DANIELA FERNANDES CARDOSO

**Influência da infecção pelo vírus linfotrópico
humano tipo 1 (HTLV-1) em parâmetros
laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Jorge Casseb

São Paulo
2008

DANIELA FERNANDES CARDOSO

**Influência da infecção pelo vírus linfotrópico
humano tipo 1 (HTLV-1) em parâmetros
laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientador: Prof. Dr. Jorge Casseb

**São Paulo
2008**

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, com muito amor, ao meu pai.
Mesmo longe das minhas vistas você nunca esteve fora
dos meus pensamentos. E isso me deu forças para
chegar até aqui. Te amo eternamente!*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jorge Casseb, pela amizade, dedicação, incentivo e confiança que me fez crescer não só cientificamente, mas também contribuindo na minha formação pessoal, meu eterno agradecimento pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Alberto Duarte, responsável pelo LIM-56, que gentilmente abriu as portas de seu laboratório dando-me a oportunidade de fazer parte de sua equipe e possibilitando a execução deste trabalho.

Ao Dr. Fernando Vieira, do Ambulatório de Hepatologia, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pela disponibilidade em compartilhar informações dos pacientes e por seu interesse na participação deste trabalho.

A todos os colegas do grupo de HTLV, por compartilharem protocolos, conhecimento, experiência, dicas e conselhos, todos fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos pesquisadores, funcionários e pós-graduandos do LIM56, pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

À Banca de qualificação, Dr. João Renato Rebello Pinho, Dra. Norma de Paula Cavalheiro e Dra. Patrícia Novoa, pela discussão e sugestões que tanto me ajudaram a concluir este trabalho.

A toda equipe do Departamento de Fisiopatologia experimental, FMUSP, pela atenção e por todos os esclarecimentos das questões relacionadas a este trabalho.

À Dra. Luiza, que me ajudou com a terapia a superar um período extremamente difícil e a enfrentar a vida de frente, porém com mais sutileza.

A todos meus familiares, amigos, namorado que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, seja incentivando, dando conselhos, alegrias, broncas, ou simplesmente estando ao meu lado.

E com especial carinho a todos os pacientes participantes, que tornaram este trabalho realidade.

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 Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2005.

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	02
1.1 Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV).....	02
1.2 Estrutura e organização genômica do HCV.....	05
1.3 Genótipos do HCV.....	07
1.4 Diagnóstico laboratorial da hepatite C.....	09
1.5 Imunopatogenia da infecção pelo HCV.....	12
1.6 História natural da infecção pelo HCV.....	16
1.7 Infecção pelo vírus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1).....	17
1.8 Estrutura e organização genômica do HTLV-1.....	19
1.9 Imunopatogenia da infecção pelo HTLV-1.....	20
1.10 Co-infecção HCV e HTLV-1.....	23
1.11 Justificativa.....	24
2. OBJETIVOS.....	27
3.MÉTODOS.....	29
3.1 Casuística.....	29
3.2 Aspectos éticos.....	30
3.3 Coleta das amostras.....	31
3.4 Revisão dos prontuários médicos.....	31
3.5 Métodos.....	35
3.6 <i>Análise estatística</i>	36
 4. <i>RESULTADOS</i>	 39
4.1 População de estudo.....	39

4.2 Características demográficas e epidemiológicas.....	40
4.3 Características virológicas.....	43
4.4 Características histológicas.....	44
4.5 Contagem de linfócitos TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	45
4.6 Enzimas hepáticas.....	48
4.7 Bilirrubinas.....	53
4.8 Proteínas totais e frações.....	56
4.9 Alfa-fetoproteína.....	59
4.10 Contagem de plaquetas.....	59
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÕES.....	72
7. ANEXOS.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	82

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATL	Leucemia/linfoma de células T do adulto
bDNA	“branched DNA” ou DNA ramificado
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CD81	Classe de diferenciação 81
CD4	Classe de diferenciação 4
CD8	Classe de diferenciação 8
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
E1	Glicoproteína 1 do envelope do HCV
E2	Glicoproteína 2 do envelope do HCV
EASL	European Association for the Study of the Liver
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
ELISA/EIA	Ensaio imunoenzimático
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamiltransferase
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HTLV-1	Vírus Linfotrópico Humano tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico Humano tipo 2
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IFN	Interferon
LTR	“Long terminal repeats”

NIH	National Institute of Health
NK	Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase aberta de leitura
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
SAME	Serviço de arquivo médico e estatística
SBI	Sociedade Brasileira de Infectologia
Th1	Linfócito T auxiliar 1
TMA	Amplificação mediada por transcrição
UDI	Usuário de drogas intravenosas
UTR	Região terminal não-traduzida

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Prevalência mundial estimada da infecção pelo HCV.....	03
Figura 2	Estrutura do vírus da hepatite C.....	05
Figura 3	Organização genômica do HCV.....	06
Figura 4	Valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	47
Figura 5	Valores absolutos de linfócitos T CD8 ⁺ dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	47
Figura 6	Níveis plasmáticos de AST dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1.....	51
Figura 7	Níveis plasmáticos de ALT dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1.....	51
Figura 8	Níveis plasmáticos de GT dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1.....	52
Figura 9	Níveis plasmáticos de FA dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1.....	52
Figura 10	Níveis plasmáticos de bilirrubina indireta dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	54
Figura 11	Níveis plasmáticos de bilirrubina indireta dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	55
Figura 12	Níveis plasmáticos de bilirrubina direta dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	55
Figura 13	Níveis plasmáticos de proteínas totais dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	57

Figura 14	Níveis plasmáticos de albumina dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	58
Figura 15	Níveis plasmáticos de globulinas dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	58
Figura 16	Níveis plasmáticos de alfa-fetoproteína dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	59
Figura 17	Contagem de plaquetas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas, fatores de risco para aquisição viral e tempo do diagnóstico de hepatite C dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1.....	41
Tabela 2	Genótipos do HCV dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	43
Tabela 3	Presença de cirrose entre os pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	45
Tabela 4	Valores absolutos de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1.....	46
Tabela 5	Comparação da proporção de pacientes com resultados de enzimas hepáticas dentro da normalidade.....	48
Tabela 6	Comparação dos níveis plasmáticos de enzimas hepáticas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	49
Tabela 7	Comparação dos níveis plasmáticos de bilirrubinas dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1.....	53
Tabela 8	Comparação dos níveis plasmáticos de proteínas totais dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	56
Tabela 9	Comparação dos níveis plasmáticos de alfafetoproteína dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	59
Tabela 10	Comparação da contagem de plaquetas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1.....	60

RESUMO

RESUMO

Cardoso, DF. Avaliação da carga viral do vírus da hepatite C em pacientes co-infectados com o HTLV-1 [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 95p.

INTRODUÇÃO: O vírus da hepatite C (HCV) e o vírus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1) têm modos de transmissão semelhantes e por esse motivo alguns indivíduos apresentam co-infecção. Sabe-se que o HTLV-1 pode causar uma diminuição da resposta imune celular nos indivíduos infectados, e por esse motivo pode-se esperar uma possível influência na infecção causada pelo HCV. Embora alguns trabalhos apontem para um pior prognóstico da hepatite C em pacientes co-infectados com o HTLV-1, a interação entre essas duas infecções ainda é pouco compreendida. Por este motivo, este estudo buscou avaliar a influência da infecção pelo HTLV-1 em parâmetros laboratoriais de pacientes com infecção crônica pelo HCV.

MÉTODOS: Foram selecionados pacientes com infecção crônica pelo HCV e atendidos no Ambulatório de Hepatologia, do IIER, entre julho e novembro de 2007. Os pacientes co-infectados com o HTLV-1 foram selecionados a partir de um banco de dados composto por pacientes provenientes do Ambulatório de HTLV, também do IIER. Foram excluídos os pacientes que já haviam sido tratados para hepatite C, ou que apresentavam infecção por HBV ou HIV. Doze pacientes co-infectados com o HTLV-1 foram comparados a vinte e três pacientes somente com infecção crônica pelo HCV, no que diz respeito a dados demográficos, epidemiológicos, histológicos e testes bioquímicos de função hepática. Amostras de sangue periférico foram coletadas para contagem de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Não houve diferença significativa em relação à idade, sexo, consumo de álcool, tabagismo, tempo de diagnóstico de hepatite C e genótipo do HCV. O uso de drogas endovenosas foi o fator de risco mais comum entre os indivíduos co-infectados com o HTLV-1, sugerindo que possivelmente tal prática possa estar relacionada com a co-infecção com o HCV. Os indivíduos co-infectados com o HTLV-1 apresentaram contagem de linfócitos T CD8⁺ mais elevada do que os pacientes infectados somente pelo HCV, e valores medianos significativamente mais baixos de AST e ALT ($p=0,0437$ e $0,0159$, respectivamente). Além disso, uma porcentagem significativamente menor de pacientes co-infectados com o HTLV-1 possuíam valores de enzimas hepáticas AST, ALT e GGT dentro da normalidade ($p= 0,005$, $0,008$ e $0,04$, respectivamente). Apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa, observou-se também uma ocorrência menor de cirrose hepática entre os indivíduos co-infectados com o HTLV-1. **CONCLUSÕES:** Esses achados sugerem que a infecção pelo HTLV-1 diminuiria a lesão hepática imunomediada, podendo influenciar na história natural da infecção crônica pelo HCV.

SUMMARY

SUMMARY

Cardoso, DF. HCV viral load evaluation in patients with HTLV-1 co-infection [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 95 p.

BACKGROUND: Hepatitis C virus (HCV) and human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) share similar routes of transmission and some individuals have dual infection. Since HTLV-1 can cause a functional impairment of cellular immune response among carriers, we can expect that the coinfection can modify the outcome of liver disease. Although some studies point to a worse prognosis of hepatitis C in patients co-infected with HTLV-1, the interaction between these two infections is still poorly understood. Therefore, this study was to evaluate the influence of HTLV-1 in laboratory parameters of patients with chronic HCV infection. The aim of this study was to evaluate the influence of HTLV-1 infection on some laboratory parameters in chronic HCV patients. **METHODS:** There were selected patients with chronic HCV infection followed at Hepatology Outpatient Clinic, in IIER, between July and November 2007. Patients co-infected with HTLV-1 were selected from a database composed of patients from the HTLV Clinic, also in IIER. We excluded patients who had already been treated for hepatitis C or who had HBV or HIV infection. Twelve patients co-infected with HTLV-1 were compared to only twenty-three patients with chronic HCV infection, with respect to demographics, epidemiological, histological and biochemical tests of liver function. Peripheral blood samples were collected for TCD8+ and TCD4+ counts by flow cytometry. **RESULTS:** There was no significant difference regarding to age, sex, alcohol consumption, smoking, time of diagnosis of hepatitis C and HCV genotype. Intravenous drug use was the most common risk factor among individuals co-infected with HTLV-1, suggesting that such a practice could possibly be related to the co-infection with HCV. Individuals co-infected with HTLV-1 showed higher TCD8+ counts than patients infected by HCV only, and significantly lower median values of AST and ALT ($p = 0.0437$ and 0.0159 , respectively). Moreover, a significantly lower percentage of patients co-infected with HTLV-1 have values of liver enzymes AST, ALT and GGT within the normal range ($p = 0.005$, 0.008 and 0.04 , respectively). Although there is no statistically significant difference, there is also a lower incidence of liver cirrhosis among individuals co-infected with HTLV-1. **CONCLUSIONS:** Subjects coinfecting HCV/HTLV-1 had lower plasmatic transaminase levels than HCV infected subjects, mostly into normal ranges. This finding may suggest that the interaction with HTLV-1 can reduce the liver injury during chronic phase of HCV infection.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecção pelo vírus da hepatite C (HCV)

Desde sua descoberta em 1989 por Choo et al., o vírus da hepatite C (HCV) tem sido reconhecido como o maior agente causador de doença hepática crônica em todo o mundo, constituindo um grave problema de saúde pública. Estima-se que aproximadamente 170 milhões de pessoas (cerca de 3% da população mundial) estejam infectadas pelo HCV no mundo (Alberti, Benvegnù, 2003).

Apesar de o HCV ser endêmico em todo o mundo, sua prevalência entre a população varia muito em diferentes partes do mundo. Os países com as maiores taxas de prevalência descritas estão localizados na África e na Ásia; áreas com baixa prevalência são observadas em países industrializados na América do Norte, norte e oeste da Europa, e Austrália. Na América do Norte, os Estados Unidos e o Canadá apresentam prevalências de 0,3% e 0,6% respectivamente (Botté, Janot, 1996). Na Europa encontram-se prevalências variando entre 0,05% a 0,93%, sendo esta maior na região do Mediterrâneo (Schottstedt et al., 1998; Morris et al., 1998; Pratti et al., 1997; Mutimer et al., 1999). Regiões de alta prevalência (1,6% a 3,5%) são descritas no Japão, Indonésia, algumas áreas da Rússia e Oriente Médio (Shepard et al., 2005). Prevalências ainda maiores foram

relatadas em algumas regiões de Camarões (6,4%), Egito (14%) e cidade do Cairo (26%) (Shepard et al., 2005).

No Brasil, estimativas da Organização Mundial de Saúde (WHO) sugerem que entre 2,5% e 4,9% da população em geral apresentam anticorpos anti-HCV, o que corresponderia a cerca de 3,9 a 7,6 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2000). Na cidade de São Paulo um estudo populacional demonstrou que 1,42% dos indivíduos estão infectados pelo HCV, sendo que esta prevalência varia com a faixa etária (Foccacia et al., 2004).

Figura 1. Prevalência mundial estimada da infecção pelo vírus da hepatite C (Fonte: Organização Mundial da Saúde)

O HCV é transmitido principalmente pela exposição a sangue infectado. Há alguns anos, a transfusão de hemoderivados era um meio muito eficiente de transmissão do HCV. Atualmente, com a adoção de medidas preventivas nos bancos de sangue, como o preenchimento de questionários sobre possíveis fatores de risco para exposição viral e a triagem sorológica, o risco de transmissão por transfusão de hemoderivados tornou-se quase nulo. No Brasil, a triagem sorológica para o HCV tornou-se obrigatória após 1993.

