapa descritivo de reações do Kit (anexo 5).

3.2.4.2.3. Kit Comercial

3.2.4.2.4. Micro SSP™ HLA DNA Typing Trays (One Lambda, Inc., CA, USA)

Utilizado para determinação de alelos ou grupos de alelos de Classe

II pela técnica de PCR – SSP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Primers*).

3.2.4.2.5. *Primers* utilizados

As placas *Micro SSP™ HLA DNA Typing* contêm conjunto de *primers* liofilizados de sequência específica para amplificação dos alelos HLA de Classe II dos *primers* 5' e 3' de controle interno, que são *primers* que amplificam um região gênica não polimórfica (AMP A e AMP B), funcionando como controle positivo da reação.

Seqüência de etapas:

- Pipetou-se um microlitro de H₂O nos poços controles;
- Pipetou-se a enzima *Taq* polimerase, 5 unidades/ μ l, no tubo D-Mix;
- Pipetaram-se 9 μ l da D-Mix/*Taq* no controle negativo;
- Adicionaram-se 39 μ l da amostra de DNA na concentração de 100 ng/ μ l no tubo de D-Mix;
- Acrescentaram-se 10 μ l da mistura DNA/D-Mix/*Taq* em todos os poços, exceto no controle negativo;
- Tamparam-se os tubos com a PCR *tray seals*;
- Acoplou-se a placa teste no termociclador.

3.2.4.5.6. Gel de eletroforese

Após a reação de PCR ter sido concluída:

- Aplicaram-se 10 μ l do produto amplificado previamente aspirado com o pipetador múltiplo, no gel de agarose 2,5% imerso no

tampão com o devido suporte guia inserido na base da cuba;

- As amostras foram submetidas à corrente de 140-150 volts, 80 mA por 5 minutos;
- Posteriormente este gel foi fotografado e analisado.

3.2.4.2.7. Leitura e nomenclatura do produto de eletroforese

Para fins de padronização da leitura dos resultados obtidos em gel de eletroforese, a nomenclatura utilizada foi a do equivalente sorológico segundo o sistema de HLA, incluindo genes expressos e pseudogenes utilizando a padronização estabelecida no consenso do WHO Nomenclature Committee (87).

3.2.5. Análise Estatística

As frequências das especificidades de HLA dos pacientes e do grupo-controle foram comparadas usando o teste de χ^2 de Pearson com a correção de continuidade de Yates ou o teste exato de Fisher, quando apropriado, isto é, quando os valores esperados encontrados, ao se realizar o teste χ^2 de Pearson, forem inferiores a 5. O nível de significância alfa estabelecido foi de 5%.

A hipótese de nulidade testada foi a não existência de associação entre as variáveis “positividade de determinado alelo do HLA” x “característica de auto-imunidade em portadores de VHC”. A interpretação dos resultados do χ^2 foi a seguinte: χ^2 igual a zero, então não existe associação entre as

variáveis; quanto maior o χ^2 , maior a chance de existir associação entre elas.

Em caso de existência de associação (rejeição da hipótese de nulidade), foi calculado o coeficiente de associação de Yule, cuja faixa de variação se estende de -1 a +1, sendo 0 “ausência de associação”, -1 “associação perfeita negativa” e +1 “associação perfeita positiva”.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Casuística

Inicialmente, 1312 casos de hepatite crônica pelo VHC, matriculados nos ambulatórios de Hepatologia do Departamento de Gastroenterologia do HC-FMUSP, no período de janeiro de 1997 a maio de 2006, foram incluídos no estudo.

4.2.1. Dados Clínicos

Em relação ao sexo, 679 (52%) dos pacientes eram do masculino, e 633 (48%) do feminino (Figura 5) e a distribuição segunda faixa etária está expressa na Figura 6.

Figura 5 Distribuição dos portadores de VHC (n=1312) de acordo com sexo.

Figura 6. Distribuição dos portadores de hepatite crônica pelo VHC, de acordo com a faixa etária (n= 1312).

4.2.2. Análise histopatológica

Dos 1312 casos analisados, 361 não realizaram biópsia hepática; dos 951 que a realizaram, 145 apresentaram marcadores histológicos mais comumente observados na HAI. Em alguns casos, um mesmo paciente realizou mais de uma biópsia hepática. Os achados mais freqüentes foram: 100 biópsias hepáticas com estadiamento 4 de atividade inflamatória periportal, 50 com estadiamento 3/4 de atividade inflamatória lobular, cinco com rosetas e infiltrado plasmocitário e sete com necrose pan-acinar.

Figura 7. Distribuição dos casos com biópsia hepática, segundo presença de marcadores histológicos compatíveis com HAI (n=951).

Nota: Foram considerados marcadores compatíveis com HAI atividade peri-portal 4 e parenquimatosa 3 ou 4, presença de rosetas e infiltrado plasmocitário ou necrose panacinar.

4.2.3. Dados laboratoriais

Dos 1312 casos, 290 pacientes apresentaram marcador de auto-imunidade (presença de auto-anticorpos circulantes e ou biópsia hepática sugestiva de HAI). Do total de 290 prontuários, foram obtidos dados retrospectivos de 256. Trinta e quatro prontuários não foram localizados na Divisão de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da USP.

Os 256 pacientes foram analisados de acordo com os critérios diagnósticos do grupo internacional de estudos da HAI e 44 pacientes preencheram critérios de diagnóstico provável de hepatite auto-imune, com o escore variando de 10 a 14. Nenhum paciente atingiu o escore para

diagnóstico definitivo. Dos 44 pacientes, 17 apresentaram escore 10, 14 escore 11, oito escore 12, quatro escore 13 e apenas um escore 14 (Figura 8) (anexo 6).

Dos 44 pacientes que preencheram os critérios diagnósticos do grupo internacional de estudos da HAI, nove tinham diabetes mellitus, sendo 3 diabéticos insulino-dependente e seis diabéticos não insulino-dependente, seis pacientes apresentaram doença reumatóide, três doença de Graves, dois tireoidite de Hashimoto, quatro lupus eritematoso sistêmico, dois síndrome de Sjögren, um vitiligo e um fibromialgia. Somente um pai de um paciente apresentava vitiligo, sem outras doenças auto-imunes associadas.

Figura 8. Pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44).

Esses pacientes foram agrupados segundo o sexo, faixa etária e raça. Houve predominância do sexo feminino, 41 pacientes (93%) (Figura 9), da faixa etária acima de 50 anos, 37 pacientes (84%) (Figura 10) e da raça

branca 35 pacientes (79%) (Figura 11).

Figura 9. Distribuição do sexo dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44).

Figura 10. Distribuição da faixa etária dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI (n=44).

Figura 11. Distribuição dos pacientes com diagnóstico provável de HAI segundo o

sistema de escore do grupo internacional de estudos da HAI, de acordo com a etnia (n=44).

Dos 1312 pacientes, 347 não realizaram auto-anticorpos hepáticos e dos 965 pacientes em que foram pesquisados, 271 pacientes apresentaram reatividade para pelo menos um auto-anticorpo. Foi verificada a presença de fator antinúcleo (AAN) em 162 casos (figura 12), fator reumatóide em seis, anticorpo antimúsculo liso - padrão de estômago (AAML-E) em 62 (figura 13), anticorpo antimúsculo liso -padrão de vaso (AAML-V) em 35 (figura 14), anticorpo antimúsculo liso - padrão de glomérulo (AAML-G) em 62 (figura 15), anticorpo antimúsculo liso -padrão de túbulo (AAML-T) em seis (Figura 17, 18 e 19), anticorpo antiactina (AAA) em dois, anticorpo anticélula parietal (AACPA) em 36, anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 (AAMFR-1) em 12, anticorpo antimitocôndria (AAM) em dois, anticorpo antiendomísio (AAE) em dois, anticorpo anticitoplasma de neutrófilo (ANCA) em um, anticorpo anti-Sm e anti-RNP em um, anti-Ro em um, anticorpo anti-TPO em 12 e anticorpo antitireoglobulina em 12 . A Figura 16 ilustra, por meio de um fluxograma, esses resultados.

Figura 12. Distribuição dos casos com reatividade para o fator antinúcleo, segundo títulos (n=162).

Figura 13. Distribuição dos casos com reatividade para anticorpo antimúsculo liso - padrão de estômago, segundo títulos (n= 62).

Figura 14. Distribuição dos casos com reatividade para o anticorpo antimúsculo liso - padrão de vaso, segundo títulos (n= 35).

Figura 15. Distribuição dos casos com reatividade para o anticorpo antimúsculo liso - padrão de glomérulo, segundo títulos (n= 62).

Figura 16 Fluxograma do levantamento retrospectivo dos auto-anticorpos em 1312 pacientes com hepatite crônica pelo VHC, e número de casos identificados por tipo de anticorpo.
Nota: encontra-se nas folhas a seguir.

Figura 17. Distribuição dos pacientes com anticorpo antimúsculo liso -padrão de túbulo, segundo sexo (n=6).

Figura 18. Distribuição dos pacientes com anticorpo antimúsculo liso – padrão de túbulo, segundo faixa etária (n=6).

Figura 19. Distribuição dos pacientes com anticorpo antimúsculo liso – padrão de túbulo, segundo faixa etária (n=6).

Doze pacientes apresentaram infecção pelo VHC e reatividade do AAMFR-1, sendo 10 (83%) pacientes do sexo feminino (figura 20), em faixa etária mais jovem (figura 21) e todos da raça branca.

Figura 20. Distribuição dos pacientes com anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1, segundo sexo (n= 12).

Figura 21. Distribuição dos casos com anticorpo antimicrosoma de fígado e rim tipo 1, segundo faixa etária (n=6).

Em relação aos níveis de gamaglobulinas, não se obtiveram os dados de 43 pacientes, considerando-se, portanto, um total de 1269 casos analisados. Entre eles, 629 apresentaram níveis normais de gamaglobulinas, 479 níveis entre uma e uma vez e meia o limite superior do valor de referência; 137 níveis entre uma vez e meia e duas vezes o valor de referência e 24 apresentaram níveis de gamaglobulina acima de duas vezes o valor de referência.

Figura 22. Distribuição dos casos segundo níveis de gamaglobulina (n=1269).
Nota: NL= normais, X=número de vezes de elevação em relação ao limite máximo normal.

Em relação aos níveis de aminotransferases, dos 1312 casos, 477 apresentaram níveis de ALT normais, 748 entre uma e cinco vezes o valor de referência, 69 entre cinco e oito vezes o valor de referência e 18 apresentam valores maiores do que oito vezes o valor de referência (figura 23). Em relação à AST, 496 pacientes apresentaram níveis normais, 739 níveis de entre uma e cinco vezes o valor de referência, 65 valores entre cinco e oito vezes o valor de referência e 12 níveis superiores a oito vezes o valor de referência (figura 24).

Figura 23. Distribuição dos pacientes segundo níveis de ALT (n=1312)

Nota: NL= normais, X=número de vezes de elevação em relação ao limite máximo normal.

Figura 24. Distribuição dos pacientes segundo níveis de AST (n=1312)

Nota: NL= normais, X=número de vezes de elevação em relação ao limite máximo normal.

4.2.4. Pesquisa dos alelos do HLA

Dos 44 pacientes que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI, foi possível a análise dos alelos do HLA de 31 pacientes. Em um caso, não se obteve DNA das várias amostras de sangue em

repetidas tentativas. Nos demais 13 casos, não foi possível obter amostras de sangue, pois os indivíduos não foram localizados ou recusaram-se a comparecer ao hospital.

Dos 12 pacientes com reatividade para o AAMFR-1, procedeu-se análise dos alelos do HLA em sete. Em três, não se obteve DNA analisável nas amostras de sangue disponíveis. Em dois, não foi possível obter a amostra de sangue.

Dos seis casos com AAML-T, apenas dois apresentaram reatividade para AAA. Um deles não forneceu amostra de sangue para estudo. Por esse motivo, optou-se por incluir também nessa análise, os quatro pacientes sem reatividade para AAA.

Em relação à distribuição do sexo dos grupos estudados, houve predominância do sexo feminino, 28 no grupo de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico de HAI ($p=0,002$), sete no grupo portadores de VHC e presença de AAMFR-1 ($p=0,02$). No grupo portadores de VHC e presença de AAML-T observaram-se quatro sexo masculino ($p=0,17$), mas o único caso com reatividade para o AAA era do sexo feminino (figura 25).

Segundo a distribuição por idade, no grupo de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico de HAI houve preponderância de pacientes com idade superior a 40 anos (não houve significância estatística em relação ao grupo controle, $p=0,95$); no grupo portadores de VHC e presença de AAMFR-1 constatou-se preponderância de pacientes mais jovens, abaixo de 40 anos (cinco pacientes, $p=0,001$) e no grupo portadores

de VHC e presença de AAML-T três pacientes, $p=0,08$ (Figura 26).

