



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Fernanda Cristina Winckler

**Influência da Resposta inflamatória na
Resposta virológica sustentada em pacientes com
Hepatite C Crônica genótipo 1 durante o tratamento
antiviral com terapia tripla**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a)
em Pesquisa e
Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador(a): Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Coorientador(a): Profa. Dra. Marjorie de Assis Golim

**Botucatu
2016**

Fernanda Cristina Winckler

Influência da Resposta inflamatória na
Resposta virológica sustentada em pacientes
com Hepatite C Crônica genótipo 1 durante o
tratamento antiviral com terapia tripla

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre(a)
em Pesquisa e
Desenvolvimento
(Biotecnologia Médica).

Orientador (a): Prof. Dr. Giovanni Faria Silva
Coorientador(a): Profa. Dra. Marjorie de Assis Golim

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Winckler, Fernanda Cristina.

Influência da resposta inflamatória na resposta virológica sustentada em pacientes com Hepatite C Crônica genótipo 1 durante o tratamento anti-viral com terapia tripla / Fernanda Cristina Winckler. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Giovanni Faria Silva

Coorientador: Marjorie de Assis Golim

Capes: 21102007

1. Hepatite C - Tratamento. 2. Virologia. 3. Agentes antivirais. 4. Inflamação. 5. Biotecnologia.

Palavras-chave: Hepatite C; Resposta inflamatória; Resposta virológica sustentada; Tratamento.

Agradecimientos

A deus em primeiro lugar, pois foi ele quem me deu toda força necessária para continuar quando eu achava que não conseguiria.

Ao meu amado companheiro Leandro pela paciência e companheirismo nos dias de luta e dias de glória.

A minha mãe, a pessoa mais honesta e sincera que conheço e que nunca deixou de acreditar em mim.

A minha sogra Miriam que sempre entendeu os momentos que eu estava ausente e acreditou em mim.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Giovanni Faria Silva e Dra. Marjorie de Assis Golim por todo ensinamento e auxílio dado durante a execução do projeto.

As minhas amigas Livia, Juliana, Fernanda, Fernanda, Jeniffer, Jeniffer, Natalia, Bruna, Karol, Sandra, Jessica pelos momentos de lazer e risadas no meio de um momento de stress.

As minhas amigas Vanessa e Caroline pela amizade construída, pelos momentos junto e pelas quebradas de galho no ambulatório, mesmo nos dias mais corridos vocês estavam prontas para me ajudar.

A enfermeira responsável pelo Ambulatório de Hepatites Virais da UNESP, Mari Nilce, que me deu a primeira oportunidade.

A minha colega Aline que foi meu braço direito nesse projeto dentro do laboratório de citometria de fluxo, sem sua essencial ajuda eu não teria acabado.

Aos pacientes que aceitaram fazer parte da pesquisa e contribuíram fornecendo as amostras de sangue.

A todos que em algum momento de qualquer maneira contribuíram para o fim dessa etapa.

Epígrafe

*“De repente tentamos compreender sentimentos, jamais
compreensíveis aos olhos de outras pessoas.
Descobrimos o verdadeiro valor da verdade e com ela
chega a plena certeza de que ter dignidade,
transparência e retidão de caráter são qualidades
obrigatórias para se viver bem com os outros, com o
mundo e, principalmente, consigo mesmo”
(Reinaldo Müller)*

Resumo

WINCKLER, F.C. Influência da Resposta inflamatória na Resposta virológica sustentada em pacientes com Hepatite C Crônica genótipo 1 durante o tratamento antiviral com terapia tripla. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

A hepatite C é uma doença infecciosa que torna-se crônica em cerca de 85% dos infectados que poderão desenvolver cirrose e carcinoma hepato celular. O tratamento antiviral em muitos dos pacientes não é eficaz, principalmente quando estes portam o genótipo 1 e fibrose avançada, a resposta inflamatória também desempenha seu papel sobre a resposta virológica sustentada (RVS) durante o tratamento com Interferon Peguilado (PegIFN) associado a Ribavirina (RBV). Nesse estudo nosso objetivo principal foi avaliar a influência da resposta inflamatória através de células e citocinas/quimiocinas sobre a resposta virológica do paciente em tratamento antiviral com terapia tripla. Incluímos pacientes com RNA VHC+, nunca tratados (*naive*), portadores do genótipo 1, ambos os sexos e com fibrose avançada F3 (n=6); F4 (n=21) candidatos ao tratamento em regime triplo. Os pacientes tiveram suas amostras coletadas e analisadas nas semanas 0 e 12 do tratamento e os seguintes parâmetros foram analisados: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , RANTES, MCP-1, MIG, IP-10, através de citometria de fluxo (método CBA). Foram incluídos 15 voluntários saudáveis (grupo controle) e 27 pacientes que foram separados em G1(RVS) e G2 (não RVS), a taxa de RVS foi de 63%. Os pacientes com hepatite C crônica tiveram os níveis circulantes de IP10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8 e IL-6 mais elevados quando comparados com voluntários saudáveis, quando comparados G1xG2 os níveis de RANTES (p=0,04) e IL-6 (p=0,02) foram associadas com a RVS na semana 0, seus níveis eram mais baixos em G1, na semana 12 os níveis de RANTES (p=0,04) e IL-8 (n=0,01) foram associados com a RVS, seus níveis são mais elevados em G2, a comparação entre as semanas 0 e 12 mostrou que em G1 os níveis de IL6 (p= 0,02) e MCP-1 (p=0,001) apresentam associação com o tratamento e em G2 os parâmetros associados ao tratamento foram RANTES (p=0,05) e MCP-1 (p=0,01). Os resultados sugerem que, a citocina IL-6 e a quimiocina RANTES estão associadas com a RVS na semana 0. Na semana 12, RANTES assim como IL-8 influenciam na RVS durante terapia antiviral em regime triplo. Quando comparado semana 0 e 12 em pacientes RVS, a citocina IL-6 está associada ao tratamento. Em pacientes não RVS, RANTES esta associada ao tratamento e MCP-1 está associada ao tratamento independente da resposta obtida.