Os usuários de drogas intravenosas (UDI) não têm apenas a maior prevalência de infecção pelo HCV, mas também constituem um possível reservatório do HCV na comunidade. A incidência varia entre 31% até mais de 98% em diferentes partes do mundo. A prevalência da infecção pelo HCV varia proporcionalmente com a duração do uso de drogas intravenosas (Lamden et al., 1998; Bell et al., 1990).

A transmissão do HCV através de exposição ocupacional, perinatal e sexual ocorre com muito menor eficiência, quando comparado com a transmissão através de exposição percutânea. Deste modo, é pouco provável que essas formas de transmissão sejam as principais fontes das novas infecções pelo HCV (Shepard et al., 2005).

A hepatite C raramente é diagnosticada na fase aguda, devido ao fato de a maioria das infecções agudas serem assintomáticas ou acompanhadas de sintomas leves. Em 20 a 30% dos casos pode haver icterícia, mal estar e náuseas (NIH, 2002). A mortalidade na fase aguda é baixa e na maioria dos casos (50% – 80%) a doença evolui para sua fase crônica, que é definida

pela persistência do RNA do HCV no sangue por mais de seis meses (Seef, 2002).

1.2 Estrutura e organização genômica do HCV

O vírus da hepatite C é um membro da família *Flaviviridae*, gênero *Hepacivirus* (Simmonds et al., 2005). O HCV é um vírus esférico e envelopado, com cerca de 50 nm de diâmetro. A partícula viral é formada por um envelope lipídico, onde se encontram as glicoproteínas virais E1 e E2, o capsídeo protéico formado pela proteína viral core e em seu interior, uma fita de RNA linear com polaridade positiva (Imbert et al., 2004).

Figura 2. Estrutura do vírus da hepatite C (Fonte: Perkins JA, 2001- modificado)

O genoma do HCV, com cerca de 10.000 nucleotídeos contém três regiões distintas: uma região 5' não traduzida (5' UTR) de 341 pares de bases; uma longa fase de leitura aberta que codifica uma poliproteína de 3.011 aminoácidos; e uma região 3' não traduzida (3' UTR) de cerca de 27 pares de bases (Zein, 2000).

Figura 3. Organização genômica do HCV (Fonte: Lauer GM, Walker BD, 2001-modificado)

A poliproteína viral é clivada em seu pólo N-terminal e origina três proteínas estruturais (core, E1, E2), que estão envolvidas na organização arquitetural do HCV. No pólo C-terminal a poliproteína é clivada em seis proteínas não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B e NS6), responsáveis pelo ciclo biológico do vírus (McGarvey et al., 1998).

1.3 Genótipos do HCV

Diferentes isolados do HCV, de diferentes regiões geográficas, demonstraram substancial variabilidade nucleotídica por todo o genoma viral (Choo et al., 1991). De acordo com sistema de classificação proposto por Simmonds et al. (1994) o HCV é classificado com base na similaridade da seqüência nucleotídica em grupos genéticos principais designados “genótipos”.

O HCV é agrupado em seis diferentes genótipos identificados por números arábicos (1 a 6) e vários subtipos, denominados por letras minúsculas (a,b,c, etc) (Simmonds, 2004). Os genótipos diferem entre si em 31% a 34% da seqüência de nucleotídeos e os subtipos de 20% a 23%, sendo que essa diferença varia de acordo com a região do genoma (Pawlotsky, 2004).

Diferenças regionais substanciais parecem existir com relação à distribuição dos genótipos do HCV. Embora os genótipos 1,2 e 3 pareçam ter uma distribuição mundial, sua prevalência relativa varia de uma área geográfica para outra (Zein, 2000).

Os subtipos 1a e 1b são mais comuns nos Estados Unidos e na Europa (Zein et al., 1996; Macomish et al., 1994). No Japão, o subtipo 1b é responsável por 73% dos casos de hepatite C (Takada et al., 1993). Os subtipos 2a e 2b são relativamente comuns na América do Norte, Europa e Japão, enquanto que o subtipo 2c é encontrado no norte da Itália. O subtipo 3a é particularmente prevalente em usuários de drogas na Europa e nos

Estados Unidos (Pawlotsky et al., 1995). O genótipo 4 é altamente endêmico no meio oeste, principalmente no Egito, onde há evidências para a inadvertida disseminação do HCV em larga escala através de seringas utilizadas no tratamento de esquistossomose nos anos 1950 e 1960 (Frank et al., 2000). Os genótipos 5 e 6 são encontrados exclusivamente no sul da África e em Hong Kong, respectivamente (Cha et al., 1992).

No Brasil, Campiotto et al. (2005) determinaram a frequência dos genótipos do HCV em diferentes regiões do país. A frequência de genótipos encontrada foi de 64,9% para o genótipo 1; 1,46% para o genótipo 2; 30,2% para o genótipo 3; 0,2% para o genótipo 4 e 0,1% para o genótipo 5. Em todas as regiões o genótipo 1 foi o mais freqüente (51,7% a 74,1%), sendo que os maiores valores são da região norte. O genótipo 2 foi o mais prevalente no estado de Mato Grosso, enquanto o genótipo 3 foi mais comum no sul (43,2%). Os genótipos 4 e 5 foram raramente encontrados e somente no estado de São Paulo.

A determinação dos genótipos é útil não só para estudos epidemiológicos, mas também na prática clínica. Amoroso et al. (1998) investigaram o papel dos genótipos do HCV na persistência da infecção pelo HCV e notaram que o grau de evolução para cronicidade após uma exposição aguda ao HCV foi de 92% em pacientes expostos ao genótipo 1b, e 33 a 50% nos pacientes expostos a outros genótipos, evidenciando que fatores virais do HCV têm um papel importante no desenvolvimento da infecção crônica.

O papel dos genótipos do HCV na progressão da doença hepática é uma das áreas de pesquisa do HCV mais controversas. Alguns autores demonstraram que em pacientes com infecção crônica pelo HCV, a infecção com o genótipo 1b está associada com uma doença hepática mais grave e um curso mais agressivo do que a infecção com outros genótipos do HCV (Pozzato et al., 1991). Além disso, entre os pacientes infectados com o genótipo 1b há um maior risco de desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Zein et al., 1996; Savino et al., 2007).

1.4 Diagnóstico laboratorial da hepatite C

A disponibilidade de testes diagnósticos data de 1989, quando o genoma do HCV foi decodificado por Choo et al. A produção de antígenos e peptídeos sintéticos possibilitou o desenvolvimento de testes que permitem a detecção de anticorpos contra o HCV (anti-HCV), como os testes de ELISA. O desenvolvimento de técnicas para detecção qualitativa e quantitativa do RNA do HCV, através da técnica de PCR, aumentou a acurácia diagnóstica. Atualmente, o diagnóstico laboratorial da hepatite C baseia-se em métodos sorológicos e de biologia molecular.

O diagnóstico sorológico da hepatite C é o mais frequentemente empregado, sendo a forma mais prática de identificar infecção atual ou pregressa. Os anticorpos anti-HCV são frequentemente detectados utilizando-se ensaios imunoenzimáticos de terceira (EIA/ELISA-3) e quarta (EIA/ELISA-4) gerações, os quais contêm antígenos do core e genes não-

estruturais do HCV (Alter et al., 2003). Devido à baixa especificidade dos ELISA, há em muitos casos a necessidade de realização de um teste suplementar para confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV em indivíduos com resultados positivos, utilizando a técnica de immunoblot (Brandão et al., 2001).

Nos pacientes com sorologia positiva para o HCV, a pesquisa qualitativa do RNA do HCV deve ser realizada para identificar e diferenciar os indivíduos com infecção crônica e aqueles que eliminaram o vírus espontaneamente. A pesquisa do RNA do HCV é realizada através de testes qualitativos como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) ou amplificação mediada por transcrição (TMA). A presença de RNA HCV no plasma é altamente específica para a infecção pelo HCV. O RNA HCV é detectável durante o curso da doença, mesmo antes da elevação do nível de ALT e após a sua normalização (Farci et al., 1991). O diagnóstico de hepatite C crônica é confirmado quando ambos anticorpos anti-HCV e RNA HCV estão presentes no plasma (EASL, 1999).

Outros testes laboratoriais de grande importância, especialmente em pacientes que irão realizar a terapia com interferon-alfa e ribavirina, são a genotipagem do HCV e quantificação da carga viral. A identificação do genótipo do HCV é realizada através de ensaios que têm como alvo a região altamente conservada 5' NCR do genoma do HCV, como a técnica de hibridização reversa (LIPA); ou por técnicas de sequenciamento direto dos nucleotídeos que compõem o genoma viral (Scott, Gretch, 2007). A quantificação do RNA do HCV no plasma pode ser feita pela técnica de PCR

ou bDNA e é de grande importância para o acompanhamento de pacientes durante o tratamento (Ferreira-Gonzalez, Shiffman, 2004).

A dosagem de alanina aminotransferase (ALT) é o principal marcador bioquímico de lesão hepática. A ALT é encontrada abundantemente no citoplasma dos hepatócitos e sua atividade no fígado é cerca de 3.000 vezes maior do que no soro. Portanto, em caso de injúria hepatocelular, a liberação da ALT das células hepáticas danificadas aumenta a atividade de ALT no soro. A elevação dos níveis de ALT está presente em 60% dos pacientes com hepatite C crônica, sendo um fator indicativo de continuidade da infecção e lesão hepática

Embora a doença hepática seja geralmente monitorada por dosagens repetidas das aminotransferases, o dano hepático é somente revelado verdadeiramente através da avaliação histológica em uma biópsia hepática. A biópsia hepática é considerada o método padrão ouro de diagnóstico da hepatite C crônica, e o meio mais direto de visualizar a necroinflamação e o estado da arquitetura hepática. O padrão básico para o diagnóstico histológico de hepatite crônica é a presença de infiltrado portal, predominantemente linfocitário, geralmente com número variável de plasmócitos e histiócitos. Esta inflamação está acompanhada por grau variável de atividade periportal (também chamada de atividade de interface ou necrose em saca-bocados), atividade parenquimatosa (lobular) e fibrose (Mello, Alves, 2008).

Os valores das enzimas hepáticas e os achados histopatológicos algumas vezes divergem entre si. Alguns estudos mostram que níveis

normais a levemente aumentados de alanina aminotransferase (ALT) estão relacionados à doença mais leve, e, portanto menor grau de fibrose (Mathurin et al., 1998; Pêrsico et al., 2000; Ghany et al., 2003). No entanto, níveis elevados de ALT são encontrados em pacientes com lesões hepáticas mínimas à biópsia hepática (Pradat et al., 2002). Da mesma forma, apesar de a gravidade da injúria hepática ser significativa em pacientes com ALT elevada, alguns indivíduos com níveis normais de ALT também podem apresentar hepatite crônica e cirrose (De Santana et al., 2005).

Da mesma forma como a ALT, a GGT se encontra elevada em muitos pacientes com infecção crônica pelo HCV (Giannini et al., 2001). Alguns trabalhos associam níveis altos desta enzima com graus mais intensos de inflamação e desarranjo do arcabouço da estrutura hepática, sugerindo a importância da GGT como marcador indireto de gravidade histológica (Silva et al., 1999).

1.5 Imunopatogenia da infecção pelo HCV

O exato mecanismo pelo qual o HCV estabelece, mantém sua persistência e dá início à seqüência de eventos que levam à doença hepática crônica ainda não foi bem esclarecido. A maioria dos trabalhos publicados sobre patofisiologia do HCV teve como objetivo identificar fatores associados com o clearance viral e/ou a progressão para a cronicidade.

Diferentes componentes da resposta imune do hospedeiro estão envolvidas no desfecho da infecção pelo HCV. Fortes interações entre o

HCV com a imunidade inata têm sido demonstradas em vários estudos. Em modelos utilizando chimpanzés, o HCV induziu significativamente a produção de interferon tipo 1, que pode restringir a excessiva replicação viral na fase inicial da infecção, mas não tem um papel importante no clareamento viral (Thimme et al., 2002 ; Su et al., 2002). Outros componentes da imunidade inata, como as células *natural killers* (NK), que servem para conter a infecção viral enquanto a resposta imune adaptativa produz células T citotóxicas antígeno-específicas, têm suas funções inibidas pelas proteínas do HCV. A proteína E2 do HCV, por exemplo, prejudica as funções efectoras das células NK ao interagir com o CD81 na superfície celular (Crotta et al., 2002). Baseado nessas evidências fica claro que os mecanismos da imunidade inata não contribuem de forma eficiente para o controle da viremia.

Com relação à imunidade humoral, apesar de a infecção pelo HCV resultar na produção de anticorpos contra várias proteínas virais em quase todos os pacientes imunocompetentes, o papel dos anticorpos neutralizantes na resolução ou prevenção da infecção pelo HCV, entretanto, ainda é pouco conhecida. Além disso, em alguns casos, a resposta imune humoral não está relacionada com um desfecho favorável (Chen et al., 1999).

Há uma forte evidência, entretanto, para um importante papel das células T CD4⁺ e CD8⁺ específicas no controle viral. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) e as células T auxiliaadoras CD4⁺ têm papéis efetores e regulatórios, respectivamente, na imunidade antiviral. Assim como as células da imunidade inata, estas células participam da patogênese viral diretamente

(através da morte de células infectadas) ou indiretamente (através da produção de fatores solúveis, como as citocinas e quimiocinas) que contribuem para o processo inflamatório e/ou inibição da replicação viral (Guidotti, Chisari, 2001).

Estudos recentes demonstraram claramente, tanto em chimpanzés como em humanos com infecção aguda pelo HCV, que o *clearance* viral espontâneo depende de uma resposta contra o HCV precoce e vigorosa, tanto por linfócitos T CD4⁺ Th1 como por linfócitos T CD8 citotóxicos (Cooper et al., 1999; Gerlach et al., 1999; Gruner et al., 2000; Lechner et al., 2000).