Quanto à distribuição dos níveis de gamaglobulina, a grande maioria apresentou níveis de até 1,5 vezes os valores da normalidade, no grupo de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico de HAI foram 22 pacientes ($p=0,44$), no grupo de portadores de VHC e presença de AAMFR-1 cinco pacientes ($p=0,30$) e no grupo de portadores de VHC e presença de AAML-T quatro pacientes ($p=0,44$) (figura 27).

Figura 25. Distribuição dos pacientes do sexo feminino nos grupos controle ($n=29$), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI ($n=31$), VHC com presença de AAMFR-1 ($n=7$) e VHC com presença de AAML-T ($n=5$) cujos perfis de HLA foram analisados

Figura 26. Distribuição segundo intervalo de faixa etária dos pacientes nos grupos controle (n=29), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI (n=31), VHC com presença de AAMFR-1 (n=7) e VHC com presença de AAML-T (n=5) cujos perfis de HLA foram analisados

Figura 27. Distribuição segundo níveis de gamaglobulina nos grupos controle (n=29), VHC com critérios de diagnóstico provável de HAI (n=31), VHC com presença de AAMFR-1 (n=7) e VHC com presença de AAML-T (n=5) cujos perfis de HLA foram analisados.

Nota. X=número de vezes de elevação em relação ao limite máximo normal.

A figura 28 ilustra os resultados da tipagem de HLA de classe II de um paciente da presente série.

Figura 28. Gel de eletroforese exemplificando a tipagem do HLA classe II de um paciente com VHC e critérios diagnósticos de HAI. Observam-se os alelos que correspondem aos equivalente sorológicos DR4, DR7, DR53, DQ2 e DQ3.

Os estudos do perfil de HLA nos pacientes com VHC e critérios de diagnóstico provável de HAI revelaram preponderância do HLA-DR4 com 14 pacientes (45,1% vs 3,4% do grupo controle, $p=0,0006$) e HLA-DQ3 em 21 pacientes (67,7% vs 37,9% do grupo controle, $p=0,04$) e uma menor frequência do HLA-DR2 com três pacientes (9,6% vs 34,4% do grupo controle, $p=0,04$) e HLA-DR51 com três pacientes (9,6% vs 34,4%, $p=0,04$). Esses resultados são apresentados nas tabelas 2,3 e 4.

Tabela 2. Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI *versus* controle

HLA	VHC+HAI		Controle		p (Fisher)
DRB1*	n=31	%	n=29	%	
4	14	45,1	1	3,4	0,0006 *
6	9	29,0	6	20,0	0,65
3	8	25,8	6	20,0	0,87
1	6	19,3	5	17,2	0,90
7	6	19,3	11	37,2	0,19
8	3	9,6	5	17,2	0,63
9	3	9,6	3	10,3	0,73
5	3	9,6	4	13,7	0,92
2	3	9,6	10	34,4	0,04 **
10	2	6,5	3	10,3	0,94
00	1	3,2	3	10,3	0,56
x	1	3,2	0	0	0,97

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

* Coeficiente de Yule=0,92

** Coeficiente de Yule=- 0,66

Tabela 3. Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI *versus* controle

HLA	VHC+HAI		Controle		p (Fisher)
DRB*	n=31	%	n=29	%	
52	18	58,0	16	55,1	0,97
53	18	58,0	13	44,8	0,44
51	3	9,6	10	34,4	0,04 *

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

* Coeficiente de Yule=- 0,66

Tabela 4. Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC que preencheram os critérios de diagnóstico provável de HAI *versus* controle

HLA	VHC+HAI		Controle		p (Fisher)
DQB1*	n=31	%	n=29	%	
3	21	67,7	11	37,9	0,04 *
1	19	61,2	21	72,4	0,52
2	15	48,3	14	48,2	0,80
4	5	16,1	5	17,2	0,81
00	0	0	1	3,4	0,97

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

* Coeficiente de Yule=0,54

Nos portadores de VHC e com AAMFR-1 destaca-se maior frequência do HLA-DR7 em quatro pacientes (57,1% vs 37,9% do grupo controle, p=0,31) e do HLA-DQ2 em seis pacientes (85,7% vs 48,2% do grupo controle, p=0,07). Não houve a identificação do perfil do HLA-DQ3 (0% vs 37,9% do grupo controle, p=0,06). Tabelas 5,6 e 7.

Tabela 5. Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC com AAMFR-1 *versus* controle

HLA	VHC+AAMFR-1		Controle		p (Fisher)
DRB1*	n=7	%	n=29	%	
7	4	57,1	11	37,9	0,31
1	2	28,6	5	17,2	0,30
8	2	28,6	5	17,2	0,30
3	2	28,6	6	20,7	0,33
6	2	28,6	6	20,7	0,33
9	1	14,3	3	10,3	0,43
2	1	14,3	10	34,5	0,23
10	0	0	3	10,3	0,51
5	0	0	4	13,8	0,40
00	0	0	3	10,3	0,51
4	0	0	1	3,4	0,80

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

Tabela 6. Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC com AAMFR-1 *versus* controle

HLA	VHC+AAMFR-1		Controle		p (Fisher)
DRB*	n=7	%	n=29	%	
52	4	57,1	16	55,1	0,32
53	4	57,1	13	44,8	0,27
51	1	14,3	10	34,5	0,23

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

Tabela 7. Frequência dos alelos de HLA DQB1* de portadores de VHC com AAMFR-1 *versus* controle

HLA	VHC+AAMFR-1		Controle		p (Fisher)
DQB1*	n=7	%	n=29	%	
2	6	85,7	14	48,2	0,07
1	5	71,4	21	72,4	0,35
4	2	28,5	5	17,2	0,30
3	0	0	11	37,9	0,06
00	0	0	1	3,4	0,80

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

Nos portadores de VHC com destaca-se maior frequência do HLA-DR1 e DR5 com dois pacientes em cada perfil (40% vs 17,2% e 13,8% do grupo controle, p= 0,22 e p= 0,18 respectivamente), três pacientes com o HLA-DR52 e DQ3 (60% vs 55,2% e 37,9%, p=0,36 e p=0,25 respectivamente) e quatro pacientes com HLA-DQ1 (80% vs 72,4%, p=0,41). Tabelas 8,9 e 10.

Tabela 8. Frequência dos alelos de HLA DRB1* de portadores de VHC com AAML-T *versus* controle

HLA	VHC+AAML-T		Controle		p (Fisher)
DRB1*	n=5	%	n=29	%	
1	2	40,0	5	17,2	0,22
5	2	40,0	4	13,8	0,18
3	1	20,0	6	20,7	0,44
4	1	20,0	1	3,4	0,44
7	1	20,0	11	37,9	0,31
10	1	20,0	3	10,3	0,39
6	1	20,0	6	20,7	0,44
2	1	20,0	10	34,5	0,35
8	0	0	5	17,2	0,43
9	0	0	3	10,3	0,61
00	0	0	3	10,3	0,61

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

Tabela 9. Frequência dos alelos de HLA DRB* de portadores de VHC com AAML-T *versus* controle

HLA	VHC+AAML-T		Controle		p (Fisher)
DRB*	n=5	%	n=29	%	
52	3	60,0	16	55,2	0,36
51	1	20,0	13	44,8	0,24
53	1	20,0	10	34,5	0,35

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

Tabela 10. Frequência dos alelos de HLA DQB1* de portadores de VHC com AAML-T *versus* controle

HLA	VHC+AAML-T		Controle		p (Fisher)
DQB1*	n=5	%	n=29	%	
1	4	80,0	21	72,4	0,41
3	3	60,0	11	37,9	0,25
2	2	40,0	14	48,3	0,35
4	0	0	5	17,2	0,43
00	0	0	1	3,4	0,85

p<0,05 considerado estatisticamente significativo

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O presente estudo identificou 62 casos de portadores de hepatite C com marcadores de auto-imunidade em uma série de 1312 pacientes. Muitas foram as barreiras transpostas para constituir os resultados apresentados: extração inadequada de DNA de amostras de sangue congeladas a -20°C , falta de disponibilidade de alguns pacientes de comparecerem ao ambulatório para coleta de nova amostra de sangue e ausência de informações clínicas e laboratoriais no levantamento retrospectivo de prontuários. Assim mesmo, constituiu-se uma casuística privilegiada, se comparada às demais publicadas sobre o mesmo assunto na literatura médica. Embora a associação entre fenômenos auto-imunes e o VHC seja bastante reconhecida, não encontramos publicações a respeito sobre o assunto analisando os pacientes segundo o sistema de escore do grupo Internacional de Estudos da HAI.

Quanto aos critérios para constituição do grupo com auto-imunidade hepática, é possível que a adoção do sistema de escore do Grupo Internacional de Estudo da HAI (anexo 1) tenha representado um rigor excessivo, visto que, pelos parâmetros adotados, descontam-se três pontos em todo indivíduo com sorologia positiva para VHC e não se considera a resposta à terapêutica na maioria dos casos, porque as drogas administradas na hepatite auto-imune geralmente não o são em portadores de hepatite C.

É interessante observar que após definirmos o grupo que seria estudado houve preponderância do sexo feminino. Inicialmente a distribuição era similar (48% do sexo feminino) e após análise, segundo os critérios de seleção, o sexo feminino representou 93% dos casos, estatisticamente significativa. Contudo, esse resultado não pode ser supervalorizado, porque o escore creditado a esse parâmetro, de acordo com o grupo internacional de estudos da HAI, esse critério certamente representou viés na proporção dos sexos.

A idade dos pacientes com VHC com critérios diagnósticos de HAI foi notoriamente mais avançada em relação à da casuística total e em relação aos demais subgrupos: predominou a faixa etária entre 50 e 60 anos, e apenas um paciente apresentou-se com menos de 40 anos. Uma explicação possível para esse fato seria que pacientes, com propensão genética para auto-imunidade, passariam a manifestá-la após estímulo antigênico prolongado, produzido pela infecção viral ao longo de décadas. Essa hipótese também foi sugerida para a doença celíaca, que, no entanto, é doença auto-imune por definição (88). A positividade de anticorpos antimicrofilamentos e a presença de outras doenças auto-imunes em associação estão presentes mais freqüentemente em adultos que em crianças (89). Mesmo nos pacientes com hepatite auto-imune, a presença de outra doença auto-imune parece ser mais comum em adultos que em adultos que em criança. Isso foi observado ao se comparar doentes norte americanos com doentes brasileiros portadores de HAI, as diferenças significantes ocorreram basicamente entre os grupos menores do que 18

anos e ≥ 18 anos (90). Todavia, quando comparamos o grupo de pacientes com VHC com características de hepatite auto-imune com o grupo controle sem marcadores de auto-imunidade, não se observou diferença estatisticamente significativa quanto à faixa etária. Isso se explica em razão do grupo controle não fazer parte da casuística inicial geral da qual se formou o grupo com manifestações auto-imunes. Em razão da dificuldade de se extrair o DNA das amostras guardadas a -20°C , foi necessária a coleta de novo material de pacientes que compareceram em determinado período no ambulatório com as mesmas características propostas para o grupo controle. Essas novas amostras foram provenientes de pacientes que poderiam ter participado ou não da casuística inicial. Não se preocupou em manter a mesma distribuição quanto a faixa etária inicial.

Admite-se que diversos fatores ambientais estejam implicados no desenvolvimento da HAI, tais como o vírus da hepatite A (91), drogas como alfa-metil-dopa, infliximab e ezetimiba, e vacinação (92). A medida em que se reconheça a associação entre HAI e a infecção crônica pelo VHC, descrita em populações de diversas regiões do mundo (93-97), o sistema de escore do Grupo Internacional de Estudo da HAI em relação à pontuação negativa na presença do VHC deva ser reconsiderado. A dificuldade de se utilizar esses critérios também ocorre em pacientes com HAI do sexo masculino, com níveis normais de gamaglobulina, com positividade para o anticorpo antimitocôndria, com dados histológicos de hepatite aguda (98). Na verdade, os critérios internacionais adotados para o diagnóstico da HAI visam o diagnóstico apenas das formas clássicas.

No grupo com AAML, valorizou-se em particular a reatividade do anticorpo antimúsculo liso padrão tubular, porque este padrão seria muito sugestivo para a presença de AAA (85). Porém, somente dois pacientes confirmaram essa expectativa.

Por outro lado o diminuto grupo dos pacientes com AAMFR-1 situou-se em faixa etária mais jovem, quando comparamos com a do grupo com escore diagnóstico provável, mas nitidamente superior ao grupo de HAI tipo 2, quando mais de 50% dos pacientes apresentavam idade inferior a 5 anos (99, 100).

Admite-se que o AAMFR-1 seja auto-anticorpo com papel patogênico, pois os epítomos das células B e T para CYP2D6 se sobrepõem e compartilham sítios de reconhecimento que podem promover maior captura e apresentação antigênica. No entanto, apesar da sua reatividade contra células dos túbulos proximais, não se observa lesão renal decorrentes de manifestações auto-imunes nesses pacientes. Alguns autores acreditam que a reatividade do AAMFR-1 nos portadores de VHC seja apenas um epifenômeno, mesmo tendo se demonstrada a especificidade para o mesmo auto-antígeno.