Uma resposta TCD4⁺ e TCD8⁺ antiviral específica, com um padrão Th1 de produção de citocinas é detectada no sangue de pacientes com infecção autolimitada. Essas respostas são maiores do que aquelas encontradas em pacientes com infecção crônica. Baseado nessas observações tem sido proposto que a habilidade de montar uma resposta imune celular eficiente é o principal mecanismo responsável pelo controle do HCV, a passo que um defeito nessa resposta leva a cronicidade (Koziel et al., 2005). Bertoletti e Ferrari (2003) verificaram que o fenótipo e a função de células T CD8⁺ estavam prejudicados em pacientes que desenvolveram infecção crônica pelo HCV.

Uma vez que a infecção pelo HCV evolui para a cronicidade, a resposta vigorosa de células T, que antes estava associada com o *clearance* viral, passa agora a ser o grande responsável pelo dano hepático observado nos pacientes infectados pelo HCV.

Diversas linhas de evidência sugerem que a resposta CTL tem um papel crucial na patogênese da doença hepática durante a infecção pelo HCV. Primeiro, o início da injúria hepática coincide com a entrada das células T CD8⁺ específicas no fígado de chimpanzés infectados pelo HCV e a depleção dessas células (mas não das células T CD4⁺) no pico da viremia retarda o aparecimento de evidências bioquímicas, histológicas e clínicas da hepatite (Shoukry et al., 2004; Thimme et al., 2002). Segundo, a forte associação entre a magnitude da resposta CTL vírus-específica e a severidade da doença hepática tem sido demonstrada não somente em chimpanzés, mas também em pacientes infectados com o HCV (Shoukry et al., 2004). Em conjunto, esses resultados indicam que a resposta CTL é necessária para induzir a doença hepática que está associada com a hepatite viral.

Alguns modelos murinos de expressão do HCV também sugerem um papel patogênico dos CTLs específicos na injúria hepática (Takaku et al., 2003; Kawamura et al., 1997; Wakita et al., 2000). Animais que expressam antígenos do HCV através de um promotor induzido desenvolvem inflamação no fígado e ao contrário, aqueles animais que são constitutivamente tolerantes às proteínas do HCV não desenvolveram inflamação (Kawamura et al., 1997; Wakita et al., 2000; Pasquinelli et al., 1997). Além disso, outro estudo mostrou que a transferência de CTLs HCV-específicos para animais transgênicos que expressavam proteínas do HCV levou ao desenvolvimento de injúria hepática, suportando assim, a hipótese do papel patogênico das CTLs (Takaku et al., 2003).

1.6 História natural da infecção pelo HCV

A infecção aguda pelo HCV cursa de maneira assintomática em 70%-80% dos casos e raramente apresenta-se de forma fulminante (Afdhal, 2004). Cerca de 20% a 50% dos pacientes adultos, imunocompetentes, têm a capacidade de eliminar o vírus, levando à cura. O restante desenvolve infecção crônica persistente sem eliminar o vírus.

A fibrose é a principal complicação da hepatite C crônica e estima-se que 20% dos pacientes evoluem para cirrose num período que pode variar de 10, 20 (Poynard et al., 1997) ou 30 anos (NIH, 1999). A progressão da fibrose eleva a morbidade e mortalidade da hepatite C crônica, podendo evoluir para óbito em decorrência das complicações de cirrose ou hepatocarcinoma (NIH, 2002).

Alguns fatores parecem ser determinantes na evolução mais rápida da doença, com progressão mais rápida da fibrose. Os fatores relacionados ao hospedeiro parecem ter maior importância na progressão da fibrose do que os fatores virais, tendo em vista que não há relação fortemente estabelecida entre a carga viral ou o genótipo do HCV com a progressão da fibrose. O papel dos genótipos do HCV na progressão da doença hepática é uma das áreas mais controversas (Zein, 2000). Acredita-se que a heterogeneidade genética do HCV possa contribuir para algumas das diferenças no curso da doença e na resposta ao tratamento observado em pacientes infectado pelo HCV (Zein, 2000). Estudos sugerem que determinados genótipos, como o 1, podem ser mais citopáticos (Dusheiko et

al., 1994) ou induzir a maior progressão da doença que outros (Kobayashi et al., 1996), além deste genótipo ter maior associação com a cronificação do HCV (Amoroso et al., 1998). No Brasil, o genótipo 1b está associado com doença histológica mais grave e maior risco de carcinoma hepatocelular (Campioto et al., 2005).

Um estudo conduzido por Poynard (1997) buscou determinar os principais fatores associados à progressão da fibrose. Os fatores identificados com uma progressão mais rápida da fibrose incluíram a idade no momento da infecção, duração da infecção, consumo de álcool e sexo masculino.

Além desses fatores, a co-infecção com outros vírus como HIV, HBV e HTLV parece acelerar a progressão da doença hepática (Poynard et al., 1997; Kishiara et al., 2001). Isso se deve provavelmente ao fato de o estado imunológico do hospedeiro ser relevante na evolução da hepatite C.

1.7 Infecção pelo vírus linfotrópico tipo 1 (HTLV-1)

O vírus linfotrópico humano tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descoberto, em 1980 (Poiesz et al., 1980). O vírus é endêmico em muitas regiões tropicais, particularmente na Melanésia, oeste da África, América do Sul e Central, sul do Japão e Iran. Estima-se que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas com o HTLV-1 em todo o mundo (Edlich et al., 2000).

No Brasil, estimativas baseadas nas prevalências estabelecidas em inquéritos soroepidemiológicos com candidatos a doadores de sangue, conduzidos em diferentes regiões do país, apontam para a existência de aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1 (Carneiro-Proietti et al., 2002). O Brasil tem sido apontado como o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 no mundo, e demonstra uma distribuição heterogênea dependendo da etnia do indivíduo e de sua localização geográfica (Catalan-Soares et al., 2005; Proietti, 2005). No estado de São Paulo encontramos uma prevalência de 0,32% infecção pelo HTLV-1 em doadores de sangue (Catalan-Soares et al., 2005).

Embora a maioria das pessoas permaneça assintomática, o vírus está associado com o desenvolvimento de doenças severas, como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e uma doença inflamatória do sistema nervoso central chamada paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM) (Takatsuki, 2005; Gessain et al., 1985). A infecção pelo HTLV-1 também está associada com outras doenças, como a artropatia crônica, uveíte, dermatite infecciosa e polimiosite (Murphy et al., 1989; Blattner, 1990).

Diversos tipos de comportamentos e exposições têm sido associados à soropositividade para o HTLV-1: da mãe para o filho através da amamentação; via relação sexual e via transmissão parenteral através de transfusão de produtos sanguíneos celulares ou compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis (Manns et al., 1999).

Após a implantação da triagem sorológica para o HTLV-1 nos bancos de sangue, em 1993, o número de infecções pelo HTLV-1 através de transfusão de sangue diminuiu em toda a população (Taylor, 1996). No entanto, o compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis continua a ser um modo importante de transmissão do HTLV-1 e HTLV-2 (Feigal et al., 1991; Khabbaz et al., 1992). O HTLV-1 é freqüente entre os usuários de drogas injetáveis no Brasil e em Nova York, enquanto que o HTLV-2 é mais prevalente em usuários de drogas na América do Norte e Europa (Lee et al., 1990; Bassani et al., 2004; Proietti et al., 2005).

1.8 Estrutura e organização genômica do HTLV-1

O HTLV-1 é um vírus tipo C pertencente à família *Retroviridae* e classificado no gênero *Deltaretrovirus*. É um vírus esférico, envelopado, com aproximadamente 100 nm de diâmetro (Ohtsuki et al., 1982). Seu genoma consiste em uma fita simples de RNA de polaridade positiva. Durante o ciclo de vida do vírus, esta fita simples de RNA é convertida em dupla fita de DNA, que é inserida no DNA da célula hospedeira. Essa forma inserida de um retrovírus é referida como pró-vírus (Gallo, 2005).

O genoma pró-viral do HTLV-1 codifica os genes *gag*, *pol* e *env*, que são característicos de todos os retrovírus. O gene *pol* codifica a transcriptase reversa e também as proteínas RNase, endonuclease e protease. O gene *env* codifica a glicoproteína externa do envelope (a

precursora gp61/68 e sua derivada gp46) e a proteína transmembrana (gp21).

O genoma do HTLV-1 é flanqueado por regiões não codificantes conhecidas como “long terminal repeats” (LTR). As LTRs medeiam a integração pró-viral e contém elementos regulatórios importantes para a transcrição viral, processamento do RNA mensageiro e transcrição reversa.

Adicionalmente, há uma única região na extremidade 3' do genoma, chamada de pX, que contém quatro pequenas regiões abertas de leitura (ORF), que codificam um pequeno número de proteínas regulatórias e acessórias (Ferreira et al., 1997). A região px- IV codifica a proteína p40^{tax}, que é transativadora do segmento LTR do genoma viral e de genes da célula eucariótica infectada, como os que codificam a interleucina 2 e da cadeia α de seu próprio receptor (CD25), o fator de crescimento de granulócitos (GM-CSF), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e outros. Além disso, tem uma ação inibidora sobre o gene da β -polimerase (enzima de reparação do DNA hospedeiro).

1.9 Imunopatogenia da infecção pelo HTLV-1

A maior parte das pessoas infectadas pelo HTLV-1 permanece assintomática por toda a vida. A probabilidade de uma pessoa desenvolver qualquer doença associada ao vírus depende de diversos fatores, incluindo idade e a via de transmissão (Maguer-Satta et al., 1995). Entre portadores do HTLV-1, o risco de desenvolvimento de TSP/HAM varia de 0,3% a 4%

(Kaplan et al., 1990), enquanto que para o desenvolvimento de ATL, o risco ao longo do tempo chega próximo a 10% (Murphy et al., 1989).

A TSP/HAM é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma mielopatia crônica, de evolução lentamente progressiva, com desenvolvimento de paraparesia espástica, preferencialmente em membros inferiores. Diversos estudos sugerem que a resposta imune específica ao HTLV-1 tem um papel importante na patogênese da TSP/HAM (Jeffery et al., 1999).

A infecção pelo HTLV-1 tem sido associada com a diminuição da função imune. A demonstração de pacientes com ATL que freqüentemente desenvolvem infecção oportunista por agentes como *Pneumocystis carinii* mesmo antes de receberem terapia imunossupressiva (Bunn et al., 1983), além de pessoas com infecção assintomática que demonstram um aumento na incidência de doenças infecciosas (Essex et al., 1984), são alguns dos primeiros trabalhos que evidenciaram esse efeito imunossupressivo da infecção pelo HTLV-1.

Um trabalho utilizando clones de células T humanas normais infectadas com o HTLV-1 demonstrou haver diminuição ou perda da função citotóxica dessas células. Esses resultados sugerem alguns possíveis mecanismos de indução de imunodeficiência pelo HTLV-1 (Popovic et al., 1984).

Como sabemos, o teste de Mantoux representa uma clássica resposta de hipersensibilidade tardia à injeção de tuberculina (PPD – Purified Protein Derivated). Esse teste representa a resposta imune de células T de

memória. Tipicamente é utilizado para determinar a imunidade à tuberculose em humanos, sendo que reações positivas desenvolvem-se em indivíduos previamente expostos ao *Mycobacterium tuberculosis* e naqueles imunizados com a vacina BCG. No entanto, esse teste pode também ser utilizado na investigação da resposta imune como um todo (Vukmanovic-Stejić et al., 2006).

Baseado nisso, encontramos alguns trabalhos que descrevem uma redução na reatividade ao teste de PPD entre os indivíduos HTLV-1 positivos, sintomáticos ou não. Tachibana et al (1988) e Murai et al (1990) demonstraram haver supressão ao teste cutâneo PPD em indivíduos HTLV-1 positivos assintomáticos. Os autores sugerem que haja uma imunossupressão subclínica nesses pacientes, que adicionalmente aumenta com a idade. Outros autores também observaram essa diminuição da resposta ao PPD em indivíduos HTLV-1 positivos, sendo os homens mais suscetíveis à perda de reatividade ao PPD do que as mulheres (Hisada et al., 1999). Em contrapartida, Welles et al (1994) em seu estudo, indicaram que a supressão da hipersensibilidade tardia em pacientes HTLV-1 positivos estava associada unicamente à infecção pelo vírus, sem haver correlação com a idade, gênero, consumo de álcool, tabagismo ou carga viral de HTLV-1.

De forma semelhante, alguns autores avaliaram a prevalência e a correlação entre a anergia ao teste de PPD e a soropositividade ao HIV. A anergia ao PPD foi mais prevalente entre os indivíduos HIV positivos, estando relacionado também com o número de linfócitos T CD4⁺ (Anastos

et al., 1999). Considerando que a infecção pelo HIV leva à imunossupressão em indivíduos infectados, podemos dizer que a diminuição da resposta ao teste de PPD está refletindo o estado imunológico desses pacientes. Sendo assim, podemos também supor que nas coortes de pacientes HTLV-1 positivos com diminuição de resposta ao PPD, a imunossupressão seria em parte semelhante à encontrada em pacientes HIV positivos.

1.10 Co-infecção HCV e HTLV-1

Um fator importante para a persistência da infecção pelo HCV e progressão para a hepatite crônica é a existência de co-infecções relacionadas com a hepatite C. A co-infecção entre o HCV e o HTLV-1 é freqüente em regiões endêmicas para ambas as infecções, provavelmente devido à similaridade nas vias de transmissão.

Devido ao papel da imunidade celular no desenvolvimento e progressão da doença hepática associada ao HCV, é razoável se esperar que a interação HTLV-1/HCV possa contribuir para mudanças na história natural da hepatite C.

Como já citado anteriormente, alguns estudos evidenciaram que o HTLV-1 produz dano na resposta imune celular em indivíduos infectados. Hisada e colaboradores analisaram 300 pacientes de uma coorte do Japão e demonstraram novamente que a anergia ao teste tuberculínico empregando o PPD (Purified Protein Derivated) foi significativamente maior entre os

pacientes infectados pelo HTLV-1, quando comparados aos soronegativos para essa infecção (OR=2,8). De forma interessante, nos indivíduos co-infectados com HCV e HTLV-1 a ocorrência de anergia ao PPD foi ainda maior (OR=5,2).

Boschi-Pinto et al (2000) analisaram os efeitos da infecção pelo HTLV-1 em uma população com níveis endêmicos de co-infecção com HCV e HTLV-1. Seus achados sugeriram que a co-infecção com o HTLV-1 interferia na infecção pelo HCV, levando a uma maior progressão da doença hepática e contribuindo para o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular.

Kishiara et al (2001) observaram que a prevalência de viremia plasmática de RNA do HCV foi significativamente mais elevada entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1, quando comparados com os pacientes infectados somente pelo HCV. Esses dados sugerem menor probabilidade de clareamento do HCV nos pacientes co-infectados. Também observaram uma menor frequência de resposta virológica sustentada à terapia com interferon em pacientes co-infectados. Neste estudo, no entanto, não se demonstrou associação entre a co-infecção com o HTLV-1 e a intensidade da viremia plasmática pelo HCV.

1.11 Justificativa

Os mecanismos responsáveis pela persistência da infecção pelo HCV não foram ainda totalmente elucidados. Além das quasispécies, a grande capacidade mutagênica do vírus propicia seu constante escape do sistema

imune. Além disso, a carga viral e o genótipo também podem influenciar na evolução para a forma crônica. A infecção crônica pelo HCV, além de evoluir lentamente, costuma ter um amplo espectro clínico, desde formas assintomáticas até a hepatite crônica, cirrose e hepatocarcinoma (Kenny-Walsh, 1999). A lise dos hepatócitos e conseqüente dano hepático ocorrem por ação indireta do vírus, através da ação de linfócitos T citotóxicos. A infecção pelo HTLV-1 produz uma diminuição funcional da resposta imune celular do hospedeiro. Em pessoas co-infectadas com o HCV, é possível que a infecção das células T pelo HTLV-1 interfira com a resposta T citotóxica contra os hepatócitos infectados pelo HCV. Alguns autores sugerem que uma fraca resposta T citotóxica em pacientes co-infectados pelo HCV e HTLV-1 pode ser responsável por uma resolução ineficaz da hepatite C, levando a um dano hepático persistente e, dessa forma, exacerbando a progressão da doença hepática. Em contrapartida, poderíamos supor que uma vez que os pacientes co-infectados têm uma resposta citotóxica diminuída, o dano hepático resultante de lise imunomediada poderia ser menor nesses pacientes. Pretende-se, portanto, verificar se a imunossupressão causada pelo HTLV-1 poderia interferir na doença hepática causada pelo HCV e de que forma ocorre essa interferência.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a influência da infecção pelo HTLV-1 em parâmetros laboratoriais de pacientes com hepatite C crônica.

Específicos

- Verificar a integridade da resposta imunológica através da quantificação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com infecção crônica pelo HCV, co-infectados ou não com o HTLV-1;
- Comparar os níveis plasmáticos de enzimas hepáticas e outras variáveis laboratoriais em pacientes com infecção crônica pelo HCV, co-infectados ou não com o HTLV-1;
- Comparar a ocorrência de cirrose hepática em pacientes com infecção crônica pelo HCV, co-infectados ou não com o HTLV-1.

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram selecionados pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1 e atendidos nos Ambulatórios de HTLV e Hepatologia do Instituto de Infectologia Emilio Ribas (IIER). Todos os pacientes selecionados tinham o diagnóstico de hepatite C crônica.

Os pacientes infectados com o HTLV-1 foram selecionados a partir de um banco de dados composto por pacientes atendidos no Ambulatório de HTLV, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Alguns desses pacientes participaram anteriormente de outro estudo do nosso grupo. Assim, quando disponíveis, foram utilizadas as amostras coletadas nesses estudos referentes ao período pré-tratamento de cada paciente.

Os pacientes infectados somente pelo HCV, que em nosso trabalho serviram como grupo controle, foram selecionados ao acaso durante suas avaliações médicas periódicas no Ambulatório de Hepatologia do IIER, no período de julho a novembro de 2007.

3.1.1 Critérios de inclusão

Todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram aos seguintes critérios de inclusão:

-
- Idade igual ou superior a 18 anos;
 - Diagnóstico de infecção crônica pelo HCV, definido como positividade na pesquisa de anticorpos contra o HCV por ELISA e RNA viral detectado no plasma por método qualitativo (PCR), durante pelo menos seis meses;

3.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam:

- Soropositividade ao vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- Soropositividade ao vírus da hepatite B (HBV), definida como presença dos marcadores sorológicos anti-Hbc e/ou Ag-Hbs;
- Outras hepatopatias não-infecciosas (hepatite auto-imune, hepatite por drogas, cirrose biliar primária, hemocromatose, entre outras);
- Realização de tratamento para hepatite C com interferon e/ou ribavirina.

3.2 Aspectos éticos

Os indivíduos selecionados e que atendiam aos critérios de inclusão receberam informações a respeito do teor do estudo. Em seguida, aqueles que concordaram em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, processo número 007/06 (Anexo B) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, processo número 26/2007 (Anexo A).

3.3 Coleta das amostras

Os pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento tiveram uma amostra de sangue coletada. Foram coletados 20 ml de sangue venoso periférico de cada indivíduo. Essas amostras foram subdivididas em duas alíquotas. A primeira, colhida em tubo Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA) contendo EDTA K3 (0,054 ml/tubo) foi utilizada para a realização da contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ por citometria de fluxo. A segunda, também coletada em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo EDTA K3 foi processada para separação do plasma e estocada em freezer à -70°C para realização de testes futuros de biologia molecular e imunoenzimáticos.

3.4 Revisão dos prontuários médicos

Foram analisados os prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME), do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Os seguintes dados foram obtidos dos prontuários:

3.4.1 Dados demográficos

Foram levantadas informações a respeito do perfil dos pacientes, como sexo, idade, tabagismo, e consumo de álcool. A variável “consumo de álcool” foi definida qualitativamente como referir ou não a ingestão, mesmo que esporádica, de bebida alcoólica durante os últimos cinco anos.

3.4.2 Fatores de risco para aquisição do HCV e HTLV-1

Foram analisados os dados referentes aos fatores de risco para a aquisição viral, como uso de drogas endovenosas, recepção de transfusão sanguínea, parceiro sexual usuário de drogas endovenosas, parceiro sexual portador de alguma infecção viral (HCV, HIV ou HTLV-1), entre outros.

3.4.3 Tempo de infecção

A duração da infecção não pôde ser determinada devido à falta dessas informações nos prontuários médicos na maioria dos casos. Muitos pacientes quando indagados pessoalmente também não souberam estabelecer um tempo aproximado entre, por exemplo, o início do uso de drogas injetáveis ou a recepção de transfusão de hemoderivados, e o momento atual.

Buscou-se avaliar, portanto, ao menos o tempo de diagnóstico de hepatite C crônica. O correto seria estabelecer como data o momento da

realização da biópsia hepática e o conseqüente estadiamento, principalmente do grau de fibrose. No entanto, alguns pacientes não realizaram biópsia hepática por diversos motivos, e por isso não dispunham desses dados em seus prontuários. Para tentar solucionar essa questão e ter uma data aproximada de diagnóstico, estabelece-se como data o momento em que no registro medico houve a detecção do RNA do HCV no plasma. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, através da técnica de RT-PCR, utilizando o Amplicor HCV Test (Roche Diagnostic Corporation, Branchburg, NY, USA).

3.4.4 Genótipo do HCV

Informação a respeito do genótipo do HCV foi extraída dos prontuários médicos dos pacientes. O ensaio de genotipagem do HCV, quando solicitado pelo médico responsável pelo acompanhamento do pacientes, foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. O genótipo do HCV foi determinado através da técnica de hibridização reversa (VERSANT™ HCV Genotype Assay – LIPA, Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA).

A determinação do genótipo, na prática médica, é importante para delinear a duração e o tipo de medicação a ser utilizada. Por esse motivo, os pacientes que não atendiam aos critérios para iniciarem o tratamento para hepatite C não dispunham desse resultado em seu prontuário médico.

3.4.5 Biópsia hepática

Os laudos de biópsia hepática dos pacientes foram revisados para identificar a presença de cirrose. A biópsia hepática é obrigatória para a indicação do tratamento, salvo nos casos clinicamente confirmados de cirrose hepática, de acordo com as normas do Ministério da Saúde. Dessa forma, os pacientes com critérios para iniciar o tratamento e que não tinham nenhuma contra-indicação clínica realizaram a biópsia no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). A análise histológica das biópsias hepáticas incluiu a análise do grau de atividade necroinflamatória e o estágio de fibrose, que foram estimadas utilizando um sistema de resultados semi-quantitativo, de acordo com a classificação METAVIR (Lefkowitz, 2007), que é descrita em detalhes no anexo E.

O diagnóstico de cirrose deu-se através da presença de fibrose grau 4, ultrassom abdominal ou evidências clínicas que indicavam cirrose.

3.4.6 Outros exames laboratoriais de rotina

Os exames laboratoriais de rotina de todos os pacientes foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, utilizando testes disponíveis comercialmente. Os resultados de interesse foram obtidos por meio de análise de prontuário dos pacientes, onde selecionou-se dois resultados de exames realizados em um período inferior a

um ano antes ou depois da realização da biópsia hepática. Para a análise posterior, calculou-se a média desses resultados.

Foram obtidos os resultados dos seguintes exames laboratoriais: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais, albumina, globulina, bilirrubina total, bilirrubina direta e indireta, alfa-fetoproteína, tempo de protombina e contagem de plaquetas.

A tabela com as variáveis selecionadas e seus respectivos valores de normalidade é apresentada no anexo D.

3.5 Métodos

3.5.1 Contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Para verificação da integridade imunológica dos pacientes incluídos no estudo, foi realizada a contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ periféricos, através da técnica de citometria de fluxo.

Para a quantificação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, 100 µL de sangue total, coletado em tubo contendo anticoagulante EDTA, foram incubados com 5 µL dos anticorpos monoclonais anti- CD3, anti-CD4 e anti-CD8 humanos, marcados com fluorocromo, por 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Após a incubação as amostras foram submetidas ao processo de lise e fixação por meio de reagente padrão Immunoprep no equipamento Multi-

Q-Prep (Beckman Coulter, Miami, Flórida, EUA). Posteriormente as células foram analisadas em uma janela de tamanho e granulosidade (FS x SS) na região dos linfócitos em citômetro de fluxo Coulter® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Os resultados foram emitidos em valores percentuais, enquanto que os valores absolutos das populações foram calculados indiretamente, multiplicando-se o valor percentual obtido pelo número total de linfócitos medido no contador de células *Cell Dyn*.

3.6 Análise estatística

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para uma ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento de banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados foi feita utilizando-se o software Excel (Microsoft, USA). Para a análise dos dados foram utilizados os programas Graph Pad Prism versão 4.0 (Graph Pad Software, USA) e o Epi Info 3.2.2 (Centers for Disease Control and Prevention, USA).

As variáveis qualitativas foram representadas por frequência absoluta e relativa (%) e as quantitativas por média, desvio padrão (DP), medianas, valores mínimos e máximos. Para comparar variáveis não paramétricas entre os grupos utilizou-se o teste Qui-quadrado (χ^2) ou, quando necessário (valores esperados menores do que cinco), o teste exato de Fisher. Utilizou-se o teste *t* de Student, para análise de variáveis paramétricas. Os dados deste trabalho foram analisados mediante um nível de significância adotado

de 5% ($\alpha = 0,05$), de acordo com o padrão geral comum na área médica e biológica. Desta forma, os valores calculados da probabilidade de erro (p) quando $\leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes e quando $> 0,05$ foram tomados como não significantes.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 População de estudo

Participaram deste estudo 40 pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica, sendo que 12 destes também estavam co-infectados com o HTLV-1, todos atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas. O estudo foi realizado no período de julho a novembro de 2007.

Os pacientes infectados com o HTLV-1 foram selecionados a partir de um banco de dados composto por pacientes atendidos no Ambulatório de HTLV, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Esses pacientes são encaminhados de hemocentros ou outros centros médicos no estado de São Paulo. No total, 621 pacientes foram cadastrados até setembro de 2008, sendo que 373 são infectados pelo HTLV-1, 109 pelo HTLV-2 e três com ambos os vírus. Em 136 pacientes o resultado da PCR confirmou a negatividade para o HTLV.

Entre os pacientes HTLV-1 positivos, 215 eram mulheres (57,6%) e 158 eram homens (42,4%); e a média de idade encontrada foi de 41,2 anos (DP = 12). Entre os pacientes HTLV-1 positivos, 84 (22,5%) apresentavam sintomas de mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM).

Um total de 59 pacientes co-infectados com o HCV e HTLV-1 foram identificados, o que revela uma prevalência de co-infecção de 15,8 % em

nossa coorte. Entre esses pacientes, 32 também estavam co-infectados com o HIV e foram por este motivo excluídos do estudo.

Dentre os 27 pacientes HCV positivos e co-infectados com o HTLV-1 elegíveis para o estudo, cinco foram excluídos por motivos diversos, como indisponibilidade para coleta de amostra de sangue, ausência de dados clínicos e/ou laboratoriais relevantes no prontuário médico ou realização de tratamento prévio para hepatite C. Portanto, somente 12 pacientes com HCV/HTLV-1 foram analisados.

Foram selecionados também 23 pacientes somente com infecção crônica pelo HCV provenientes do Ambulatório de Hepatologia, do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, e que não haviam realizado tratamento para hepatite C. Ressaltamos que em ambos os grupos foram recrutados apenas indivíduos que não apresentavam evidências de infecção atual ou pregressa pelo HIV ou HBV, uma vez que esses agentes poderiam causar um viés de confusão, devido a um possível dano hepatocelular ou imunodepressão.