Uma classificação para a HAI tipo 2 com dois subtipos já foi proposta: 2a (sem participação do VHC) e 2b (com a participação do VHC). A HAI tipo 2a teria boa resposta aos imunossupressores, enquanto a tipo 2b deveria ser tratada com antivirais e os imunossupressores seriam proscritos. Ainda não há consenso a respeito dessa classificação e da resposta terapêutica indicada (101-111). A nosso ver, a positividade de marcadores

tanto da HAI tipo 1 (antinúcleo e antiactina) quanto da HAI tipo 2 (AAMFR-1 e AACH-1), não deveria nortear a forma de tratamento da doença hepática. Outros critérios diagnósticos como níveis de aminotransferases e de gamaglobulinas e achados histológicos deveriam ser analisados conjuntamente para decisão final de qual deveria ser a melhor abordagem terapêutica.

Na presente série, alguns pacientes, por apresentarem características exuberantes de auto-imunidade, foram tratados com o esquema de imunossupressão clássica respondendo ao tratamento com normalização de aminotransferases. Nos casos em que se optou pelo tratamento com o esquema de interferon e ribavirina, a maioria comportou-se como não respondedor ou com resposta não sustentada. Uma paciente, que recebeu inicialmente interferon sem normalização das aminotransferases, foi tratada, então, com prednisona e azatioprina. Evoluiu com normalização de aminotransferases; porém, a biópsia hepática após 18 meses de tratamento imunossupressor revelou ainda atividade inflamatória peri-portal grau 2. Por essa razão as doses de imunossupressão foram aumentadas com o intuito de se obter remissão histológica. Outros casos dessa série que apresentaram resposta bioquímica somente após a introdução da imunossupressão ainda estão em tratamento e não realizaram biópsia hepática de controle.

Os pacientes com VHC apresentaram, na sua maioria, baixos valores de aminotransferases, mantendo-se em torno de até três vezes os valores da normalidade. Entretanto, 19 (42%) dos pacientes com pontuação

compatível para HAI apresentaram níveis de aminotransferases maior do que três vezes o limite superior da normalidade, demonstrando uma atividade inflamatória mais intensa e conseqüente lesão celular. Isso provavelmente foi conseqüência do critério adotado para formação do grupo com manifestações de auto-imunidade, já que as alterações histológicas exigidas foram maior agressão da interface (atividade peri-portal 4 e atividade lobular 3/4). Já os níveis de gamaglobulina, mantiveram-se dentro dos limites da normalidade ou pouco elevados, diferentemente do perfil observado na HAI clássica. Esses achados enfatizam que, diante de portadores de VHC com idade superior a 40 anos, níveis de aminotransferases elevados acima de três vezes o limite superior da normalidade, ou de evidências de maior agressão histológica hepática, deve-se avaliar a possibilidade de associação da infecção viral com manifestações de HAI.

Dos portadores de VHC que preencheram critérios diagnósticos pelo sistema de escore do Grupo Internacional de Estudos da HAI, observou-se associação com o HLA-DR4 com elevada significância estatística ($p=0,0006$). Essa associação positiva foi bastante expressiva, como pode ser observada pelo coeficiente de Yule de 0,92 (+1 seria associação positiva perfeita). Esse achado coincide com resultados relatados na HAI tipo 1 (sem VHC) em diversas populações do mundo: Japão, Estados Unidos da América, México, Argentina e países do oeste europeu (45, 112). Entretanto, nos resultados encontrados na HAI tipo 1 (sem VHC) do Hospital das Clínicas da USP predominam os perfis HLA-DR13 e DR3 nos pacientes DR13 negativos. O HLA-DR4 não foi marcador

de susceptibilidade para HAI na casuística estudada. (73). O alelos DR2 e DR51 conferiram proteção para marcadores de HAI nos portadores de VHC ($p < 0,04$ em ambos os casos). A associação foi negativa, como pode ser comprovado pelo coeficiente de Yule $-0,66$ (-1 seria associação negativa perfeita). Não há resultados semelhantes na literatura (Tabela 11).

Em relação aos alelos do HLA DQ, novamente observam-se resultados diferentes dos obtidos em relação à população local com HAI, que parece ser protegida pela presença de DQ7 (equivalente a HLA DQ3), enquanto nos portadores de VHC desse estudo, o DQ3 conferiu susceptibilidade a HAI ($p = 0,04$), como pode ser comprovado pelo coeficiente de Yule $0,54$ ($+1$ seria associação positiva perfeita).

Outro aspecto que se destaca são os casos com VHC e AAMFR-1. Esse subgrupo caracterizou-se pela presença de DR7 e DQ2, enquanto DQ3 e DQ2 predominaram no grupo controle, sugerindo proteção contra tal característica ($p = 0,06$). Autores japoneses discordam de que o AAMFR-1 em portadores de VHC represente um marcador de HAI tipo 2, e seja apenas um anticorpo produzido durante o curso da infecção viral (113). Entretanto, os achados do presente trabalho não reforçam essa posição. Ambos os pacientes destoaram dos demais pacientes com critérios de HAI, pois se encontravam em faixa etária mais jovem (33 e 36 anos). A presença de DR7 nesse subgrupo é compatível com o que ocorre na população local com HAI tipo 2 (73). Da mesma forma, Jurado et al.(83) confirmaram a associação de DR7 em pacientes com VHC e AAMFR-1, e de DQ2 em pacientes com HAI tipo 2. Todavia, qualquer conclusão a respeito de marcadores

imunogenéticos nesse subgrupo de pacientes foi prejudicada pelo reduzidíssimo tamanho da amostra.

No grupo com AAML-T positivo e VHC houve maior frequência do HLA-DR1 e DR5, com dois pacientes (40%) cada e DQ1 com maior expressão, porém, semelhante ao grupo controle e com três pacientes (60%) com o perfil DQ3. Esse grupo apresentou o mesmo perfil de HLA-DQ do grupo com manifestações de auto-imunidade (que preencheu sistema de escore do Grupo Internacional de Estudos da HAI para o diagnóstico de HAI, escore ≥ 10). O único paciente com anticorpo antiactina apresentou o perfil de HLA DR13 (mais comumente na HAI tipo I). Por outro lado, seis (20,6%) pacientes do grupo controle também apresentaram este mesmo perfil de HLA. Como para o grupo com o AAMFR-1, não temos condições para conclusões mais definitivas sobre as características imunogenéticas de pacientes com anticorpo antiactina e VHC, pelo exíguo número de pacientes estudados.

A Tabela 11 sumariza as principais associações de HLA de classe II, sugeridas pelos resultados atuais, em relação à susceptibilidade e proteção à doença hepática, comparados com publicações relacionadas na literatura.

Tabela 11. Comparação dos resultados dos alelos de HLA de classe II encontrados, em comparação com outras publicações, em relação a susceptibilidade e a proteção à agressão hepática

DIAGNÓSTICO	POPULAÇÃO ESTUDADA	N	SUSCEPTIBILIDADE	PROTEÇÃO	REFERÊNCIA
VHC x HAI	HC-FMUSP	31	DR4, DQ3	DR2, DR51	Estudo atual
VHC x AAML-T	HC-FMUSP	5	DR1**, DR5**, DQ1**, DQ3**		Estudo atual
HAI tipo 1	EUA, Europa, Argentina, México, Japão	-	DR4, DR3, DR13		Vazquez-Garcia, M.N. <i>et. al.</i> (44) Czaja <i>et. al.</i> . (90) Pando <i>et. al.</i> (45) Toda <i>et. al.</i> (108) Lohse <i>et. al.</i> (110)
HAI tipo 1	HC-FMUSP	115	DR13, DR3		Bittencourt (73)
VHC x AAMFR-1	HC-FMUSP	7	DQ2**	DQ3**	Estudo atual
VHC x AAMFR-1	Espanha	33	DR7		Jurado <i>et. al.</i> (83)
HAI tipo 2	HC-FMUSP	28	DR7, DR3		Bittencourt (73)
HAI tipo 2	Espanha	15	DQ2		Jurado <i>et. al.</i> (83)
VHC	Itália	99	DQ2	DQ7	Zavaglia <i>et. al.</i> (79, 80)
VHC	Japão	60	DR4, DQ4	DR9, DQ3	Higashi <i>et. al.</i> (111)

Nota: ** p>0,05

A HAI tem sido associada aos alelos DR3 e ou DR4 em diversas populações estudadas (112). O DR3 tende a ocorrer em pacientes mais jovens e com doença mais agressiva, enquanto DR4 está mais associado a doença mais leve e idade mais avançada (40, 114-117). Os alelos DR3 e DR4 também estão associados a diversas outras condições auto-imunes, tais como diabetes mellitus gestacional, desenvolvimento de diabetes mellitus insulino-dependente pós-parto e doença de Addison auto-imune (118). O alelo HLA-DR4 está ainda ligado ao desenvolvimento de outras doenças auto-imunes como artrite reumatóide (119), doença mista do tecido conectivo (120) e esclerose múltipla (121). Os antígenos de HLA-DR também estão expressos mais freqüentemente em humanos com síndrome de Sjogren (122, 123).

Os alelos DR3 e DR4 também estão ligados a fenômenos de auto-imunidade em infectados pelo VHC. Assim como nos estudos encontrados na literatura, na presente série as doenças auto-imunes associadas mais freqüentemente foram: diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatóide, tireoidopatias, lupus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren. Tanasesuscu *et al.* (124) já demonstraram que o VHC pode induzir a formação de fator reumatóide IgG-IgM com ativação de complemento, sendo considerado um agente desencadeador de artrite reumatóide em pacientes com HLA-DR4. Em chineses com VHC, esses alelos foram associados também ao surgimento de crioglobulinemia e auto-anticorpos (125). Alguns relatos também sugerem que o DR4 esteja associado a fenômenos de auto-

imunidade relacionados ao tratamento com interferon em portadores de VHC (126, 127).

O alelo DQ3, segundo marcador imunogenético mais freqüentemente observado nesta série de pacientes, não foi observado nas demais publicações que estudaram HAI e/ou hepatite C (Tabela 11). O DQ3 fortemente associado ao diabetes mellitus insulino-dependente (mais que o DR4), e o aminoácido 45 *per se* é capaz de gerar epítomos sorológicos que caracterizam o alelo diabético ou não diabético (128). Os alelos DQ3 e DR4, em desequilíbrio de ligação, também estão fortemente associados à artrite reumatóide (129). Portanto, um estudo de haplótipos da atual série, a princípio utilizando marcadores microssatélites para esclarecer se DR4 e DQ3 também estão em desequilíbrio de ligação nestes pacientes, poderia contribuir para esse conhecimento.

Diversas teorias foram elaboradas para explicar os fenômenos de auto-imunidade. Bias *et al.* (130) sugeriram que a auto-imunidade seria um traço dominante, e o gene responsável primariamente seria epistático a outros genes secundários, incluindo os genes do MHC; os genes secundários, por sua vez, determinariam o órgão a ser lesado. Isso explicaria a existência de famílias que apresentam doenças auto-imunes de etiologias multifatoriais e/ou auto-anticorpos em altos títulos (131, 132). Outra teoria propôs que a auto-imunidade seria resultante de mutações somáticas, que permitiriam a emergência de “clones proibidos” de células imunológicas, sem correlação com os haplótipos de HLA (133). Outra possibilidade seria discutir a auto-imunidade no contexto da teoria

evolucionista. Ela seria resultante do surgimento de anticorpos com ampla variedade de especificidade, visando a otimização da eficácia dos mecanismos de defesa, mas paradoxalmente resultando em lesão dos próprios órgãos (134). Mais recentemente, Zanelli *et al.* (129) propuseram que a auto-imunidade seria consequência da falha da proteção das moléculas de HLA.

Um consenso geral para as doenças auto-imunes, incluindo a HAI, é que são condições multifatoriais, possivelmente desencadeadas por diversos fatores ambientais em indivíduos susceptíveis de acordo com sua bagagem genética. A resposta imune iniciar-se-ia no ser humano quando o receptor da célula T reconhecesse fragmentos de peptídeos estranhos ou próprios, que se ligariam a moléculas de HLA codificadas pelos genes do MHC. Variações alélicas nos antígenos de HLA vão determinar respostas imunológicas diferentes (92).

Existem evidências, extraídas de estudos a respeito de doenças auto-imunes como diabetes mellitus insulino-dependente (135) e artrite reumatóide (129), que análises mais extensas do haplótipo MHC seriam mais elucidativas, ao invés de realizar associações simples com um *locus* de HLA de classe II, seriam mais elucidativas. Um modelo que envolvesse duas ou mais regiões distintas, com alelos em forte desequilíbrio de ligação, poderia explicar melhor a associação do HLA com as doenças auto-imunes.

Nesse contexto, Ettinger *et al.* (136) apresentaram um modelo para explicar o papel das moléculas do HLA de classe II no diabetes mellitus insulino-dependente. Os alelos DQ3 estariam fortemente associados com a

desregulação da resposta mediada por células T. Esse defeito genético seria transmitido pela via autossômica recessiva mas seria suplantado pela anormalidade na regulação da expressão do gene. Por outro lado, o DQ5 seria neutro ou apenas moderadamente associado a essa desregulação.

O grupo de Zanelli *et al.*(129) propõe que, na artrite reumatóide, o complexo DQB1-DQA1-DRB1, constituiria uma primeira sub-região codificadora de moléculas apresentadoras de antígenos com papel fundamental na regulação da resposta imune. Uma segunda sub-região ainda precisaria ser identificada, mas possivelmente incluiria o gene TNF- α , visto que as terapias anticitocinas beneficiam os portadores dessa doença. Um fator amplificador nessa região predisporia o paciente a uma inflamação exacerbada, independentemente do HLA de classe II. Uma outra questão seria se essa segunda região estaria em desequilíbrio de ligação com os já conhecidos haplótipos DQ3-DR4 e DQ5-DR1/10 da artrite reumatóide (129).

Inúmeros estudos também têm sido conduzidos no sentido de conhecer o papel dos alelos do HLA nas infecções virais. O alelo DR4 foi descrito como indutor de resposta imune intensa e protetor contra infecções por *Cocksackievirus* em crianças finlandesas (137), como protetor contra a dengue na forma hemorrágica em mexicanos (138), bem como associados a doença mais leve em portadores de hepatites crônicas virais (94) e a clareamento do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (139). DR3 e DQ3 foram associados a susceptibilidade à infecção ao vírus da imunodeficiência humana (140). Na infecção pelo VHC, os alelos DRB1*1101 e DR3 têm sido observados em associação com clareamento

viral (141). Como pode ser observado, a presença do HLA-DR4 poderia funcionar tanto como protetora como facilitadora, como no presente estudo, para casos mais agressivos de doença viral.

Em relação ao HLA-DR4, nos anos futuros, deve-se aprofundar no conhecimento funcional da proteína a partir de estudos com o modelo transgênico murino “*knock out*” criado. Realizou-se hibridização de domínios de ligação de HLA-DR4 humano com domínios próximos à porção da membrana de I-E murino, e obteve-se uma linhagem de ratos cuja prole foi incapaz de expressar moléculas de MHC classe II (modelo C57BL/6NTac-[KO]Abb-[Tg]DR-4 *knock-out mouse*). Esses animais, por terem preservado os domínios alfa 2 e beta 2 murino, apresentaram ainda interações com os co-receptores do CD4 nas células T. A imunização desses animais, quando adultos, com peptídeos de uma proteína proteolipídica, que tem afinidade de ligação ao HLA-DR4, provocou resposta intensa de proliferação das células T, causando lesões inflamatórias na matriz branca do sistema nervoso central e sintomas de encefalomielite alérgica experimental (142).

Apenas alguns fragmentos peptídeos ligam-se ao DR4, e o que determina essa especificidade de ligação é a identidade dos resíduos polimórficos em posições estruturais específicas. A seqüência dos 20 aminoácidos onde ocorrem essas ligações consta em bancos de dados e as ligações preferenciais podem ser inferidas. Entretanto, os efeitos quantitativos biofísicos das perturbações na seqüência dos peptídeos são ainda poucos conhecidos. Recentemente, têm-se desenvolvido instrumentos 3D QSAR (*three-dimensional quantitative structure-activity relationship*)

como CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*), CoMSIA (*comparative molecular similarity indices analysis*) e tem-se construído farmacóforos pelo programa Catalyst para a elaboração de estudos dessa natureza, que certamente permitirão avanços nessa questão(143). São ainda os primeiros passos em direção ao desenvolvimento de técnicas que virão a permitir o controle das respostas imunes no futuro.

Além dos alelos aqui discutidos, certamente muitos outros aspectos genéticos estão envolvidos nos mais diversos tipos de HAI. Outros polimorfismos do HLA, como DR6, DQ, C4 (39, 144-147); também podem exercer papel importante na patogênese. O MHC apresenta uma riqueza no grau de polimorfismo sem precedentes nas demais regiões do genoma humano, o que deve ser uma necessidade vital à sobrevivência da espécie, frente às mais diversas ameaças de infecções que nos cercam (141).

Além disso, genes promotores de auto-imunidade fora do HLA, como CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) (148), repertório de célula T (149, 150), genes de citocinas (151, 152), polimorfismos do gene receptor de vitamina D (92) já foram estudados em pacientes caucasianos com HAI, e o papel de cada um desses aspectos ainda não está totalmente estabelecido. Nos últimos anos, os estudos a respeito de doenças infecciosas e auto-imunidade têm dado alguma atenção no *locus* KIR, seu papel em ambos os braços da resposta imune, sua especificidade para os alótipos de classe I, sua extensa diversidade genômica, sugerem que variações polimórficas nesse gene exerçam importante papel na resistência

e suscetibilidade a diversas doenças humanas (153). Ainda não há estudos sobre o KIR na HAI.

A ampliação do conhecimento funcional dos diversos genes e proteínas em nível de pesquisa básica, aliadas ao incremento no número total desta casuística e o prolongamento do tempo de acompanhamento destes casos poderão responder diversos questionamentos que vêm à tona diante da análise dos resultados desse estudo. A caracterização dos genótipos e cargas virais do VHC, dosagens de citocinas circulantes e teciduais hepáticas também poderão contribuir para o esclarecimento da evolução e resposta terapêutica dessas doenças. Espera-se que, nos próximos anos, os custos para análise de alelos de HLA reduzam-se e os testes possam ser incorporados no arsenal diagnóstico da prática clínica. Assim como pesquisas da carga viral por técnica de PCR em tempo real e genotipagem do VHC passaram a determinar condutas clínicas, talvez, futuramente, a pesquisa de alelos de HLA também possa direcionar o diagnóstico ou a terapêutica em pacientes com sorologia positiva para o VHC com características sugestivas de auto-imunidade.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

- 1) Idade superior a 40 anos e níveis de aminotransferases acima de três vezes o limite superior da normalidade foram características dos pacientes com hepatite C com marcadores de auto-imunidade.
- 2) Níveis elevados de gamaglobulinas não foram observados em portadores de VHC com características de HAI.
- 3) Os portadores de VHC com antimicrosoma de fígado e rim tipo 1 situaram-se em faixa etária inferior a 40 anos.
- 4) Houve associação positiva entre a presença dos alelos HLA-DR4 e DQ3 e as manifestações auto-imunes nos portadores de VHC.
- 5) Houve associação negativa entre a presença dos alelos HLA-DR51 e DR2 e as manifestações auto-imunes nos portadores de VHC.
- 6) Não foi possível estabelecer na população estudada semelhanças de marcadores imunogenéticos da hepatite auto-imune tipo 1 e tipo 2 verificados em nosso meio, pela baixa frequência do anticorpo antiactina e antimicrosoma de fígado e rim nos portadores do VHC da presente série.

ANEXOS

7. Anexo

Anexo 1.

Tabela 1. Critérios Internacionais diagnósticos de hepatite auto-imune

Parâmetros	Escore
Sexo feminino	+2
Fosfatase alcalina: AST;ALT (número de X acima do normal)	+2
< 1,5	0
1,5 - 3,0	-2
> 3,0	
Globulinas, gamaglobulinas ou IgG (número de x acima do normal)	+3
>2,0	+2
1,5 – 2,0	+1
1,0 – 1,5	0
< 1,0	
Auto-anticorpos (em adultos): AAN, AAML, AAMFR-1	+3
>1/80	+2
1/80	+1
1/40	
Crianças: AAN, AAML, AAMFR-1	+3
>1/20	
Crianças: AAN, AAMFR-1	+2
1/10 – 1/20	
Crianças: AAML	+1
1/20	0
1/10	
Anticorpo antimitocôndria positivo	-4
Marcadores virais	

Positivo	-3
Marcadores virais	
Negativo	+3
História de uso recente de drogas hepatotóxicas	
Positiva	-4
Negativa	+1
Consumo alcoólico	
<25g/dia	+2
>60g/dia	-2
Outras doenças auto-imunes no paciente ou em familiares de primeiro grau	+2
Histologia	
Hepatite de interface	+3
Rosetas	+1
Infiltrado inflamatório acentuado e predominantemente de plasmócitos	+1
Nenhuma das alterações acima	-5
Alterações biliares sugestivas de CEP e CBP	-3
Outra alteração sugestiva de outra etiologia	-3
Auto-anticorpos auxiliares (ANCA, AAAHS/AAFP):	
Positivo	+2
Negativo	0
HLA DR3, DR13 e DR7 em caso de negatividade para os auto-anticorpos	+1
Resposta terapêutica:	
Completa	+2
Recidiva durante ou depois da retirada do tratamento após resposta completa inicial	+3
Diagnóstico definitivo: antes do tratamento	>15
Após o tratamento	>17
Diagnóstico provável: antes do tratamento	10 - 15
Após o tratamento	12 - 17

7. Anexo

Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Perfil do HLA de classe II de pacientes com o vírus da hepatite C com características bioquímicas, histológicas e sorológicas sugestivas de hepatite auto-imune

O vírus da Hepatite C é uma das principais causas de hepatopatia crônica e predispõe à evolução de cirrose hepática e de suas conseqüências, entre elas o hepatocarcinoma. Descoberta apenas em 1989, atualmente estima-se uma prevalência entre 1 a 3% da população mundial e em estudos no município de São Paulo de 1,4%. Trata-se de doença de descoberta relativamente recente e necessita de estudos para um melhor tratamento e manejo.

Uma das características da hepatite C é de vir acompanhada de manifestações de doenças auto-imunes, isto é, doenças em que o próprio organismo agride vários de seus órgãos. Há marcadores genéticos dessas doenças auto-imunes que podem ser pesquisados em células presentes em seu organismo. Um desses marcadores chama-se HLA, que poderia ser comparado a uma marca que todo mundo tem, como por exemplo, o tipo de sangue em A, B, AB e O.

Sua colaboração é muito importante para que nós possamos estudar o HLA dos portadores de hepatite C. Para isso, realizaremos uma coleta de sangue, de onde extrairemos o material para a sua pesquisa. O único desconforto previsto é a picada no braço para colher sangue da veia.

Todo paciente que participa dessa pesquisa tem direito de perguntar sobre o andamento de nossos estudos, nossos resultados e avanços. Tem também nossa garantia de que os resultados são sigilosos e que os DNAs serão somente utilizados com finalidades aceitas pelas normas mundiais de ética científica. Além disso, é livre para retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo. Pode também recusar a doar seu DNA para esse projeto e isso não lhe trará prejuízos no tratamento que recebe de nossa equipe médica.

Não há riscos de danos à saúde relacionados a essa pesquisa, uma vez que os dados são basicamente obtidos por revisão de prontuário médico e análise laboratorial do sangue coletado.

Nossa equipe assiste a todos os pacientes que são acompanhados nos ambulatórios 2MG 400, 402, 403 e 405 em suas intercorrências, de acordo com os recursos que nos são disponíveis nesta instituição.

Mudança do título da tese de doutorado

De: Perfil do HLA de classe II de pacientes com o vírus da hepatite C com características bioquímicas, histológicas e sorológicas sugestivas de hepatite auto-imune

Para: Perfil do HLA de classe II de pacientes com hepatite C e características de hepatite auto-imune

7. Anexo

Anexo 3

Tabela 2 – Classificação das hepatites crônicas baseada em critérios de semiquantificação, conforme consenso das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia

1. Alterações estruturais:
 - 0- normal
 - 1- expansão fibrosa de espaço-porta
 - 2- expansão fibrosa portal com septos porta-porta
 - 3- preservação parcial da arquitetura lobular, com septos porta-porta e porta-centro, podendo ser visto esboço de nódulos
 - 4- cirrose
2. Infiltrado inflamatório portal (atividade portal):
 - 0- raros linfócitos portais
 - 1- aumento discreto dos linfócitos portais
 - 2- aumento moderado dos linfócitos portais
 - 3- aumento acentuado dos linfócitos portais
 - 4- aumento muito acentuado dos linfócitos portais
3. Atividade periportal:
 - 0- ausência de lesões
 - 1- extravasamento de linfócitos para a interface (*spill over*), não caracterizando a presença de necrose em saca-bocados
 - 2- necrose em saca-bocados discreta
 - 3- necrose em saca-bocados moderada
 - 4- necrose em saca-bocados em extensas áreas de muitos espaços porta
4. Atividade parenquimatosa:
 - 0- hepatócitos normais
 - 1- alterações discretas dos hepatócitos
 - 2- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitários em numerosos sítios
 - 3- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitário em muitos sítios, associada a áreas limitadas de necrose confluyente
 - 4- necrose focal de hepatócitos circundados por agregados linfo-histiocitário em numerosos sítios, associada à necrose confluyente extensa/múltipla.