4.2 Características demográficas e epidemiológicas

Para comparar o grupo de pacientes infectados somente pelo HCV com o grupo co-infectado pelo HCV/HTLV-1 avaliaram-se inicialmente as características demográficas e epidemiológicas. A média de idade encontrada entre os pacientes co-infectados foi de 44,9 anos (DP = 14,7) e de 50,4 anos (DP = 14,1) entre os infectados somente pelo HCV. Não se observou diferença estatisticamente significativa com relação à idade,

gênero, tabagismo e consumo de álcool entre os grupos, conforme observamos na tabela 1.

Tabela 1 – Características demográficas, fatores de risco para aquisição viral e tempo do diagnóstico de hepatite C dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		<i>p</i> ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Idade ²	44,9 ±14,7	50,4 ± 14,1	NS
Gênero			
Masculino	8 (66,7%)	10 (43,5%)	NS
Feminino	4 (33,3%)	13 (56,5%)	NS
Via de transmissão			
UDI	7 (58,4%)	4 (17,4%)	0.01
Transfusão	3 (25%)	10 (43,5%)	NS
Outra / Ignorada	2 (16,6%)	9 (39,1%)	NS
Consumo de álcool			
Sim	9 (75%)	16 (69,6%)	NS
Não	3 (25%)	7 (30,4%)	NS
Tabagismo			
Sim	8 (66,7%)	12 (52,2%)	NS
Não	4 (33,3%)	11 (47,8%)	NS
HCV, em anos ³	6,91 ± 4,2	6,0 ± 3,8	NS

NOTA: ¹Test t para média de idade e teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer para as outras variáveis (valor de p significativo <0,05); ²Média ± Desvio padrão; ³Tempo de diagnóstico de hepatite C, média ± Desvio padrão; NS – Não significativo.

O uso de drogas injetáveis foi considerado o principal fator de risco para aquisição viral no grupo de pacientes co-infectados. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa na proporção de pacientes que relataram o uso de drogas endovenosas; no grupo de pacientes co-infectados, 58,4% relataram tal prática, enquanto que no grupo infectado somente pelo HCV apenas 17,4% ($p=0,01$). O relato de recepção de transfusão sanguínea foi significativamente mais freqüente entre os pacientes infectados somente pelo HCV, porém essa diferença não foi significativa.

Entre os pacientes infectados somente pelo HCV, dois (8,7%) referiram terem sido vítimas de acidente com material biológico e um paciente (4,3%) referiu como único fator de risco a prática de relação bissexual sem o uso de preservativo. Em dois pacientes (16,6%) co-infectados e 9 pacientes (39,1%) infectados somente pelo HCV, o fator de risco para aquisição viral não pôde ser identificado.

Devido a ausência de dados nos prontuários médicos não foi possível estimar o tempo de infecção pelo HCV. No entanto, ao compararmos o tempo médio de diagnóstico, não houve diferença entre os grupos. O tempo de diagnóstico, em anos, foi em média 6,9 anos entre os pacientes co-infectados e 6,9 anos entre os infectados somente pelo HCV.

4.3 Características virológicas

O resultado de genotipagem do HCV estava disponível para análise em 50% dos pacientes co-infectados com o HTLV-1 (n=6) e em 60,8% (n=14) dos pacientes infectados somente pelo HCV. A frequência e distribuição dos genótipos do HCV são mostradas na tabela 2.

Tabela 2 - Genótipos do HCV dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		<i>p</i> ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Genótipo HCV ²			
Tipo 1	5 (41,6%)	14 (60,8%)	NS
Outro	1 (8,4%)	0 (0%)	NS
Não realizado	6 (50%)	9 (39,2%)	NS

NOTA: ¹ Teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer (valor de *p* significativo <0,05); ² Resultados disponíveis para 20 pacientes apenas.

Em ambos os grupos, o genótipo mais freqüente foi o 1, sendo responsável por 41,6 % das infecções nos pacientes co-infectados com o HTLV-1 e 60,8% nos pacientes infectados somente com o HCV. Apesar de observamos um número relativamente maior de pacientes infectados pelo genótipo 1 entre os pacientes infectados somente pelo HCV, essa diferença não mostrou-se significativa.

4.4 Características histológicas

Dos 35 pacientes incluídos no estudo, sete pacientes co-infectados com o HTLV-1 e 18 infectados somente pelo HCV foram submetidos à biópsia hepática e tinham seu laudo disponível para análise. Como nosso estudo não incluiu a realização da biópsia, nem a análise histopatológica nos pacientes incluídos, nós necessitávamos da disponibilidade do laudo histopatológico de biópsia solicitada pelo médico responsável pelo acompanhamento dos pacientes

Apesar de todos os pacientes com RNA do HCV detectável no plasma terem a indicação de realização da biópsia hepática, dez pacientes incluídos no estudo não haviam realizado. Três pacientes co-infectados com o HTLV-1 aguardavam para realizar a biópsia. Os outros dois pacientes tinham contra-indicações para tal procedimento. Entre os pacientes infectados somente pelo HCV, apenas um possuía contra-indicação para realização da biópsia; os outros apenas aguardavam para realizar.

A biópsia hepática foi realizada em média 21,96 meses (DP=1, 32) após o diagnóstico de hepatite C no grupo de pacientes co-infectados e 23,04 meses (DP = 1,5) no grupo de pacientes infectados somente pelo HCV.

A análise histológica revelou a presença de cirrose em apenas um paciente co-infectado com o HTLV-1 e dois pacientes infectados somente pelo HCV. Três pacientes infectados somente pelo HCV demonstraram

sinais clínicos e de ultrassonografia abdominal compatíveis com cirrose hepática. Esses dados são demonstrados na tabela 3.

Tabela 3 – Presença de cirrose entre os pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		<i>p</i> ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Presença de cirrose ²			
Sim	1 (8,4%)	5 (21,7%)	NS
Não	6 (50%)	13(56,5%)	NS
Não realizado	5 (41,6%)	5 (21,8%)	NS

NOTA: ¹ Teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer (valor de *p* significativo <0,05);² Resultados disponíveis para 25 pacientes apenas, NS – Não significativo

Podemos observar uma frequência cerca de três vezes maior de ocorrência de cirrose entre os pacientes infectados somente pelo HCV. No entanto, provavelmente devido ao restrito número de pacientes que dispunham de laudo histopatológico para análise, essa diferença não se mostrou significativa.

4.5 Contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

A tabela 4 mostra a análise e comparação dos valores absolutos de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 4 – Valores absolutos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		Valor de p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Linfócitos T CD4 ⁺			
Média	1.367	1.159	NS
DP	354,2	456,2	
Mediana	1.210	1.181	
Mínimo	878	408	
Máximo	2.203	2.051	
Linfócitos T CD8 ⁺			
Média	844,1	598	0, 0159
DP	216,8	276,1	
Mediana	865	629	
Mínimo	507	144	
Máximo	1.172	1.086	

NOTA: ¹ Teste t (valor de p significativo <0,05), NS – Não significativo

No que diz respeito à contagem de linfócitos T, não observamos diferença entre os grupos quanto à contagem de linfócitos T CD4⁺, estando a média dentro da normalidade. No entanto, observamos uma diferença estatisticamente significativa em relação aos valores absolutos de linfócitos T CD8⁺, sendo a mediana mais elevada entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1. Em ambos os grupos os valores também estavam dentro da normalidade estabelecida (valores de normalidade em anexo).

Figura 4. Valores absolutos de linfócitos T CD4⁺ dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 5. Valores absolutos de linfócitos T CD8⁺ dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

4.6 Enzimas hepáticas

Com o intuito de verificar a influência da infecção pelo HTLV-1 nos pacientes com hepatite C crônica, analisou-se, inicialmente, o número de pacientes com resultados de dosagem de enzimas hepáticas dentro da normalidade. Esses resultados são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 – Comparação da proporção de pacientes com resultados de enzimas hepáticas dentro da normalidade, dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		<i>p</i> ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Aspartato aminotransferase (AST)			
Normal	8 (66,7%)	4 (17,4%)	<u>0,005</u>
Elevada	4 (33,3%)	19 (82,6%)	
Alanina aminotransferase (ALT)			
Normal	7 (58,4%)	3 (13%)	<u>0,008</u>
Elevada	5 (41,6%)	20 (87%%)	
Gama glutamiltransferase (GGT)			
Normal	9 (75%)	9 (39,1%)	<u>0,04</u>
Elevada	3 (25%)	14 (60,9%")	
Fosfatase alcalina (FA)			
Normal	10 (83,4%)	18 (72,3%)	NS
Elevada	2 (16,6%)	4 (27,7%)	

Nota: ¹ Teste qui-quadrado ou teste exato de fischer (p significativo <0,05), NS – Não significativo

Ao comparar o número de pacientes que apresentavam valores de enzimas hepáticas dentro da normalidade observou-se que entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1 há uma porcentagem significativamente maior de pacientes com resultados das enzimas AST, ALT e GGT dentro da normalidade, quando comparados com os indivíduos infectados somente pelo HCV.

Ao compararmos a média dos níveis plasmáticos das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT, observaram-se valores acima da normalidade entre os pacientes infectados somente com o HCV. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada em relação a AST ($p = 0,0437$) e ALT ($p = 0,0159$). A média dos níveis de fosfatase alcalina encontrava-se dentro da normalidade em ambos os grupos de pacientes, não havendo diferença alguma entre eles.

Tabela 6 – Comparação da concentração plasmática de enzimas hepáticas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Aspartato aminotransferase (AST)			
Média	36,08	61,55	
DP	7,84	39,35	
Mediana	30	51	<u>0.0437</u>
Mínimo	18	20	
Máximo	76	175	

Continua

Tabela 6 (continuação) – Comparação da concentração plasmática de enzimas hepáticas dos pacientes com hepatite C crônica, co- infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Alanina aminotransferase (ALT)			
Média	47,08	84,3	<u>0,0159</u>
DP	31,84	47,12	
Mediana	42	72	
Mínimo	14	19	
Máximo	129	153	
Gama glutamiltransferase (GGT)			
Média	47,27	126,7	NS
DP	39,92	129,3	
Mediana	33	86,5	
Mínimo	16	21	
Máximo	149	466	
Fosfatase alcalina (FA)			
Média	91,63	85,93	NS
DP	37,9	37,6	
Mediana	84	72	
Mínimo	49	47	
Máximo	151	173	

Nota: ¹ Teste t -Student (p significativo <0,05, NS – Não significativo)

Figura 6 - Níveis plasmáticos de AST dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 7 – Níveis plasmáticos de ALT dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 8- Níveis plasmáticos de GGT dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 9- Níveis plasmáticos de FA dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

4.7 Bilirrubinas

Ao compararmos a média dos níveis plasmáticos de bilirrubinas não observamos diferenças estatisticamente significativas em nenhuma variável analisada. Em ambos os grupos os valores medianos estavam dentro da normalidade, conforme podemos observar na tabela 7.

Tabela 7 – Comparação dos níveis plasmáticos de bilirrubinas dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Bilirrubina total			
	1,06	0,79	
Média	1,4	0,41	
DP	0,59	0,65	NS
Mediana	0,38	0,3	
Mínimo	6,41	1,7	
Máximo			
Bilirrubina indireta			
	0,80	0,59	
Média	1,25	0,39	
DP	0,44	0,47	NS
Mediana	0,31	0,2	
Mínimo	5,68	1,5	
Máximo			

Continua

Tabela 7 (continuação) – Comparação dos níveis plasmáticos de bilirrubinas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectado ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Bilirrubina direta	0,25	0,19	NS
Média	0,21	0,16	
DP	0,17	0,16	
Mediana	0,01	0,1	
Mínimo	0,79	0,69	
Máximo			

Nota: ¹ Teste t -Student (p significativo <0,05), NS – Não significativo

Figura 10 – Níveis plasmáticos de bilirrubina total dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 11 – Níveis plasmáticos de bilirrubina indireta dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 12 – Níveis plasmáticos de bilirrubina direta dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

4.8 Proteínas totais e frações

Nos resultados laboratoriais de proteínas totais e frações, pudemos observar valores significativamente mais elevados de globulinas plasmáticas entre os indivíduos co-infectados ($p = 0,0139$), apesar de em ambos os grupos os valores medianos estarem acima da normalidade, conforme podemos observar na tabela 8.

Tabela 8 – Comparação dos níveis plasmáticos de proteínas totais, albumina e globulinas dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Proteínas totais			
Média	7,4	7,75	NS
DP	0,45	0,55	
Mediana	7,3	7,8	
Mínimo	6,8	6,6	
Máximo	8,4	8,9	
Albumina			
Média	4,13	4,09	NS
DP	0,52	0,39	
Mediana	4,3	4,15	
Mínimo	2,7	3,3	
Máximo	4,6	4,6	

Continua

Tabela 8 (continuação) – Comparação dos níveis plasmáticos de proteínas totais, albumina e globulinas dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		Valor de p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Globulinas			
Média	3,12	3,64	<u>0,0139</u>
DP	0,53	0,50	
Mediana	3,2	3,65	
Mínimo	2,0	2,6	
Máximo	4,2	4,5	

Nota: ¹ Teste t -Student (p significativo <0,05), NS – Não significativo

Figura 13 – Níveis plasmáticos de proteínas totais dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 14 – Níveis plasmáticos de albumina dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

Figura 15 – Níveis plasmáticos de globulinas dos pacientes com hepatite c crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

4.9 Alfa – fetoproteína

A média dos valores de alfa-fetoproteína encontrava-se dentro da normalidade e sem diferença entre os grupos analisados. Não foi identificado nenhum paciente com concentração plasmática elevada de alfa-fetoproteína.

Tabela 8 – Comparação dos níveis plasmáticos de alfa-fetoproteína dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Alfa-fetoproteína			
Média	7,4	7,75	NS
DP	0,45	0,55	
Mediana	7,3	7,8	
Mínimo	6,8	6,6	
Máximo	8,4	8,9	

Nota: ¹ Teste t -Student (p significativo <0,05), NS – Não significativo

4.10 Contagem de plaquetas

Em relação à contagem de plaquetas, nenhuma diferença foi observada entre os grupos, estando ambas as médias dentro da normalidade.