7. Anexo

Anexo 4

Materiais, soluções e reagentes

- Fibroblastos humanos fornecidos pelo Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina tropical de SP.
- Ratas da raça Wistar (idade aproximada de 3 meses) fornecidas pelo Biotério Central da FMUSP.
- Acetona PM 59,08 g/mol, Merck S.A., Rio de Janeiro.
- Ácido clorídrico fumegante (HCl) 37%, código 21603, Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro.
- Álcool isoamílico 24:1 (Cl:I), Merck, Alemanha.
- Antiimunoglobulina humana policlonal produzida em carneiro e marcada com isotiocianato de fluoresceína, Biolab Mérieux, Rio de Janeiro.
- Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), peso molecular de 84,01, código 1.06329.1000, Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro.
- Brometo de etídio, Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos da América.
- Carbonato de sódio (Na_2CO_3), peso molecular de 105,99, grupo Química, Rio de Janeiro.
- Cloreto de sódio (NaCl), peso molecular de 58,44, código 1.06404.1000, Merck SA Indústrias Químicas, Rio de Janeiro.

- Cloreto de Sódio 1,2 M, Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos da América.
- Cloreto de Sódio 3 M Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos da América.
- Clorofórmio, Merck, Alemanha.
- Conjugado antiimunoglobulina humana policlonal produzida em carneiro e marcada com isotiocianato de fluoresceína, Biolab-Mérieux, Rio de Janeiro, Brasil.
- Conjugado anti-IgG humana marcada com fluoresceína, código F6506, Sigma Chemicals Co, St. Louis, Estados Unidos da América.
- *Cryo-embedding compound for medium and higher temperatures*, Microm, Walldorf, Cat. No 358100.
- CTAB 0,5%, Merck, Alemanha.
- DTAB 12%, Merck, Alemanha.
- EDTA, código 114, VETEC, Rio de Janeiro.
- Etanol, Merck, Alemanha.
- Éter sulfúrico, B. Herzog Comércio e Indústria SA, São Paulo.
- Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4), peso molecular de 142,0, código S7907, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos da América.

- Fosfato de sódio Monobásico anidro (NaH_2PO_4), peso molecular de 120,0, código S8282, Sigma Chemical Co., St.Louis, Estados Unidos da América.
- Glicerina tamponada em tampão carbonato de sódio 0,45 mM e bicarbonato de sódio 5mM pH 8,6.
- Glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), peso molecular de 92,09 código G7757, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos da América.
- Kit DNA generico-baixa resolução, Biometrix, Biosystems Canoga Park, CA, Estados Unidos da América.
- Lâminas nº 4 (26 x 76mm) para cortes de tecidos, Perfecta, São Paulo.
- Lamínulas (24 x 60) M.W., Glastécnica, São Paulo.
- Platinum Taq DNA Polimerase, INVITROGEN, Estados Unidos da América.
- PBS (solução salina tamponada com fosfato) 0,01M, pH 7,2;
- PBS-TWEEN 20 0,2% pH 7,2; Atlas, São Paulo.
- TRIS base, Gibco BRL, Nova York , Estados Unidos

Equipamentos:

- Criostato marca Microtome Cryostat HM 500 OM, Micron, Heidelberg, Alemanha.
- Microscópio de imunofluorescência modelo Axiophot, Carl Zeiss, - GMBH, Jena, Alemanha.
- Microscópio de imunofluorescência com epiluminação Olympus, Japão
- Termociclador Perkin Elmer 9700, Massachusetts, Estados Unidos da América.

7. Anexo 5

WORKSHEET

Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Name _____

Sample ID _____

DRB Loci

DRB Loci		1/5/9								2/6/10								3/7/11								4/8/12							
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Reaction Results (mark positive locations)																																	
Approximate Product Size (bp)		750	200	200	200	200	125	100/125	200	100	125	125	200/225	175/200	125-200	125/150	100-325	200/225	200	150-225	175	200	200	200	200	200	175	.	.	.	.	.	.
Serology Equivalent	DRB Loci Allele Group																																
N.C.	Negative Control (betaglobin)																																
DR1,DR-	DRB1*010101-0102/0201-0204/04-11																																
DR103	DRB1*0103																																
DR17,DR-,DR3	DRB1*030101-0102/04/0501-0502/09/13-16/18-20/22-23/25/28																																
DR18	DRB1*030201-03																																
DR3,DR17,DR-	DRB1*0306/11/26																																
DR3,DR-	DRB1*0307/21																																
DR-	DRB1*0308																																
DR17	DRB1*0310																																
DR3,DR13,DR6	DRB1*0312;DRB1*1320/29																																
DR-	DRB1*0317/24/27;DRB1*1344; DRB1*1442																																
DR4,DR-	DRB1*040101-02/0301-04/0501-06/ 0701-14/16-48/50-52																																
DR4	DRB1*0415																																
DR7,DR-	DRB1*070101-09																																
DR8,DR-	DRB1*080101-0102/0201-0302/0401- 08/10-16/18-19/22-24/26-27/29-30																																
DR8,DR-	DRB1*0809/21;DRB1*1415																																
DR8,DR-	DRB1*0817/28																																
DR-	DRB1*0820;DRB1*1347																																
DR9,DR-	DRB1*090102-04																																
DR10	DRB1*100101-0102																																
DR11,DR-	DRB1*110101-0105/0401-0402/0601- 0602/09/15/18/1901-1902/24/2701- 29/31-33/35/37-39/43-44/46-47/49- 51/54																																
DR11,DR-	DRB1*1102/14/16/20-21/48																																
DR11,DR-	DRB1*1103/11/40-41																																
DR11,DR-	DRB1*1105/22/26/30/34/53																																
DR11	DRB1*1107																																
DR11,DR-	DRB1*110801-0802/42																																
DR11,DR-	DRB1*1110/1201-1202																																
DR11	DRB1*1113																																
DR-,DR14	DRB1*1117/52;DRB1*1411																																
DR11,DR-	DRB1*1123/25/45																																
DR-	DRB1*1136																																

SSP2L_05A_WS2 REV 7: PAGE 2 OF 3

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com
Templ_SSP_WS2 Rev 3

WORKSHEET

Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Name _____

Sample ID _____

DRB Loci

DRB Loci		1/5/9								2/6/10								3/7/11								4/8/12							
		H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A	H	G	F	E	D	C	B	A
Reaction Results (mark positive locations)																																	
Approximate Product Size (bp)																																	
Serology Equivalent	DRB Loci Allele Group	750	200	200	200	200	125	100/125	200	125	125	200/225	175/200	125-200	125/150	100-325	200/225	150-225	175	200	250	200	200	175	.	.	.	.	.	.	.	.	
DR-	DRB1*143203/46																																
DR14	DRB1*1427																																
DR-	DRB1*1431																																
DR-	DRB1*1432/34/38																																
DR15,DR2,DR-	DRB1*150101-0105/0201-16																																
DR16,DR2,DR-	DRB1*160101-0102/0201-04/0501/07-08																																
DR52,DR-	DRB3*010101-06/08-11;DRB3*0201/0201-17/19;DRB3*030101-03																																
DR52	DRB3*0107																																
DR-	DRB3*0218																																
DR53,DR53*Blank*,DR-	DRB4*010101-0304/04-07																																
DR51,DR-,DR51*Blank*	DRB5*010101-12;DRB5*0202-05																																
DR-	DRB5*0113																																

DQB1 Locus

DQB1 Locus		4/8/12							
		H	G	F	E	D	C	B	A
Reaction Results (mark positive locations)									
Approximate Product Size (bp)									
Serology Equivalent	DQB Locus Allele Group		225	225	200	225	125	200	
DQ2	DQB1*020101-03								
DQ7,DQ-,DQ8	DQB1*030101-0102/04/09-10/13								
DQ8,DQ-	DQB1*030201-0202/0501-0503/07-08/11								
DQ9,DQ3,DQ-	DQB1*030302-0303/06/12/15								
DQ4	DQB1*0401-02								
DQ5	DQB1*050101-0102/0201-0202/0301-04								
DQ6,DQ-,DQ1	DQB1*060101-03/0401-0402/0501-10/1101-19/21-22

CODESHEET

Micro SSP™ Generic HLA Class II DNA Typing Tray, Lot #05A

Cat. # SSP2L & LSSP2L & TSSP2L

☐ Patient ☐ Male
☐ Donor ☐ Female

Name _____
 Sample I.D. _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____
 Disease _____ Relationship to Patient _____

Results: _____ Tray Exp. Date _____
 _____ Tray Dot # _____
 _____ D-mix Lot #/Batch # _____
 (384-Well Format Only)
 Load Position: ☐ 1 ☐ 2
☐ 4 ☐ 3
 Test No.: _____

Comments: _____

Test Performed by _____ Date _____
 Read by _____ Date _____
 Reviewed by _____ Date _____

	H	G	F	E	D	C	B	A
1	Negative Control (beta2microglobulin)	DRB1*010101-0102/ 0201-0204/04-11	DRB1*0103	DRB1*150101-16	DRB1*160101-0501/07-08	DRB1*030101-0102/04-06/09-11/13-16/18-20/ 22-23/25-26/28; DRB1*1327/41, DRB1*0107	DRB1*030101-0102/04-06/09-11/13-16/18-20/ 22-23/25-26/28; DRB1*1327/41, DRB1*0107	DRB1*030201-0307/21; DRB1*1107
5	750 bps.	200 bps.	200 bps.	200 bps.	200 bps.	125 bps.	100 / 125 bps.	200 bps.
9	DRB1*040101-49/50-52	DRB1*0308:DRB1*0415; DRB1*110101-54; DRB1*1204:DRB1*1411; DRB1*0218:DRB1*0113	DRB1*120101-11	DRB1*0820; DRB1*110101-02/0401-0402/0601-0602/09-10/ 1201-1202/14-16/18-21/23-25/2701-29/31-33/35/37-39/43-51/54; DRB1*130101-16/18-19/ 21-23/26-28/30-42/45-53/55/57-59/61-62/64-66:DRB1*1416/22/24-25/27/37	DRB1*0312:DRB1*1102-03/11/14/16/20-21/36/ 40-41/48:DRB1*130101-04/08/12-13/15-18/19-24/27-36/38-41/43/45/ 48-49/51-55/57-59/61/ 63-66:DRB1*1413/16	DRB1*0310:DRB1*1309/ 43/45:DRB1*140101-0102/04/0701-08/10/ 16/22/24-26/28/31-32/ 34-35/37-39	DRB1*0809/21; DRB1*1117/52; DRB1*1318; DRB1*140101-15/17-21/ 2301-2302/26-30/33/ 35-36/39-41/43-48	DRB1*0308:DRB1*1110/ 1201-13/17/52; DRB1*1204:DRB1*1308/ 17/19/27/41/57/64; DRB1*1411/16
2	100 bps.	125 bps.	125 bps.	200 / 225 bps.	175 / 200 bps.	125 - 200 bps.	125 / 150 bps.	100 - 325 bps.
6	DRB1*0820; DRB1*110801-0802/23/ 25/42/45:DRB1*1313/ 18/25/47/55-56/60; DRB1*140301-0302/12/ 27/40	DRB1*070101-09	DRB1*080101-19/21-24/ 26-30:DRB1*1209; DRB1*1317:DRB1*1415	DRB1*090102-04	DRB1*100101-0102	DRB1*010101-13; DRB1*0202-05	DRB1*010101-11; DRB1*0201-18; DRB1*030101-03	DRB1*010101-07
10	200 / 225 bps.	200 bps.	150 - 225 bps.	175 bps.	200 bps.	250 bps.	200 bps.	200 bps.
3	DRB1*030101-0709-28; DRB1*0820; DRB1*130101-16/18-66; DRB1*140101-0302/ 0501-09/12-14/16-2301/24-27/29-30/32-45/47-48	DRB1*050101-04	DRB1*060101-19/21-22	DRB1*020101-03	DRB1*030101-0102/04/09-10/13	DRB1*030201-0202/ 0501-0503/07-08/11	DRB1*030302-0303/06/ 12/15	DRB1*0401-02
7	175 bps.	225 bps.	225 bps.	200 bps.	225 bps.	125 bps.	125 bps.	200 bps.
11								
4								
8								
12								

Note:

1. Position 2C/6C/10C: 125 / 175 / 200 bps
2. Position 2A/6A/10A: 100 / 125 / 150 / 175 / 200 / 225 bps
3. Position 3F/7F/11F: 150 / 175 / 200 / 225 bps
4. Please refer to Primer Information document for revision information.
5. Nomenclature includes HLA alleles listed in the January 2005 update of the IMGT database (Robinson J, et al., "IMGT/HLA database - a sequence database for the human major histocompatibility complex." Tissue Antigen (2000) 55,280-287). Complete update information is located at www.anthony-nolan.com/HLA/index.html.

SSP2L_05A_CS REV 6.xls: Page 1 of 1

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge Street, Canoga Park, CA 91303-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-6904 www.onelambda.com
 Temp2TM_SSP_CS Rev 1

7. Anexo

Anexo 6: Tabela do escore dos critérios internacional de HAI.