Tabela 9- Comparação da contagem de plaquetas dos pacientes com hepatite C crônica co-infectados ou não com o HTLV-1

VARIÁVEL	HTLV-1		Valor de p ¹
	Positivo (n=12)	Negativo (n=23)	
Plaquetas			
Média	218.200	217.400	NS
DP	45.350	98.930	
Mediana	211.500	211.500	
Mínimo	174.000	61.000	
Máximo	316.000	415.000	

Nota: ¹ Teste t -Student (p significativo <0,05), NS – Não significativo

Figura 17 - Contagem de plaquetas dos pacientes com hepatite C crônica, co-infectados ou não com o HTLV-1

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A co-infecção com o vírus da hepatite C e o HTLV-1 é um tema de grande interesse devido às possíveis interações patogênicas entre essas duas infecções. Assim como acontece com outros patógenos transmitidos por vias comuns, a infecção pelo HCV frequentemente é detectada em pacientes portadores do HTLV-1 e vice-versa. Até o momento existem poucos trabalhos publicados abordando os efeitos da co-infecção entre esses dois patógenos em nosso meio.

Atualmente considera-se que um fator importante na progressão da doença hepática é a existência de co-infecção com outros vírus, como o HIV e o HTLV-1. Existem alguns estudos sobre a co-infecção entre o HCV e o HIV, e em sua maioria demonstram que entre os indivíduos co-infectados o dano hepático é maior e a progressão da hepatite C é mais rápida, devido à imunossupressão desses indivíduos (Benhamou et al., 1999; Lesens et al., 1999; Ragni, Belle, 2001; Di Martino et al., 2001).

Analogamente, alguns trabalhos realizados em pacientes co-infectados com HCV e HTLV-1 demonstraram haver relação entre um maior dano hepático e a co-infecção com o HTLV-1, além de uma mais rápida progressão da doença hepática e risco aumentado para o desenvolvimento de hepatocarcinoma (Kishiara et al., 2001; Boschi-Pinto et al., 2000). No entanto, essa relação ainda não está bem estabelecida.

Com o objetivo de esclarecer a influência da infecção pelo HTLV-1 na hepatite C crônica, realizou-se este estudo no período de julho a novembro de 2007, com a população de pacientes atendidos nos Ambulatórios de HTLV e Hepatologia, do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Como alguns fatores do hospedeiro podem estar relacionados com a progressão da lesão hepática, inicialmente buscou-se avaliar o perfil dos pacientes. Não se observou diferença em relação à idade, sexo, consumo freqüente de álcool e tabagismo entre os grupos estudados. Esses fatores, considerados como potenciais para acelerar a progressão da lesão hepática e conseqüentemente causar maior dano hepático (Modi, Liang, 2008; Presione et al., 2001), não influenciaram os resultados aqui mostrados.

A análise do perfil dos pacientes também incluiu a análise dos fatores de risco relacionados à aquisição viral. Um número significativamente maior de pacientes que relataram o uso de drogas injetáveis foi observado no grupo co-infectado, sugerindo que tal exposição seja um fator de risco importante para aquisição do HTLV-1 em nossa coorte de pacientes. Deste modo, podemos supor que da mesma forma como ocorre nos pacientes infectados pelo HTLV-2, também a infecção pelo HTLV-1 pode estar associada ao uso de drogas e à co-infecção com o HCV (de la Fuente et al., 2006). Apesar não ter sido um dos objetivos de nosso estudo, observamos que em cerca de 30-40% dos pacientes não houve identificação dos fatores de risco envolvidos na transmissão, o que já havia sido relatado anteriormente (Van Damme et al., 1998).

Com o objetivo de avaliar a integridade imunológica dos pacientes, realizou-se a quantificação de linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ por citometria de fluxo. Não se observou nenhum prejuízo quantitativo da resposta imune, estando os resultados dentro da normalidade em ambos os grupos. A única diferença observada foi em relação à contagem de linfócitos T CD8⁺, que demonstrou valores maiores entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1, estando os valores, no entanto também dentro da normalidade. Diversos estudos têm demonstrado resultados semelhantes em pacientes infectados pelo HTLV-1. Eles relacionam o aumento do número de linfócitos T CD8⁺ periféricos com uma forte resposta CTL, que é principalmente direcionada à proteína Tax do HTLV (Ureta-Vidal, 2001).

O objetivo principal do estudo foi, no entanto, relacionar a presença da infecção pelo HTLV-1 com a alteração dos resultados laboratoriais de função hepática, que incluiu a dosagem das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA); dosagem das proteínas plasmáticas e suas frações; dosagem de bilirrubinas, dosagem de alfa-fetoproteína e contagem de plaquetas.

Ao compararmos os dois grupos, pudemos observar que os valores medianos encontrados para ALT e AST eram estatisticamente menores entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1. Além disso, pudemos notar que um número significativamente maior de pacientes co-infectados com o HTLV-1 apresentava resultados de enzimas hepáticas AST, ALT e GGT dentro da normalidade.

A utilidade da avaliação das aminotransferases no soro foi realçada em alguns estudos. Há muitas evidências de que pessoas com hepatite C e valores normais de aminotransferases têm grau menor de anormalidade histológica que aquelas com valores elevados (Marcellin et al., 1999; Puoti et al., 1995). O grau de aumento de ALT é interpretado como um indicador de dano hepático e serve como um critério para o início da terapia, bem como um meio de monitorar a resposta à terapia antiviral. Alguns autores têm também demonstrado uma correlação entre os valores de ALT e AST e o grau de dano hepático (Assy et al., 2000; Anderson et al., 2000; Zechini et al., 2004). Entretanto, não foi reportada ainda nenhuma relação entre os níveis de ALT e o grau de fibrose hepática.

A elevação de GGT é freqüentemente observada em pacientes com hepatite C crônica, sendo este um marcador útil para o diagnóstico e o monitoramento da infecção. Alguns autores associaram valores elevados de GGT com graus de atividade necroinflamatória mais intensos, sugerindo que a atividade de GGT está associada com a necrose dos hepatócitos. Além disso, os níveis de GGT também se associaram ao grau de fibrose hepática (Silva et al., 2004, Vasconcelos et al., 2006).

Nos pacientes analisados, os níveis medianos de fosfatase alcalina encontravam-se dentro da normalidade, não sendo encontrada diferença entre os grupos. Em humanos, a enzima fosfatase alcalina é encontrada no fígado, ossos, intestino, placenta e leucócitos (Sinko, 1990). Elevações dos níveis de fosfatase alcalina em pacientes com doença hepática ocorre quando há obstrução intra ou extra-hepática do fluxo de bile.

Com relação à concentração de bilirrubinas no soro, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados. Como se sabe, a bilirrubina é um pigmento resultante do catabolismo da hemoglobina após a destruição das hemácias. A dosagem dos níveis de bilirrubinas do plasma é importante para avaliação da função hepática. O aumento da bilirrubina direta é causado principalmente por deficiência na eliminação da bilirrubina pela bile. O aumento de ambas pode ser causado por doenças obstrutivas biliares ou por lesão mais intensa dos hepatócitos e insuficiência hepática (Boyer et al., 2008). Os dados encontrados neste trabalho nos indicam, ao analisarmos os níveis medianos de bilirrubinas, que em ambos os grupos, o grau de lesão e de comprometimento funcional hepático não era tão intenso.

Outras variáveis de grande importância clínica é determinação da taxa de proteínas totais no plasma e de suas frações albumina e globulina. A albumina é a proteína mais abundante no sangue, e apesar da complexidade de fatores que interferem em seu nível sangüíneo como, aporte de aminoácidos para sua síntese, perda, degradação, meia-vida longa e distribuição entre intra e extravascular (Rothschild et al., 1972), ela continua sendo importante parâmetro bioquímico para avaliação de índice prognóstico em várias doenças, principalmente as hepáticas. Um extenso dano hepatocelular pode diminuir o nível sérico de albumina, uma vez que sua síntese ocorre exclusivamente nos hepatócitos. Em nossos achados, não verificamos redução no nível sérico de albumina em nenhuma dos grupos estudados, além de não haver diferença significativa entre eles, nos

indicando novamente que a gravidade e o grau de comprometimento funcional hepático não era tão intenso.

Observamos uma elevação significativa no nível sérico de globulinas plasmáticas no grupo de pacientes infectados somente pelo HCV. No entanto, as globulinas constituem uma fração muito heterogênea das proteínas plasmáticas, sendo difícil tirar uma conclusão correta sem saber qual fração estaria aumentada nesse caso. Seria necessário para isso realizar a separação das frações protéicas através da técnica de eletroforese, o que nos permitiria obter mais dados. O padrão eletroforético de proteínas não é diagnóstico de qualquer doença, mas, associado a outros dados, pode fundamentar uma hipótese diagnóstica. Por exemplo, a observação de um aumento da fração gama-globulina demonstraria uma reação mesenquimatosa típica das doenças hepáticas crônicas, sendo também um índice de atividade. Além disso, níveis elevados de gamaglobulinas podem ser encontrados em pacientes com cirrose hepática.

A redução no número de plaquetas é comum em pacientes com hepatopatia crônica, muitas vezes refletindo grosseiramente o grau de hipertensão portal, que por sua vez é proporcional ao grau de fibrose hepática. Ao analisarmos a contagem de plaquetas, em ambos os grupos os valores medianos estavam dentro da normalidade estabelecida e não apresentavam diferenças significativas entre si.

Apesar de nosso objetivo não ser analisar os dados clínicos dos pacientes, pudemos observar que os pacientes co-infectados apresentavam-se melhor clinicamente do que os pacientes infectados somente pelo HCV.

Entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1 apenas um apresentava nível de bilirrubina total no plasma um pouco acima da normalidade, sem esse dado estar relacionado com a presença de cirrose. O paciente co-infectado que apresentava cirrose não demonstrava níveis elevados de bilirrubinas, nem nenhuma complicação clínica relacionada. No entanto, no grupo de pacientes infectados somente com o HCV, dois apresentavam níveis de bilirrubina total muito acima da normalidade (2,61 mg/dl e 6,41mg/dl) e plaquetopenia ($61.000/\text{mm}^3$ e $103.000/\text{mm}^3$), ambos com presença de cirrose e suas complicações, como varizes esofágicas, hipertensão portal, ascite, estando ambos aguardado para realização de transplante de fígado.

Em resumo, as únicas diferenças significativas encontradas entre os grupos de pacientes analisados foram em relação à concentração de enzimas hepáticas AST, ALT e GGT no plasma. Um número significativamente maior de pacientes apresentou valores dentro da normalidade. A análise histológica das biópsias hepáticas dos pacientes incluídos no estudo, apesar de limitada, demonstrou haver uma tendência para ocorrência de cirrose com menos frequência entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1, o que seria mais um indicativo de um menor dano hepático nesses pacientes.

Um fator importante que deve ser considerado quando analisamos os pacientes com hepatite C crônica co-infectados com o HTLV-1 são os efeitos dessa infecção no indivíduo. Diversos trabalhos sugerem que HTLV-1 causa uma supressão imune, especialmente da imunidade celular (Tachibana et

al., 1988; Murai et al., 1990, Welles et al., 1994, Hisada et al., 1999), e que essa imunossupressão pode ser ainda exacerbada em indivíduos co-infectados HTLV-1/HCV (Hisada et al., 1998).

Conforme diversos estudos sugeriram, o dano hepático está relacionado principalmente com mecanismos imuno-mediados, com a estimulação da resposta T citotóxica contra os hepatócitos infectados pelo HCV. Essa resposta levaria a lise dos hepatócitos e conseqüente liberação aumentada de enzimas hepáticas no plasma. Células T CD8⁺ ineficientes, no entanto, podem provocar apenas uma injúria hepática mais branda, que seria insuficiente para a erradicação do HCV (Prezzi et al., 2001). Por outro lado, uma resposta T citotóxica mais branda levaria a uma menor lesão hepatocelular, e conseqüentemente, menor concentração de enzimas hepáticas no plasma.

Baseado nessas evidências e em nossos achados podemos sugerir que a co-infecção com o HTLV-1 poderia reduzir o dano hepático agudo imunomediado aos hepatócitos infectados pelo HCV, diminuindo assim a liberação das enzimas hepáticas AST, ALT e GGT.

Resultados semelhantes aos nossos já foram observados anteriormente. Dados não publicados da Coorte de estudo de Miyazaki indicaram uma possível interação negativa entre o HTLV-1 e o HCV no que diz respeito aos níveis anormais de ALT, com a prevalência de níveis elevados de ALT sendo menor em indivíduos co-infectados do que em indivíduos somente infectados pelo HCV (Boschi-Pinto et al., 2000b). Outros pesquisadores no Japão reportaram um efeito similar da co-infecção nos

níveis de ALT (Kamihira et al., 1991). Esses autores, no entanto, sugerem que ao mesmo tempo em que a co-infecção levaria a uma injúria hepatocelular mais branda, isso aumentaria a persistência da infecção pelo HCV e subseqüentemente o risco do desenvolvimento de doença hepática ao longo do tempo. Boschi-Pinto et al., 2000 sugerem que a co-infecção com o HTLV-1 afeta o curso da infecção pelo HCV, ao encontrarem uma maior incidência de doença hepática e morte devido a doença hepática entre os pacientes co-infectados com o HTLV-1. No entanto, neste trabalho, o grau de lesão hepática não é analisado, nem o tempo de infecção por HCV. Além disso, um grande número de pacientes acima dos 65 anos de idade está presente no estudo. Também podemos supor que haja diferenças com relação a fatores genéticos, já que a população estudada é oriental, e de uma área endêmica para ambos os vírus.