Caso	Sexo	FA:AST/ALT	Gama	AC	Virus	Drogas	OH	Historia AI	BX	Outros AC	HLA	RES	Total
1	+2	+2	+2	+2	-3	+1	+2	0		0			+8
3	0	+2	0	+2	-3	+1			+3	0			+5
5	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+5
11	+2	+2	0	+2	-3	+1	+2	0	-3	0			+3
17	0	+2	+3	+1	-3		-2	+2	+3	0			+6
21	+2	+2	+1	+3	-3				-3	0			+2
27	0	0	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+2
28	+2	+2	0	+2	-3	+1	+2	+2	-3	0			+5
33	+2	+2	+1	0	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
41	+2	0	+2	+1	-3	-4	+2	0		0			0
47	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
57	0	0	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			-2
59	0	+2	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
60	+2	0	+1	+3	-3	+1			-3	0			+1
61	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			0
62	+2	+2	+2	0	-3	+1	+2	0	+5	0			+11
63	0	+2	+2	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
69	0	+2	0	+2	-3	+1	-2	+2	+3	0			+5
76	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	+2		0			+6
89	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2		0			+8
98	+2	+2	0	-1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
103	0	+2	+1	+1	+1	-3			+3	0			+4
104	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+8
112	0	+2	+1	0	-3	+1	+2	0		0			+3
120	0	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+7
124	0	+2	0	0	-3	+1	-2	0	-3	0			-5
127	0	0	0	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-5
145	+2	+2	+2	+1	-3				+3	0			+7
150	0	+2	+1	0	-3				+4	0			+4
152	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0		0			+3
164	+2	+2	+2	+3	-3	+1	-2	0		0			+5
175	+2	+2	+1	0	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
181	+2	0	0	+1	-3			+2	-3	0			-1
183	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
184	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
186	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+4
190	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
191	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+4
206	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
210	+2	+2	0	+2	-3				-3	0			0
216	+2	+2	0	0	-3	+1			+4	0			+5
217	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			+2
219	+2	+2	+1	+2	-3					0			+4
221	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0		0			+5
228	0	+2	+1	+2	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
231	+2	+2	+1	+1	-3	-4	+2	0	+3	0			+4
250	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	0		0			+4
257	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			+3
261	0	+2	+1	0	-3	+1	-2	0		0			-1
262	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
267	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2		-3	0			+2

Caso	Sexo	FA:AST/ALT	Gama	AC	Virus	Drogas	OH	Historia AI	BX	Outros AC	HLA	RES	Total
268	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0		+2			+11
270	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+4
271	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	+2		0			-3
275	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	+2	+4	0			+13
283	0	0	0	+1	-3	+1	+2	+2		0			+3
290	+2	0	0	0	-3	+1		+2	-3	0			-1
298	+2	0	0	0	-3	+1	+2	+2	-3	0			+1
302	0	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+1	0			+5
312	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
316	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0		0			+3
319	0	0	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			-2
322	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
324	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+2
325	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-3
334	+2	+2	0	+1	-3	+1		0	+3	0			+6
339	+2	0	0	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
344	+2	0	0	+3	-3	+1	+2	+2		0			+7
345	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+3
349	+2	+2	0	+1	-3		+2	0	+3	0			+7
350	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2			0			0
354	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			+1
357	+2	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+5
367	+2	0	0	0	-3	+1	+2	+2	+3	0			+7
373	0	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+4
389	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
393	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0		0			+6
396	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0		0			+7
402	+2	0	+1	+1	-3	+1				0			+2
410	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			+3
42	+2	0	0	+2	-3	+1	+2	0	-3	0			+1
430	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			+2
435	0	+2	+1	+1	-3					0			+1
440	0	0	0	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-5
442	0	+2	+2	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+5
447	0	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
453	0	+2	+2	+3	-3	+1	-2	0	+3	0			+6
463	+2	0	0	0	-3	+1			-3	0			-3
469	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+2
472	0	+2	+2	+2	-3				+3	0			+6
480	0	+2	+2	+3	-3	+1	-2	0	-3	0			0
486	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
491	0	+2	+1	0	-3	+1	-2	0	+4	0			+2
495	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+2
500	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	+2		0			+9
504	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
509	+2	0	+1	0	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
511	+2	+2	+1	+2	-3	+1	+2	0		0			+7
512	+2	+2	+1	-1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+9
513	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
524	0	0	0	+3	-3				+3	0			+3
525	+2	0	+2	0	-3	+1		0	+5	0			+6
534	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+7

Caso	Sexo	FA:AST/ALT	Gama	AC	Virus	Drogas	OH	Historia AI	BX	Outros AC	HLA	RES	Total
535	+2	0	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
550	+2	+2	+1	+2	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
554	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
578	0	+2	+3	+1	-3	+1				0			+4
580	0	+2	+2	+2	-3	+1	+2	0		0			+6
581	0	+2	+1	+2	-3	+1	-2	0		0			+1
585	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0		0			+3
586	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
590	0	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+4
592	0	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+5
599	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
604	0	+2	+2	+3	-3	+1	-2	0	+3	0			+6
612	0	+2	0	+3	-3	+1	-2	0	+3	0			+4
614	0	0	+2	+3	-3	+1				0			+3
621	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
624	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+2
640	0	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
660	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
668	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0		0			+7
669	+2	+2	+2	0	-3	+1	+2	0	+4	0			+10
673	0	+2	+1	+1	-3	+1			+3	0			+5
679	+2	+2	+2	+3	-3	+1	+2	0	-3	0			+6
685	+2	0	+1	+3	-3	+1	+2	0	-3	0			+3
686	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
692	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-4
693	+2	0	0	0	-3	+1	+2	0		0			+2
694	+2	0	0	+3	-3	+1	+2	0		0			+5
709	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	0		0			+4
715	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
716	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
749	0	+2	0	0	-3	+1	+2	0	-3	0			-1
736	0	+2	0	+2	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
737	0	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+4
723	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-4
772	0	+2	0	+2	-3	+1	-2	0	-3	0			-3
773	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
794	+2	+2	+2	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+6
797	+2	+2	+1	+1	-3	+1		+2	+4	0			+10
798	+2	+2	+1	+2	-3	+1	+2	0	-3	0			+4
801	+2	0	+1	+1	-3	+1		+2	-3	0			+1
807	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
809	+2	0	0	0	-3	+1	+2	+2	+3	0			+7
812	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
814	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
816	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+11
818	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
819	+2	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+5
831	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
848	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+7
852	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
866	+2	0	+2	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+9
867	+2	0	+3	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11

Caso	Sexo	FA:AST/ALT	Gama	AC	Virus	Drogas	OH	Historia AI	BX	Outros AC	HLA	RES	Total
870	+2	+1	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
877	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+6
881	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	0		0			+8
883	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
888	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
890	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	0	+3	0			+7
892	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+4
895	+2	+2	+1	+2	-3				+3	0			+7
896	+2	0	0	+3	-3	+1		+2	-3	0			+2
898	+2	+2	+1	+2	-3	+1	+2	0		0			+7
900	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
901	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	+2		0			+5
904	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+13
909	+2	+2	0	0	-3					0			+1
923	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	-3	0			0
927	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
931	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	0	+3	0			+7
935	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
937	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0		0			+7
938	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+5
939	+2	0	+3	+1	-3	+1		+2	+3	0			+9
943	+2	+2	+3	+2	-3	+1	+2	0	-3	0			+6
947	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
948	+2	+2	+1	+2	-3			+2		0			+6
952	+2	+2	+1	0	-3	+1	+2	0	+4	0			+9
962	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	+2	-3	0			+6
965	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
971	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2		0			+7
972	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0	+3	0			+3
976	0	+2	+1	+2	-3	+1	+2	0	+4	0			+9
980	+2	+2	0	+3	-3		-2	0	-3	0			-1
985	+2	-2	0	+3	-3	-4			-3	0			-7
988	+2	+2	+3	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+13
991	+2	0	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
994	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
996	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
1000	+2	+2	0	+1	-3				-3	0			-1
1001	+2	+2	0	+1	-3	+1	-2	+2	+3	0			+6
1014	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
1016	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+11
1017	+2	+2	+2	+3	-3	+1	-2	+2		0			+7
1019	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	0	+4	0			+12
1029	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
1033	+2	+2	+1	+1	-3				+3	0			+6
1035	+2	0	0	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
1039	+2	0	0	+1	-3					0			0
1040	+2	0	+2	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
1041	0	+2	+2	+1	-3	+1	-2	0	-3	0			-2
1048	0	+2	+1	+3	-3	+1	+2	0		0			+6
1050	0	+2	0	+1	-3	+1	-2	0		0			-1
1055	0	+2	0	+3	-3	+1	-2	+2	+3	0			+6
1063	0	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+6

Caso	Sexo	FA:AST/ALT	Gama	AC	Virus	Drogas	OH	Historia AI	BX	Outros AC	HLA	RES	Total
1093	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
1095	0	+2	+2	+1	-3	+1	+2			0			+7
1097	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
1098	+2	+1	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+3	0			+12
1104	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9
1111	+2	+2	+2	+1	-3	+1	+2	0	+4	0			+11
1114	0	+2	0	+2	-3	+1	-2	+2		0			+2
1116	+2	0	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
1122	0	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
1140	0	+2	+1	+1	-3	+1	-2	0		0			0
1143	0	+2	0	+2	-3				+3	0			+4
1144	0	+2	0	+3	-3	+1	-2	0	+3	0			+4
1145	0	+2	+1	0	-3	+1	-2	0	+3	0			+2
1149	+2	+2	+2	0	-3					0			+3
1154	+2	+2	0	-4	-3	+1	+2	0	-3	0			-3
1159	0	+2	+1	+1	-3				+3	0			+4
1165	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+7
1166	+2	+2	+2	0	-3	+1	+2	0		0			+6
1167	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
1171	+2	0	0	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+8
1172	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	-3	0			+4
1178	+2	0	+3	+3	-3	+1	+2	+2	-3	0			+6
1179	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
1190	0	+2	0	0	-3	+1	-2	0	+4	0			+2
1195	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+4
1196	+2	0	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+4
1200	+2	+2	+1	0	-3	+1			+4	0			+7
1203	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2		+3	0			+9
1203	+2	+2	+1	0	-3	+1	+2	0	-3	0			+2
1212	+2	+2	+3	+3	-3	+1	+2		+3	0			+13
1213	+2	0	+1	+3	-3	+1	+2	+2		0			+8
1214	+2	+2	0	+1	-3	+1		0		0			+3
1215	+2	+2	0	+1	-3	+1	+2	+2	+3	0			+10
1226	+2	+2	0	+3	-3	+1	+2	+2	-3	0			+6
1230	+2	+2	+1	+1	-3	+1			+3	0			+7
1234	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+11
1235	+2	+2	+1	+3	-3	+1			+3	0			+9
1242	0	+2	0	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+8
1251	0	+2	+1	0	-3	+1	+2	0	+5	0			+8
1266	+2	+2	+1	+3	-3	+1	+2	+2	+4	0			+14
1269	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+6
1277	+2	+2	0	0	-3	+1	+2	+2	+3	0			+9
1285	0	+2	+1	+1	-3				-3	0			-2
1287	0	+2	0	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+6
1288	0	+2	0	0	-3	+1	-2	0	+4	0			+2
1289	0	0	+1	+1	-3	+1	+2	0		0			+2
1301	0	0	0	+2	-3	+1	+2	0	+3	0			+5
1307	0	+2	+2	+3	-3	+1	+2	0	+3	0			+10
1309	+2	+2	+1	+1	-3	+1	+2	0	+3	0			+9

FA:AST/ALT	Fosfatase alcalina dividida por aspartato aminotransferase ou alanina aminotransferase
Gama	Gamaglobulina
AC	Auto-anticorpos hepáticos
Vírus	Sorologia viral
OH	Álcool
História AI	História de auto-imunidade
Bx	Biópsia Hepática
Outros AC	Outros auto-anticorpos
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
Res	Resposta

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. BIBLIOGRAFIA

1. Shukla DD, Hoyne PA, Ward CW. Evaluation of complete genome sequences and sequences of individual gene products for the classification of hepatitis C viruses. *Arch Virol* 1995;140(10):1747-61.
2. 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.
3. Kato N, Hijikata M, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(24):9524-8.
4. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991;14(2):381-8.
5. Choo QL, Richman KH, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, Gallegos C, Coit D, Medina-Selby R, Barr PJ, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(6):2451-5.
6. Pawlotsky JM, Germanidis G. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 1999;6(5):343-56.
7. Pinho J. O vírus da hepatite C (Cap.5). In: da Silva L, editor. *Hepatitis Agudas e Crônicas*. 3rd ed ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda.; 2003. p. 26-37.
8. Pozzetto B, Bourlet T, Grattard F, Bonneval L. Structure, genomic organization, replication and variability of hepatitis C virus. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11 Suppl 4:2-5.
9. Zeuzem S, Roth WK, Herrmann G. [Viral hepatitis C]. *Z Gastroenterol* 1995;33(2):117-32.
10. McHutchison JG. Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care* 2004;10(2 Suppl):S21-9.

11. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C in the West. *Semin Liver Dis* 1995;15(1):5-14.
12. EASL International Consensus Conference on hepatitis C. Paris, 26-27 February 1999. Consensus statement. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:3-8.
13. McHutchison JG, Bacon BR. Chronic hepatitis C: an age wave of disease burden. *Am J Manag Care* 2005;11(10 Suppl):S286-95; quiz S307-11.
14. SBH. Relatório do grupo de estudo. *GED* 1999;18:S3.
15. Focaccia R, da Conceicao OJ, Sette H, Jr., Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, Lorengo R, Vieira De Souza F, Kiffer CR, Santos EB, Gonzales MP, Saez-Alquezar A, Riscal JR, Fischer D. 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* 1998;2(6):269-284.
16. Krug LP, Lunge VR, Ikuta N, Fonseca AS, Cheinquer H, Ozaki LS, Barros SG. Hepatitis C virus genotypes in Southern Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1996;29(12):1629-32.
17. Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, Pereira LM, Coelho HS, Silva AO, Fonseca JC, Rosa H, Lacet CM, Bernardini AP. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(1):41-9.
18. Medeiros-Filho JEM, Guardia BD, Ono-Nita SK, Anjos LC, Gonçalves LL, Clemente CM, Couto CA, Vezozzo DP, Cancado ELR, Da Silva LC, Laudanna AA, Carrilho FJ. Aspectos epidemiológicos da infecção crônica pelo VHC no HC-FMUSP - São Paulo: Experiência de 628 casos. *Ged* 2001;20:40s.
19. Notaroberto S. Estudo epidemiológico coorte-transversal de portadores de infecção pelo vírus da hepatite C: Análise de 700 casos. São Paulo: Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo; 2004.

20. Wright EC, Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ, Buskell-Balles Z, Cain C, Group NS. Updated long-term mortality of transfusion associated hepatitis (THA), non-A, non-B and C. *Hepatology* 1998;Sect. 272A.
21. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, McQuillan GM, Gao F, Moyer LA, Kaslow RA, Margolis HS. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341(8):556-62.
22. Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening. *N Engl J Med* 1999;341(12):866-70.
23. Kawatani T, Suou T, Tajima F, Ishiga K, Omura H, Endo A, Ohmura H, Ikuta Y, Idobe Y, Kawasaki H. Incidence of hepatitis virus infection and severe liver dysfunction in patients receiving chemotherapy for hematologic malignancies. *Eur J Haematol* 2001;67(1):45-50.
24. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997;349(9055):825-32.
25. Alter HJ, Seeff LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 2000;20(1):17-35.
26. Soto B, Sanchez-Quijano A, Rodrigo L, del Olmo JA, Garcia-Bengoechea M, Hernandez-Quero J, Rey C, Abad MA, Rodriguez M, Sales Gilabert M, Gonzalez F, Miron P, Caruz A, Relimpio F, Torronteras R, Leal M, Lissen E. Human immunodeficiency virus infection modifies the natural history of chronic parenterally-acquired hepatitis C with an unusually rapid progression to cirrhosis. *J Hepatol* 1997;26(1):1-5.
27. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
28. Szabo E, Lotz G, Paska C, Kiss A, Schaff Z. Viral hepatitis: new data on hepatitis C infection. *Pathol Oncol Res* 2003;9(4):215-21.

29. Manns MP, Rambusch EG. Autoimmunity and extrahepatic manifestations in hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999;31 Suppl 1:39-42.
30. McMurray RW. Hepatitis C-associated autoimmune disorders. *Rheum Dis Clin North Am* 1998;24(2):353-74.
31. Obermayer-Straub P, Manns MP. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmun* 2001;16(3):275-85.
32. Antonelli A, Ferri C, Pampana A, Fallahi P, Nesti C, Pasquini M, Marchi S, Ferrannini E. Thyroid disorders in chronic hepatitis C. *Am J Med* 2004;117(1):10-3.
33. Monzani F, Caraccio N, Dardano A, Ferrannini E. Thyroid autoimmunity and dysfunction associated with type I interferon therapy. *Clin Exp Med* 2004;3(4):199-210.
34. Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y. Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): a model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2004;3(5):388-93.
35. Labbadia G, Martocchia A, Mammarella A, Paoletti V, Rocco A, Benvenuto R, Antonella P, Rosaria D, Trabace S, Musca A, Falaschi P. Association between human leukocyte antigen (HLA) and interferon- induced thyroid diseases in four patients with HCV-related chronic hepatitis. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26(2):109-12.
36. Zauli D, Cassani F, Bianchi FB. Auto-antibodies in hepatitis C. *Biomed Pharmacother* 1999;53(5-6):234-41.
37. Manns MP, Vogel A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology* 2006;43(2 Suppl 1):S132-44.
38. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31(5):929-38.

39. Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001;120(6):1485-501.
40. Czaja AJ, Strettell MD, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Donaldson PT, Williams R. Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1997;25(2):317-23.
41. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, Farrant JM, Duthie A, Mieli-Vergani G, McFarlane IG, Johnson PJ, Eddleston AL, Mowat AP, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994;19(3):609-15.
42. Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badia I, Remondino G, Ciocca M, Ramonet M, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 1994;41(2):146-50.
43. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, Mizuki N, Ando A, Tsuji K, Inoko H, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 1992;103(3):1041-7.
44. Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Perez-Luque E, Burguete A, Cano S, de la Rosa G, Bautista N, Hernandez A, Bandera J, Torres LF, Kershenobich D, Alvarez F, Gorodezky C. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28(6):985-90.
45. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badia I, Daruich J, Findor J, Tanno H, Canero-Velasco C, Fainboim L. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999;30(6):1374-80.
46. Goldberg AC, Bittencourt PL, Mougin B, Cancado EL, Porta G, Carrilho F, Kalil J. Analysis of HLA haplotypes in autoimmune hepatitis type 1: identifying the major susceptibility locus. *Hum Immunol* 2001;62(2):165-9.

47. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, Chiarella JM, Abrantes-Lemos CP, Baggio VL, Laudanna AA, Kalil J. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94(7):1906-13.
48. Baeres M, Herkel J, Czaja AJ, Wies I, Kanzler S, Cancado EL, Porta G, Nishioka M, Simon T, Daehnrich C, Schlumberger W, Galle PR, Lohse AW. Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 2002;51(2):259-64.
49. Cancado ELR, Farias AQ, Bittencourt PL. Hepatite Auto-imune(cap. 33). In: da Silva L, editor. *Hepatites Agudas e Crônicas*. 3rd ed ed. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda.; 2003. p. 278-295.
50. Dausset J. HLA Adventure. In: Terasaki PI, editor. *History of HLA: ten recollections*. California: UCLA tissue typing laboratory; 1990. p. 1-21.
51. Benacerraf B. Antigen processing and presentation. The biologic role of MHC molecules in determinant selection. *J Immunol* 1988;141(7 Suppl):S17-20.
52. Terasaki P. History of HLA: a personalized view. In: terasaki P, editor. *History of HLA: ten recollections*. California: UCLA tissue typing laboratory; 1990. p. 427-59.
53. Charron D, Fauchet R. Foreword: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, editor. *Proceedings of the Genetic diversity of HLA: functional and medical implications*. Paris: EDK; 1997. p. 25-28.
54. Alberts B, Johnson A, Lewis L, Raff M, Roberts K, Walter J. 24. The Adaptive Immune System. In: Alberts, B, Johnson, A, Lewis, L, Raff, M, Roberts, K, Walter, JD; 2002.
55. Korman AJ, Frantz JD, Strominger JL, Mulligan RC. Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(8):2150-4.
56. Bodmer JG, Marsh SG, Albert E. Nomenclature for factors of the HLA system, 1989. *Immunol Today* 1990;11(1):3-10.

57. Markert ML, Cresswell P. Polymorphism of human B-cell alloantigens: evidence for three loci within the HLA system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77(10):6101-4.
58. Strominger JL. Biology of the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) system and a hypothesis regarding the generation of autoimmune diseases. *J Clin Invest* 1986;77(5):1411-5.
59. Walker LE, Hewick R, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ, Reisfeld RA. N-terminal amino acid sequences of the alpha and beta chains of HLA-DR1 and HLA-DR2 antigens. *Biochemistry* 1983;22(1):185-8.
60. Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science* 1990;248(4961):1380-8.
61. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition. *Immunol Today* 1995;16(3):150-9.
62. Theofilopoulos AN. The basis of autoimmunity: Part I. Mechanisms of aberrant self-recognition. *Immunol Today* 1995;16(2):90-8.
63. Thorsby E. Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997;53(1):1-11.
64. Herd R. HLA and autoimmune disease. In: Lecher R, editor. *HLA and disease*. London: Academic Press; 1994. p. 123-51.
65. MARGULIES DH. The major histocompatibility complex. In: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Press; 1999. p. 263-85.
66. Mackay IR, Morris PJ. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. *Lancet* 1972;2(7781):793-5.
67. Bertrams J, Reis HE, Kuwert E, Selmaier H. Hepatitis associated antigen (HAA), HL-A antigens and auto-lymphocytotoxins (CoCoCy) in chronic aggressive and chronic persistent hepatitis. *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* 1974;146(4):300-7.

68. Galbraith RM, Eddleston AL, Smith MG, Williams R, McSween RN, Watkinson G, Dick H, Kennedy LA, Batchelor JR. Histocompatibility antigens in active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Br Med J* 1974;3(5931):604-5.
69. Page AR, Sharp HL, Greenberg LJ, Yunis EJ. Genetic analysis of patients with chronic active hepatitis. *J Clin Invest* 1975;56(3):530-5.
70. Lindberg J, Lindholm A, Lundin P, Iwarson S. Trigger factors and HL-A antigens in chronic active hepatitis. *Br Med J* 1975;4(5988):77-9.
71. Freudenberg J, Baumann H, Arnold W, Berger J, Buschenfelde KH. HLA in different forms of chronic active hepatitis. A comparison between adult patients and children. *Digestion* 1977;15(4):260-70.
72. Donaldson PT, Doherty DG, Hayllar KM, McFarlane IG, Johnson PJ, Williams R. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology* 1991;13(4):701-6.
73. Bittencourt P. Associação dos antígenos HLA-DR e DQ com a hepatite auto-imune tipos 1 e 2. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1999.
74. Yoshizawa K, Ota M, Saito S, Maruyama A, Yamaura T, Rokuhara A, Orii K, Ichijo T, Matsumoto A, Tanaka E, Kiyosawa K. Long-term follow-up of hepatitis C virus infection: HLA class II loci influences the natural history of the disease. *Tissue Antigens* 2003;61(2):159-65.
75. Nowakowska B, Kacprzak-Bergman I. [Association between HLA antigens and hepatitis C virus (HCV) infection]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2004;58:458-62.
76. Wang LY, Lin HH, Lee TD, Wu YF, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. Human leukocyte antigen phenotypes and hepatitis C viral load. *J Clin Virol* 2005;32(2):144-50.
77. Scotto G, Fazio V, D'Alessandro G, Monno L, Saracino A, Palumbo E, Angarano G. Association between HLA class II antigens and hepatitis C virus infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17(4):316-21.

78. McKiernan SM, Hagan R, Curry M, McDonald GS, Kelly A, Nolan N, Walsh A, Hegarty J, Lawlor E, Kelleher D. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology* 2004;40(1):108-14.
79. Zavaglia C, Bortolon C, Ferrioli G, Rho A, Mondazzi L, Bottelli R, Ghessi A, Gelosa F, Iamoni G, Ideo G. HLA typing in chronic type B, D and C hepatitis. *J Hepatol* 1996;24(6):658-65.
80. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Bottelli R, Daielli C, Asti M, Airolidi A, Salvaneschi L, Mondelli MU, Ideo G. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998;28(1):1-7.
81. Vejbaesya S, Songsivilai S, Tanwandee T, Rachaibun S, Chantangpol R, Dharakul T. HLA association with hepatitis C virus infection. *Hum Immunol* 2000;61(3):348-53.
82. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305(5685):872-4.
83. Jurado A, Cardaba B, Jara P, Cuadrado P, Hierro L, de Andres B, del Pozo V, Cortegano MI, Gallardo S, Camarena C, Barcena R, Castaner JL, Alvarez R, Lahoz C, Palomino P. Autoimmune hepatitis type 2 and hepatitis C virus infection: study of HLA antigens. *J Hepatol* 1997;26(5):983-91.
84. GAYOTTO LLC, SBP-SBH C. Visão histórica e consenso nacional sobre classificação das hepatites crônicas. *GED* 2000;19:137-40.
85. Cançado E. Técnica de pesquisa do anticorpo antiactina e relação de sua positividade com o anticorpo antimúsculo liso e o diagnóstico de hepatite auto-imune. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1995.
86. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16(3):1215.

87. Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Charron D, Dupont B, Erlich HA, Fauchet R, Mach B, Mayr WR, Parham P, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the HLA System, 1996. *Hum Immunol* 1997;53(1):98-128.
88. Bardella MT, Fraquelli M, Quatrini M, Molteni N, Bianchi P, Conte D. Prevalence of hypertransaminasemia in adult celiac patients and effect of gluten-free diet. *Hepatology* 1995;22(3):833-6.
89. Clemente MG, Musu MP, Frau F, Brusco G, Sole G, Corazza GR, De Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut* 2000;47(4):520-6.
90. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002;37(3):302-8.
91. Tanaka H, Tujioka H, Ueda H, Hamagami H, Kida Y, Ichinose M. Autoimmune hepatitis triggered by acute hepatitis A. *World J Gastroenterol* 2005;11(38):6069-71.
92. Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006;22(3):234-40.
93. Manns MP. Hepatotropic viruses and autoimmunity 1997. *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1:7-10.
94. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach PJ, Moore SB. Significance of human leukocyte antigens DR3 and DR4 in chronic viral hepatitis. *Dig Dis Sci* 1995;40(10):2098-106.
95. Zeniya M, Aizawa Y, Watanabe F, Kawabe T, Hara M, Sakaguchi M, Toda G. HCV-marker-positive autoimmune-type chronic active hepatitis: a possible relation between HCV infection and liver autoreaction. *Liver* 1994;14(4):206-12.
96. Tolokonskaia NP, Konenkov VI. [The clinical immunogenetics of viral hepatitis C in a Caucasoid population of western Siberia]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2000(3):78-80.

97. Kiyosawa K, Seki T, Tanaka E, Sodeyama T, Furuta K, Furuta S, Hino K, Ota M, Inoko H. Comparison of the clinical and immunogenetic features between patients with autoimmune hepatitis and patients with type C chronic active hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1993;28 Suppl 4:63-8; discussion 76-80.
98. Farias AQ, Goncalves LL, Bittencourt PL, De Melo ES, Abrantes-Lemos CP, Porta G, Nakhle MC, Carrilho FJ, Cancado EL. Applicability of the IAIHG scoring system to the diagnosis of antimitochondrial/anti-M2 seropositive variant form of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21(5):887-93.
99. Porta G. [Autoimmune hepatitis]. *J Pediatr (Rio J)* 2000;76 Suppl 1:S181-6.
100. Cancado ELR, Porta G. Autoimmune hepatitis in South America. In: Publishers DKA, editor. *Imunology and Liver - Falk Symposium 114*: Manns, M.P. Paumgartner, G. Leuschner, U; 2000. p. 82-92.
101. Czaja AJ, Manns MP, Homburger HA. Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis. *Gastroenterology* 1992;103(4):1290-5.
102. Duclos-Vallee JC, Johanet C, Bach JF, Yamamoto AM. Autoantibodies associated with acute rejection after liver transplantation for type-2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000;33(1):163-6.
103. Schapiro GD, Friedman LS. Autoimmune hepatitis and/or hepatitis C: how to decide. *Hepatology* 1996;23(3):647-9.
104. Esteban R. Managing patients on interferon therapy. *Dig Dis Sci* 1996;41(12 Suppl):121S-125S.
105. Lunel F. Hepatitis C virus and autoimmunity: fortuitous association or reality? *Gastroenterology* 1994;107(5):1550-5.
106. Lunel F, Abuaf N, Frangeul L, Gripon P, Perrin M, Le Coz Y, Valla D, Borotto E, Yamamoto AM, Huraux JM, et al. Liver/kidney microsome antibody type 1 and hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16(3):630-6.

107. Ma Y, Peakman M, Lenzi M, Gaken J, Thomas MG, Farzaneh F, Ballardini G, Cassani F, Mieli-Vergani G, Bianchi FB, et al. Case against subclassification of type II autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1993;341(8836):60.
108. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 1996;334(14):897-903.
109. Bianchi FB. Autoimmune hepatitis: the lesson of the discovery of hepatitis C virus. *J Hepatol* 1993;18(3):273-5.
110. Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW, Gerken G, Treichel U, Lohr HF, Mohr H, Grosse A, Dienes HP. The role of autoimmunity in hepatitis C infection. *J Hepatol* 1995;22(1 Suppl):93-6.
111. Durazzo M, Philipp T, Van Pelt FN, Luttig B, Borghesio E, Michel G, Schmidt E, Loges S, Rizzetto M, Manns MP. Heterogeneity of liver-kidney microsomal autoantibodies in chronic hepatitis C and D virus infection. *Gastroenterology* 1995;108(2):455-62.
112. Toda G, Zeniya M, Watanabe F, Imawari M, Kiyosawa K, Nishioka M, Tsuji T, Omata M. Present status of autoimmune hepatitis in Japan--correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. *J Hepatol* 1997;26(6):1207-12.
113. Miyakawa H, Kitazawa E, Abe K, Kawaguchi N, Fuzikawa H, Kikuchi K, Kako M, Komatsu T, Hayashi N, Kiyosawa K. Chronic hepatitis C associated with anti-liver/kidney microsome-1 antibody is not a subgroup of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol* 1997;32(6):769-76.
114. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-9.
115. Czaja AJ, Santrach PJ, Breannan Moore S. Shared genetic risk factors in autoimmune liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46(1):140-7.
116. Ellett ML. Autoimmune hepatitis. *Gastroenterol Nurs* 2000;23(4):157-9.

117. Ma X, Qiu DK. Relationship between autoimmune hepatitis and HLA-DR4 and DRbeta allelic sequences in the third hypervariable region in Chinese. *World J Gastroenterol* 2001;7(5):718-21.
118. Vadheim CM, Rotter JI, Maclaren NK, Riley WJ, Anderson CE. Preferential transmission of diabetic alleles within the HLA gene complex. *N Engl J Med* 1986;315(21):1314-8.
119. Reveille JD. Genetic studies in the rheumatic diseases: present status and implications for the future. *J Rheumatol Suppl* 2005;72:10-3.
120. Aringer M, Steiner G, Smolen JS. Does mixed connective tissue disease exist? Yes. *Rheum Dis Clin North Am* 2005;31(3):411-20, v.
121. Giordano M, D'Alfonso S, Momigliano-Richiardi P. Genetics of multiple sclerosis: linkage and association studies. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2(1):37-58.
122. Tsubota K, Fujihara T, Saito K, Takeuchi T. Conjunctival epithelium expression of HLA-DR in dry eye patients. *Ophthalmologica* 1999;213(1):16-9.
123. Pisella PJ, Brignole F, Debbasch C, Lozato PA, Creuzot-Garcher C, Bara J, Saiag P, Warnet JM, Baudouin C. Flow cytometric analysis of conjunctival epithelium in ocular rosacea and keratoconjunctivitis sicca. *Ophthalmology* 2000;107(10):1841-9.
124. Tanasescu C, Parvu M, Antohi I, Lazar S. The significance of chronic hepatitis B and C virus infections in some connective tissue diseases: the association with chronic liver disease. *Rom J Intern Med* 1999;37(1):53-64.
125. Hwang SJ, Chu CW, Huang DF, Lan KH, Chang FY, Lee SD. Genetic predispositions for the presence of cryoglobulinemia and serum autoantibodies in Chinese patients with chronic hepatitis C. *Tissue Antigens* 2002;59(1):31-7.
126. Passos de Souza E, Evangelista Segundo PT, Jose FF, Lemaire D, Santiago M. Rheumatoid arthritis induced by alpha-interferon therapy. *Clin Rheumatol* 2001;20(4):297-9.

127. Del Porto P, Puntoriero G, Scotta C, Nicosia A, Piccolella E. High prevalence of hypervariable region 1-specific and -cross-reactive CD4(+) T cells in HCV-infected individuals responsive to IFN-alpha treatment. *Virology* 2000;269(2):313-24.
128. Kwok WW, Lotshaw C, Milner EC, Knitter-Jack N, Nepom GT. Mutational analysis of the HLA-DQ3.2 insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(3):1027-30.
129. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatology (Oxford)* 2000;39(10):1060-6.
130. Bias WB, Meyers DA, Conley CL, Reveille JD, Wilson RW, Arnett FC. Evidence that autoimmunity is a mendelian dominant trait. *Am J Hum Genet* 1983;35:77 A.
131. Grundbacher FG. Classification of experimental data for genetic analysis in autoimmune disease. *Am J Hum Genet* 1988;42(1):178.
132. Bias WB. Evidence that autoimmunity in man is a Mendelian dominant trait. *Am J Hum Genet* 1988;42(1):178-9.
133. Adams DD, Knight JG. H gene theory of inherited autoimmune disease. *Lancet* 1980;1(8165):396-8.
134. Epplen JT. On genetic components in autoimmunity: a critical review based on evolutionarily oriented rationality. *Hum Genet* 1992;90(4):331-41.
135. Moghaddam PH, Zwinderman AH, de Knijff P, Roep BO, Schipper RF, Van der Auwera B, Naipal A, Gorus F, Schuit F, Giphart MJ. TNFa microsatellite polymorphism modulates the risk of IDDM in Caucasians with the high-risk genotype HLA DQA1*0501-DQB1*0201/DQA1*0301-DQB1*0302. *Belgian Diabetes Registry. Diabetes* 1997;46(9):1514-5.
136. Ettinger RA, Liu AW, Nepom GT, Kwok WW. Exceptional stability of the HLA-DQA1*0102/DQB1*0602 alpha beta protein dimer, the class II MHC molecule associated with protection from insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol* 1998;161(11):6439-45.

137. Sadeharju K, Knip M, Hiltunen M, Akerblom HK, Hyoty H. The HLA-DR phenotype modulates the humoral immune response to enterovirus antigens. *Diabetologia* 2003;46(8):1100-5.
138. LaFleur C, Granados J, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales J, Villarreal-Garza C, Higuera L, Hernandez-Pacheco G, Cutino-Moguel T, Rangel H, Figueroa R, Acosta M, Lazcano E, Ramos C. HLA-DR antigen frequencies in Mexican patients with dengue virus infection: HLA-DR4 as a possible genetic resistance factor for dengue hemorrhagic fever. *Hum Immunol* 2002;63(11):1039-44.
139. Forzani B, Actis GC, Verme G, Amoroso A, Borelli I, Curtoni ES, Rumi MG, Picciotto A, Marinucci G, Freni MA, et al. HLA-DR antigens in HBsAg-positive chronic active liver disease with and without associated delta infection. *Hepatology* 1984;4(6):1107-10.
140. Fabio G, Smeraldi RS, Gringeri A, Marchini M, Bonara P, Mannucci PM. Susceptibility to HIV infection and AIDS in Italian haemophiliacs is HLA associated. *Br J Haematol* 1990;75(4):531-6.
141. Thursz MR, Thomas HC, Greenwood BM, Hill AV. Heterozygote advantage for HLA class-II type in hepatitis B virus infection. *Nat Genet* 1997;17(1):11-2.
142. Ito K, Bian HJ, Molina M, Han J, Magram J, Saar E, Belunis C, Bolin DR, Arceo R, Campbell R, Falcioni F, Vidovic D, Hammer J, Nagy ZA. HLA-DR4-IE chimeric class II transgenic, murine class II-deficient mice are susceptible to experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1996;183(6):2635-44.
143. Wei HY, Tsai KC, Lin TH. Modeling ligand-receptor interaction for some MHC class II HLA-DR4 peptide mimetic inhibitors using several molecular docking and 3D QSAR techniques. *J Chem Inf Model* 2005;45(5):1343-51.
144. Ahmad A, Thomas E. Autoimmune hepatitis--a diagnostic challenge. *Tenn Med* 2000;93(3):95-8.
145. Omagari K, Kinoshita H, Kato Y, Nakata K, Kanematsu T, Kusumoto Y, Mori I, Furukawa R, Tanioka H, Tajima H, Koga M, Yano M, Kohno S. Clinical features of 89 patients with autoimmune hepatitis in Nagasaki Prefecture, Japan. *J Gastroenterol* 1999;34(2):221-6.

146. Mabee CL, Thiele DL. Mechanisms of autoimmune liver disease. *Clin Liver Dis* 2000;4(2):431-45, vii.
147. Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Czaja AJ, Williams R. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1997;112(6):2028-35.
148. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31(1):49-53.
149. Arenz M, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohr HF. Limited T cell receptor Vbeta-chain repertoire of liver-infiltrating T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28(1):70-7.
150. Yoshizawa K, Ota M, Katsuyama Y, Ichijo T, Inada H, Umemura T, Tanaka E, Kiyosawa K. T cell repertoire in the liver of patients with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 1999;60(9):806-15.
151. Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ, Donaldson PT. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1999;30(4):851-6.
152. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;117(3):645-52.
153. Carrington M, Martin MP. The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;298:225-57.