Baseando-se em nossos resultados, podemos sugerir que haja uma forte evidência de que nos pacientes co-infectados com o HTLV-1 a doença hepática é menos grave. Além disso, enfatizamos a importância de todos os pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica serem triados sorologicamente para a presença de infecção pelo HTLV-1. Os resultados aqui apresentados, no entanto, necessitam ser analisados com maior cuidado, principalmente devido ao pequeno número de laudos histopatológicos disponíveis e ao tempo estimado de infecção ser desconhecido. Futuramente, a inclusão de um número maior de pacientes estudados e uma análise histológica mais aprofundada, poderá esclarecer alguns pontos e confirmar os resultados aqui encontrados.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- Não se observou diferença significativa com relação ao perfil dos pacientes, no que diz respeito à idade, sexo, tabagismo e consumo de álcool nos pacientes com co-infectados HCV/HTLV-1;
- Um número significativamente maior de pacientes co-infectados relataram o uso de drogas injetáveis, indicando que esse seja talvez um fator importante para aquisição do HTLV-1 em nossa coorte;
- O número de linfócitos T CD8⁺ foi maior entre os pacientes co-infectados, o que sugere uma ação ativação celular causada pelo HTLV-1.
- A concentração plasmática mediana de AST e ALT foi menor e um número significativo maior de pacientes co-infectados com o HTLV-1 apresentou valores normais de enzimas hepáticas AST, ALT e GGT, O que indica injúria hepatocelular era menor;

ANEXOS

ANEXO A

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS
DIVISÃO CIENTÍFICA

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 26/07

TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HCV EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM HIV-1 e HTLV-1"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO IIER: JORGE SIMÃO DO ROSÁRIO CASSEB

AUTORA PRINCIPAL: DANIELA FERNANDES CARDOSO

COLABORADORES: AUGUSTO CÉSAR PENALVA DE OLIVEIRA, JERUSA SMID, MARIANA CROTA, FENDANDO VIEIRA DE SOUZA.

COMISSÃO CIENTÍFICA

Parecer C.C. nº 108/07

A Comissão Científica, em reunião realizada em 03 de julho de 2007, **APROVA** o protocolo de pesquisa supra mencionado, após resposta aos quesitos do relator.

São Paulo, 05 de julho de 2007.

Assinatura manuscrita em tinta preta, com uma letra inicial 'L' grande e decorativa.

Prof. Dra. Luiza Helena F. R. Carvalho
Presidente da Comissão Científica

ANEXO B

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23.02.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 007/06, intitulado: "Avaliação da carga viral de HCV, HIV-1 e HTLV-1 em pacientes co-infectados na evolução da hepatite C e no aparecimento de manifestações dermatológicas." apresentado pelo Departamento de DERMATOLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

Pesquisador(a) Executante: Sra. Daniela Fernandes Cardoso

CAPPesq, 23 de Fevereiro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PROTOCOLO Nº

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

- 1. NOME DO PACIENTE:**
DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
- 2. RESPONSÁVEL LEGAL :**
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
-

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

**AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HCV EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM HIV-1
E HTLV-I.**

1. PESQUISADOR: JORGE CASSEB
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL:** 67217
UNIDADE DO ESTUDO: Ambulatório de HTLV, IIER.

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	☐	RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO
	☐			
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. OBJETIVOS DESTA PESQUISA:

O Laboratório de Investigação Médica nº 56 da Faculdade de Medicina da USP, junto com o *Instituto de Infectologia Emílio Ribas*, está desenvolvendo uma pesquisa para melhor compreender a evolução da hepatite C em pacientes também infectados com os vírus HTLV-I e/ou HIV-1. Os vírus HTLV e HIV são transmitidos da mesma forma que o vírus da hepatite C, principalmente através de sangue e relações sexuais, por isso é comum encontrarmos os pacientes infectados com os dois ou até com os três vírus. Já sabemos que cerca de 85% dos casos de hepatite C se tornam crônicas, ou seja, mesmo após o tratamento adequado o vírus não é eliminado do organismo e permanece no fígado por vários anos, o que pode causar danos e levar o paciente à cirrose ou até falência hepática. Um fato importante que deve ser levado em consideração é que pode haver uma evolução mais rápida da hepatite C e os danos ao fígado serem maiores quando a pessoa estiver infectada também por outros vírus, como o HIV e o HTLV, porque a imunidade da pessoa é menor e isso prejudica a eliminação do vírus da hepatite C do corpo. Além disso, o tratamento com interferon nem sempre é eficaz nesses casos. Essa pesquisa que estamos realizando pretende tentar esclarecer se isso realmente acontece.

2. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para este estudo, e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico. Se você concordar em participar desta pesquisa, serão coletados **15 ml** de sangue (equivalente a um copinho de café) de seu braço. Como qualquer coleta de sangue, pode haver um desconforto local. As medidas habituais para com a coleta de sangue serão tomadas para que isto não aconteça. Sempre que possível esta coleta será junto com os exames de rotina, evitando assim uma coleta extra. A amostra de sangue será levada para o nosso laboratório, onde serão feitas as análises para determinar a quantidade vírus da hepatite C em seu sangue.

Você não terá qualquer despesa por participar do estudo. Todos os procedimentos e os testes que são necessários para o estudo serão pagos por nós.

3. BENEFÍCIOS DESTA PESQUISA:

Este estudo não prevê benefícios diretos a você, mas poderá ajudar no desenvolvimento de métodos para melhorar o tratamento de pacientes com hepatite C e co-infectados com outros vírus. Caso alguma informação obtida a partir dessa pesquisa possa ser útil ao paciente, faremos todo o possível para repassar essas informações para a equipe médica.

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

Você deverá participar do estudo por até dois anos, dependendo de quando entrar no mesmo. Se quiser interromper sua participação no estudo no momento que desejar, sem que haja qualquer prejuízo em seu atendimento médico.

5. CONFIDENCIALIDADE DAS INFORMAÇÕES:

Nós faremos tudo o que pudermos para proteger a sua privacidade. Além disso, seu nome ou quaisquer outros dados, que possam identificá-lo, não serão colocados em qualquer publicação ou comunicação sobre o estudo.

O seu prontuário médico poderá ser revisto pelo Comitê Ética em Pesquisas da nossa instituição, por profissionais médicos e pelos coordenadores do estudo, respeitando-se a legislação brasileira vigente.

Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

Apenas poderão ter acesso aos dados do seu prontuário pessoas que forem indicadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos coordenadores do estudo, e pela equipe do estudo. Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

6. O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER ALGUM DANO POR PARTICIPAR DO ESTUDO?

Os participantes deste estudo que vierem a sofrer danos previstos ou não no termo de consentimento, resultantes dos procedimentos do estudo, têm direito à assistência médica integral no serviço público.

Você não estará renunciando ou abrindo mão de qualquer direito legal de obter indenização por danos eventuais ao assinar este termo de consentimento.

7. CASO TENHA ALGUMA DÚVIDA EM RELAÇÃO A ESTA PESQUISA:

Para perguntas sobre este estudo ou sobre danos relacionados com a pesquisa, favor contatar:

Dr. Jorge Casseb –Pesquisador principal

Daniela Fernandes Cardoso – Autora principal

Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 500 / prédio IMT II / 3º andar. Cep: 05403-000.

Tel: (11) 3061-7499 / 7457; Fax: (11) 3081-7190.

IV - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Título do protocolo: **AVALIAÇÃO DA CARGA VIRAL DO HCV EM PACIENTES CO-INFECTADOS COM HIV-1 E HTLV-I.**

Eu, _____, li (ou ouvi a leitura sobre) as informações contidas neste termo de consentimento. Compreendo os possíveis riscos e benefícios do estudo e os outros tratamentos disponíveis para minha doença. Tive oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas satisfatórias para todas as minhas perguntas.

Tenho liberdade de me retirar do estudo a qualquer momento, por qualquer razão, sem que a minha decisão de desistir afete meus direitos a cuidados médicos futuros. Concordo em seguir as instruções do médico responsável pelo estudo, e eu comunicarei imediatamente a ele caso eu sinta qualquer sintoma inesperado ou incomum. Ao assinar este documento, não estou abrindo mão de meus direitos legais. Uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará em meu poder.

Meu consentimento em participar deste estudo é voluntário.

Nome do voluntário ou responsável legal (em letra de forma)

Assinatura

Data : ____/____/____
dia mês ano

Nome da pessoa que obteve o consentimento (em letra de forma)

Assinatura

____/____/____
dia mês ano

ANEXO D

EXAME	VALORES DE NORMALIDADE
Aspartato aminotransferase (U/L)	Até 46
Alanina aminotransferase (U/L)	Até 50
Gama glutamiltransferase (U/L)	11 – 50
Fosfatase alcalina (U/L)	Até 360
Bilirrubina total (mg/dl)	0,1 – 0,5
Bilirrubina direta (mg/dl)	0,3 – 1,3
Proteínas totais (g/dl)	6,7 – 8,7
Albumina (g/dl)	3,8 – 5,0
Gamaglobulina (g/dl)	0,7 – 1,6
Alfa – fetoproteína (ng/ml)	Até 8,5
Plaquetas (céls/mm ³)	150.000 – 450.000

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Afdhal NH. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis.* 2004; 24 (Suppl 2): 3-8.

Alberti A, Benvegnù L. Management of hepatitis C. *J Hepatol.* 2003; 38: Suppl 1: S104-18.

Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med.* 1992; 327: 1899-905.

Amoroso PM, Rapicetta M, Tosti ME, et al. Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *J Hepatol.* 1998;28: 939-44.

Anastos K, Kalish LA, Palacio H, Benson CA, Delapenha R, Chirgwin K, et al. Prevalence of and risk factors for tuberculin positivity and skin test anergy in HIV-1 infected and uninfected at-risk women. Women's Interagency HIV Study (WIHS). *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21(2): 141-7.

Anderson FH, Zeng L, Rock NR, Yoshida EM. An assesment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2000; 18: 63-71.

Assy N, Minuk GY. Serum aspartate but not alanine aminotransferase levels help to predict the histological features of chronic hepatitis C viral infection in adults. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 1545-50.

Benhamou Y, Bochet M, Di Martino V, et al. Liver fibrosis progression in human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infected patients. *Hepatology.* 1999; 30: 1054-8.

Bassani S, Toro C, de la Fluente L, Brugal MT, Jimenez V, Soriano V. Rate of infection by blood-borne viruses in active heroin users in 3 Spanish cities. *Med Clin (Barc)*. 2004; 122:570-2.

Blattner WA. Epidemiology of HTLV-I and associated diseases. New York: Raven, 1990.

Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis*. 2000; 181: 35-41.

Botté C, Janot C. Epidemiology of HCV infection in the general population and blood transfusion. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 19-21.

Bunn PA, Schechter GP, Jaffe E, Blayney D, Young RC, Matthews W, et al. Clinical course of retrovirus-associated adult T-cell lymphoma in the United States. *N Engl J Med*. 1983; 309: 257-64.

Burton DR, Williamson RA, Parren PW. Antibody and virus: binding and neutralization. *Virology*. 2000; 270:1-3

Campiotto S, Pinho JR, Carrilho FJ, Da Silva LC, Souto FJ, Spinelli V, et al. Geographic distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 2005; 38: 41-9.

Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho AO, et al. Infection and disease caused by human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35:499-508.

Casseb J. Possible mechanism for positive interaction of HTLV-I on liver disease in an HCV-infected Japanese cohort. *J Infect Dis*. 2000; 181: 379.

Cha TA, Beall E, Irvine B, Kolberg J, Chien D, Kuo G, et al. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89: 7144-8.

Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattson L, Jin L, et al. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology*. 1999; 116: 135-43.

Choo QL, Kuo LG, Weiner LR, Overby D, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*. 1989; 244: 359-62.

Choo QL, Richman H, Han JH, Berger K, Lee C, Dong C, et al. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad USA*. 1991; 88(6): 2451-5.

Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, et al. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity*. 1999; 10: 439-49.

Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C envelope protein. *J Exp Med*. 2002; 195: 35-42.

De Araújo ES, Mendonça JS, Barone AA, Gonçalves FL Jr, Ferreira MS, Focaccia R, Pawlotsky JM. Consensus of the Brazilian Society of Infectious Diseases on the Management and Treatment of Hepatitis C. *Braz J Infect Dis*. 2007; 11(5): 446-50.

De la Fuente L, Toro C, Soriano V, Brugal MT, Vallejo F, Barrio G, et al. HTLV infection among young injection and non-injection heroin users in Spain: prevalence and correlates. *J Clin Virol*. 2006; 35: 244-9.

De Santana NP, Freitas LAR, Lyra AC, Paraná R, Santana G, Trepo C, Lyra LGC. Liver histological alterations in patients with chronic hepatitis C and normal ALT levels in the city of Salvador, Northeast-Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2005; 9(2): 134-41.

Di Martino V, Rufat P, Boyer N, Renard P, Degos F, Martinot-Peignoux M, et al. The influence of human immunodeficiency virus coinfection on chronic hepatitis C in injection drug users. *Hepatology*. 2001; 33: 1193-9.

De Thé G, Bonford R. An HTLV-I vaccine: Why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993; 9: 381-6.

Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Simmonds P, et al. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of typo-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*. 1994; 19: 13-8.

Edlich RF, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I). *J Emerg Med*. 2000; 18: 109-19.

Essex ME, McLane MF, Tachibana N, Francis DP, Lee TH. Seroepidemiology of human T-cell leukemia virus in relation to immunosuppression and the acquired immunodeficiency syndrome. In Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus. Gallo RC, Essex ME, Gross L, editors. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1984.

European Association for the Study of the Liver. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Paris, 26-28 February 1999. Consensus Statement. *J Hepatol* 1999; 30(5): 956-61.

Feigal E, Murphy E, Vranizan K, Bacchetti P, Chaisson R, Drummond JE, Blattner WA. Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *J Infect Dis*. 1991; 164:36-42.

Ferreira Jr OC, Planelles V, Rosenblatt JD. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Rev*. 1997; 11: 91-104.

Ferreira-Gonzalez A, Shiffman ML. Use of diagnostic testing for managing hepatitis C virus infection. *Semin Liver Dis*. 2004; 24(suppl 2): 9-18.

Foccacia R, Da Conceição OJ, Sette H Jr, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, et al. Estimated prevalence of viral hepatitis on the general population of the municipality of São Paulo, measured by plasmatic marker through samples collected from stratified, randomized and residence-based population survey. *Braz J Infec Dis*. 1998; 2: 269-84.

Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*. 2000; 355: 887-91.

Gallo RC. The Discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2005; 2: 17.

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener RH, Jung MC, Ulsenheimer A, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology*. 2003; 125: 80-8.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985; 2: 407-10.

Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, Zachoval R, et al. Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus specific CD4 (+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. 1999; 117: 933-41.

Ghany JM, Kleiner DE, Alter H, Doo E, Khokar F, Promrat K, et al. Progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2003; 124: 97-104.

Giannini E, Botta F, Fasoli A, Romagnoli P, Mastracci L, Ceppa P, et al. Increased level of gamma GT suggests the presence of bile duct lesions in patients with chronic hepatitis C: absence of influence of HCV genotype, HCV-RNA serum levels, and HGV infection on this histological damage. *Dig Dis Sci*. 2001; 46: 524-9.

Gruener NH, Gerlach TJ, Jung MC, Diepolder HM, Schirren CA, Schraut WW, et al. Association of hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis*. 2000; 181:1528-36.

Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19: 65-91.

Haber MM, West AB, Haber AD, Reuben A. Relationship of aminotransferases to liver histological status in chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1995; 90: 1250-7.

Hisada M, Shima T, Okayama A, Mueller M, Tsubouchi H, Stuver S. Suppression of skin reactivity to purified protein derived by hepatitis C virus among HTLV-I carriers in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology*. 1998; 19: 421-5.

Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of diseases. In: Consensus development conference on management of hepatitis C. Bethesda; 1997: 19-22 [Program and abstracts].

Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, Charlotte F, Benhamou Y, Poynard T, MULTIVIRIC Group. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet*. 2001; 357: 1069-75.

Imberti I, Dimitrova M, Wolf M, Schuster C. Réplication du virus de l'hépatite C: systèmes d'étude, avantages et limites. *Virologie*. 2004; 8: 281-95.

Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 3848-53.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, et al. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990; 3: 1096-101.

Kawai Y, Yamauchi A, Nakamura H, et al. Hepatocyte growth inhibitory factor derived from HTLV-1 T-cell line is identical to IL6. *Leuk Res*. 1999; 23: 489-97.

Kawamura T, Furusaka A, Koziel MJ, Chung RT, Wang TC, Schimdt EV, Liang TJ. Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology*. 1997; 25: 1014-21.

Khabbaz RF, Onorato IM, Cannon RO, Hartley TM, Roberts B, Hosein B, et al. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. *N Engl J Med*. 1992; 326:375-80.

Kishiara Y, et al. Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1114-9.

Kobayashi M et al. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology.* 1996; 23(4): 695-9.

Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepatol.* 1997; 4(suppl 2): 31-41.

Koziel MJ. Cellular immune response against hepatitis C virus. *Clin Infect Dis.* 2005; 41: S25-31.

Lamden KH, Kennedy N, Beeching NJ, Lowe D, Morrison CL, Mallinson CL, et al. Hepatitis B and hepatitis C virus infections: risk factors among drug users in Northwest England. *J Infect.* 1998; 37(3): 260-9.

Lechner F, Wong DK, Dunbar PR et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med.* 2000; 91: 499-512.

Lee HH, Weiss SH, Brown LS et al. Patterns of HIV-1 and HTLV-1/2 in intravenous drug abusers from middle atlantic and central regions of the USA. *J Infect Dis.* 1990; 162:347-52.

Lekfowitch JH, Apfelbaum TF. Non-A, non-B hepatitis: Characterization of liver biopsy pathology. *Clin Gastroenterol.* 1989; 11: 225-32.

Lefkowitz JH. Liver biopsy assessment in chronic hepatitis. *Arch Med Res.* 2007; 38:634-43.

Lemon, S.M.; Brown, E.A. Hepatitis C virus. In: Mandell G, et al. (eds): Principles and practice of infectious disease, 4th ed. Churchill Livingstone, New York; 1997.

Lesens O, Deschenes M, Steben M, et al. Hepatitis C virus is related to progressive liver disease in human immunodeficiency virus – positive

hemophiliacs and should be treated as an opportunistic infection. *J Infect Dis* 1999; 179: 1254-8.

Maccormick SE, et al. Evaluation of liver histology, ALT elevation, and HCV RNA titer in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*. 1996; 91: 1516-22.

Macomish F, et al. Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol*. 1994 ;32 : 884-92.

Maguer-Satta V, Gazzolo L, Dodon MD. Human immature thymocytes as target cells of the leukemogenic activity of human T-cell leukemia virus type I. *Blood*. 1995; 86: 1444-52.

Management of hepatitis C: 2002. *NIH Consensus State Sci Statements* 2002. Jun 10-12; 19(3): 1-46.

Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. 1999; 353:1951-8.

Marcellin P, Martinot BSM, Boyer N, Lévy S. Treatment of hepatitis C patients with normal aminotransferases levels. *Clin Liver Dis*. 1999; 4: 843-53.

Mathurin P, Moussali J, Cadranel JF, Thibault V, Charlotte F, Dumouchel P, et al. Slow progression rate of fibrosis in hepatitis C virus patients with persistently normal alanine transaminases activity. *Hepatology*. 1998; 27: 868-72.

Martinot-Peignoux M, Marcellin P, Pouteau M, Castelnau C, Boyer N, Poliquim M, et al. Pretreatment serum hepatitis C virus RNA levels and hepatitis C genotype are the main and independent prognostic factors of sustained response to interferon alpha therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 1995; 22: 1050-6.

McGarvey MJ, et al. Structure and molecular virology. In: Zeckerman AJ, Toma HCv, editors. *Viral hepatitis*. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1998.

Modi AA, Liang TJ. Hepatitis C: a clinical review. *Oral Dis*. 2008; 14:10-14.

Monto A, Patel K, Bostrom A, Pianko S, Pockros P, McHutchinson JG, Wright TL. Risks of a range of alcohol intake on hepatitis C-related fibrosis. *Hepatology*. 2004; 39: 826-34

Morris K, Bharucha C. Completed hepatitis C lookback in Northern Ireland. *Transfus Med* .1997; 7: 269 - 75.

Muller NE, Blattner WA. Retroviruses: HTLV-I. In: Evans, E.S.; Kaslow, R. , editors. *Viral infections of humans: epidemiology and control*. New York: Plenum Medical Book Company; 1994.

Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofthers WS, Campbell M, et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer*.1989;43: 250-3.

Mutimer DJ, Harisson JF, O'Donnell KB, Shaw J, Martin BA, Atrah H, et al. Hepatitis C virus infection in the asymptomatic British blood donor. *J Viral Hepat* .1995; 2: 47-53.

Naoumov NV. Hepatitis C virus-specific CD4⁺ T cells: do they help or damage? *Gastroenteroogy*. 1999; 117: 1012-4.

Neumann-Haefelin C, Blum HE, Chisari FV, Thimme R. T-cell response in hepatitis C virus infection. *J Clin Virol*. 2005; 32: 75-85.

Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol*. 1997; 158: 1473-81.

Ohtsuki Y, Akagi T, Takahashi K, Miyishi I. Ultrastructural study on type C virus particles in human cord T-cell line established by co-cultivation with human T-cell leukemia cells. *Arch Virol*.1982; 73: 69-73.

Pasquinelli C, Shoenberger JM, Chung J, Chang KM, Guidotti LG, Selby M, et al. Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology*. 1997; 25: 719-27.

Pawlotsky JM, Tsakiris L, Roudot-Thoraval F, Pellet C, Stuyver L, Duval J, Dhumeaux D. Relationship between and sources of infection in patients with chronic hepatitis C. *J Infect Dis*. 1995; 171: 1607-10.

Pawlotsky JM. Pathophysiology of hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol*. 2004; 12: 96-102.

Persico M, Persico E, Suozzo R, Conte S, De Seta M, Coppola L, et al. Natural history of hepatitis C virus carrier with persistently normal aminotransferase levels. *Gastroenterology*. 2000; 118: 760-4.

Perz JF, et al. Estimated global prevalence of hepatitis C virus infection. 42nd Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of América; Boston, MA, USA.; Sep 30 - Oct 03, 2004.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C restrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77: 7415-19.

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: 825-32.

Pradat P, Alberti A, Poynard T, Esteban JI, Weiland O, Marcellin P, et al. Predictive value of ALT levels for histologic findings in chronic hepatitis C: A European Collaborative Study. *Hepatology*. 2002; 36: 973-7.

Pratti D, Capelli C, Silvani C, De Mattei C, Bosoni P, Pappalettera M, et al. The incidence and risk factors of community-acquired hepatitis C in a cohort of Italian blood donors. *Hepatology*. 1997; 25: 702-4.

Pressione F, Ramond M-J, Njapoum C, Duchatelle V, Degott C, Erlinger S, et al. Cigarette smoking and hepatic lesions in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2001; 34: 121-5.

Prezzi C, Casciaro MA, Francavilla V, et al. Virus-specific CD8(+) T cells with type 1 or type 2 cytokine profile are related to different disease activity in chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Immunol* 2001; 31: 894-906.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24:6058-68.

Puoti C, Magrini A, Stati T. Clinical, histological, and virological features of hepatitis C virus carrier with persistently normal or abnormal alanine transaminase levels. *Hepatology*. 1997; 26: 1393-8.

Ragni MV, Belle SH. Impact of human immunodeficiency virus on progression to end-stage liver disease in individuals with hemophilia and hepatitis C virus infection. *J Infect Dis*. 2001; 183: 1112-5.

Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Albumin synthesis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1972; 286:748-57.

Savino B, Crosignani A, Maisonneuve P, Rossi S, Silini E, Mondelli MU. Hepatitis C virus genotype 1b as a major risk factor associated with hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: a seventeen-year prospective cohort study. *Hepatology*. 2007; 46: 1350-6.

Scott JD, Gretch DR. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *JAMA*. 2007; 297: 724-32.

Seef FB. Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2002; 36 (5 Suppl 1): S35-46.

Simmonds A, Alberti A, Alter HJ, Bonino F, Bradley DW, Brechot C, et al. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994; 19(5): 1321-4.

Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J Gen Virol*. 2004; 85(Pt 11): 3173-88.

Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42: 962-73.

Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* .2005; 5:558-67.

Shoukry NH, Cawthon AG, Walker CM. Cell-mediated immunity and the outcome of hepatitis C virus infection. *Annu Rev Microbiol*. 2004; 58:391–424.

Strauss E. Hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001; 34: 69-82.

Su AI, Pezacki AP, Wodicka L, Brideau AD, Supekova L, Thimme R, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* .2002; 99: 15669-74.

Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, et al. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int J Cancer*.1988; 42: 829-31.

Takada N, Takase S, Takada A, Date T. Differences in the hepatitis C virus genotypes in different countries. *J Hepatol*. 1993; 17: 277-83.

Takaku S, Nakagawa Y, Shimizu M, Norose Y, Maruyama I, Wakita T, et al. Induction of hepatic injury by hepatitis C virus specific CD8 (+) murine cytotoxic lymphocytes in transgenic mice expressing the viral structural genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 301: 330-7.

Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Hattori T, Nishimura H, Tsuda H, Sanada I. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. *Cancer Res*. 1985; 45: 4644S-5S.

Takatsuki K, Yamaguchi K, Kawano F, Nishimura H, Seiki M, Yoshida M. Clinical aspects of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1985; 115: 89-97.

Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*.2005; 2: 16.

Taylor GP. The epidemiology of HTLV-I in Europe. *J Acq Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996; 13 (suppl 1), S8-S14.

Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence and disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 15661-8.

Tsai JF, Jeng JE, Ho MS, Chang WY, Lin ZY, Tsai JH. Independent and additive effect modification of hepatitis B and C virus infection on the development of chronic hepatitis. *J Hepatol*. 1996; 24: 271-6.

Ureta-Vidal A, Pique C, Garcia Z, Dehée A, Tortevoier P, Désiré N, et al. Human T-cell leukemia virus Type I (HTLV-I) infection induces greater expansions of CD8 T lymphocytes in persons with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis than in asymptomatic carriers. *J Infect Dis*. 2001; 183: 857-64.

Van Damme P, Vellinga A. Epidemiology of hepatitis B and C in Europe. *Acta Gastroenterol Belg*. 1998; 61: 175-82.

Vasconcelos RR, Tengan FM, Cavaleiro NP, Ibrahim K, Pereira H, Barone AA. Fatores associados às formas evolutivas graves da infecção crônica pelo vírus da hepatite C. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(5): 433-8.

Vukmanovic-Stejić M, Reed JR, Lacy KE, Rustin MH, Akbar NA. Mantoux Test as a model for a secondary immune responses in humans. *Immunol Lett*. 2006; 107(2): 93-101.

Wakita T, Katsumi A, Kato J, Taya C, Yohehawa H, Kanegae Y, et al. Possible role of cytotoxic T cells in acute liver injury in hepatitis C virus cDNA mice mediated by Cre/lox P system. *J Med Virol*. 2000; 28: 308-17.

Wang Y, Tao QM, Zhao HY, Tsuda F, Nakagawa R, Yamamoto K, et al. Hepatitis C virus RNA and antibodies among blood donors in Beijing. *J Hepatol*. 1994; 21: 634-40.

Wang, J.E. A study on the epidemiology of hepatitis C infection among blood donors in Singapore. *J Public Health Med*. 1995; 17: 387-91.

Wilber JC, Polio A. Serological and virological diagnostic tests for hepatitis C virus infection. *Semin Gastrointest Dis*. 1995; 6: 13-9.

World Health Organization: Hepatitis C – global prevalence (update). *Wkly Epidemiol Rec* 2000; 75: 17-28.

Xavier F, Bukh J. Methods for determining the hepatitis C genotypes. *Viral Hepatitis Rev.* 1998; 4: 1-19.

Zechini B, Pasquazzi C, Aceti A. Correlation of serum aminotransferases with HCV RNA levels and histological findings in patients with chronic hepatitis C: the role of serum aspartate transaminase in the evaluation of disease progression. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2004; 16: 891-6.

Zein NN, Poterucha JJ, Gross JB, Wiesner RH, Therneau TM, Gossard AA, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients infected with genotype 1b. *Am J Gastroenterol.* 1996; 91: 2560-2.

Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin Microbiol Rev.* 2000; 13: 223-35.