Palavras chave: Hepatite C, Resposta inflamatória, Resposta Virológica, Tratamento

Abstract

WINCKLER, F.C. Influence of inflammatory response on sustained virological response in patients with chronic Hepatitis C genotype 1 during antiviral treatment with triple therapy. Thesis (MS) – Botucatu Medical School. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Hepatitis C is an infectious disease which becomes chronic in about 85% of infected people who can develop cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Antiviral therapy isn't effective in many patients, especially when these patients are genotype 1 and have advanced fibrosis, the inflammatory response also plays a role on sustained virological response (SVR) during treatment with Pegylated (PegIFN) plus Ribavirin (RBV). The aim of this study was evaluate the influence of the inflammatory response by cells and cytokines/chemokines on the virologic response of the patients under antiviral treatment with triple therapy. We included patients with HCV RNA+, naive, genotype 1, both male and female and with advanced fibrosis F3 (n=6); F4 (n=21) for triple treatment regimen. Patients had their samples collected and analyzed at weeks 0 and 12 of treatment and the following parameters were analyzed: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ RANTES, MCP-1, MIG, IP-10 by flow cytometry (CBA method). Control group of 15 healthy volunteers and 27 patients, who were separated into G1 (SVR) and G2 (not SRV), were included, the SVR rate was 63%. Patients with chronic hepatitis C had higher circulating levels of IP10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8 and IL-6 compared with healthy volunteers, when G1xG2 were compared, levels of RANTES (p=0,040 and IL-6 (n=0,02) were associated with a SVR at week 0 and its levels were lower in G1; at week 12, levels of RANTES (p=0,04) and IL-8 (p=0,01) were associated with a SVR and its levels were higher in G2. The comparison between weeks 0 and 12 showed that, in G1, the IL6 levels (p = 0.02) and MCP-1 (p = 0.001) were associated with the treatment and in G2, the parameters associated with the treatment were RANTES (p = 0.05) and MCP-1 (p = 0.01). The results suggest that the cytokine IL-6 and chemokine RANTES are associated with SVR at week 0. At week 12, RANTES as well as IL-8 influence in SVR during antiviral therapy in triple regimen. When weeks 0 and 12 in patients SVR are compared, the cytokine IL-6 is associated with treatment. In non-SVR patients, RANTES is associated with treatment and MCP-1 is associated with independent treatment of the patient's response.

Key word: Hepatitis C, Inflammatory Response, Sustained Virological Response, Treatment

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas circulantes entre grupo infectado e grupo controle.....	37
Tabela 2 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas circulantes em pacientes VHC+, pré-tratamento, nos grupos estratificados pela resposta ao tratamento: com RVS (G1) e sem RVS (G2).....	38
Tabela 3 - Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas em pacientes VHC+ durante o tratamento (semana 12) nos grupos com RVS (G1) e sem RVS (G2).....	39
Tabela 4 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas no sangue periférico dos pacientes com RVS (G1) pré-tratamento e durante o tratamento (semana 12).....	39
Tabela 5 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas no sangue periférico dos pacientes sem RVS (G2) pré-tratamento e durante o tratamento (semana 12).....	40
Tabela 6 - Frequência média (%) das subpopulações de monócitos e células NK expressas nos pacientes infectados cronicamente com VHC nos dois momentos (SEM.0 e SEM.12).....	41
Tabela 7 - Frequência média (%) das subpopulações de linfócitos T CD4/CD8 nos pacientes infectados cronicamente com VHC nos dois momentos (SEM.0 e SEM.12).....	42

Lista de abreviaturas

HCC: hepatite C crônica
VHC: Vírus da Hepatite C
RNA: ácido ribonucléico
PegIFN : Interferon Peguilado
RBV: Ribavirina
RVS: Resposta Viroológica Sustentada
IPs : inibidores de protease
DAAs: agentes antivirais de ação direta
NS3/4: Proteína não-estrutural 3/4
REC: Recidivantes
NR: não respondedores
NK: Natural Killer
IFN- γ : Interferon gama
CD: Cluster of Differentiation
CD8+: Linfócito T citotóxico
CD4+: Linfócitos T auxiliares
Th: Resposta T helper
TNF- α : fator de necrose tumoral alfa
IL: Interleucina
KCs: células de Kupffer
CXCL9 = MIG: Monocina induzida por IFN- γ
CXCL10 = IP-10: Proteína 10 induzida por IFN- γ
CXCL11: Quimiocina induzida por IFN- γ
TGF- β : Fator de transformação de crescimento-beta
CXCR3: Receptor da quimiocina altamente expressa em células T efectoras
CCL5 = RANTES: Expressão e secreção regulada pela ativação de Linfócitos T CCL2 =
MCP-1: Proteína 1 Quimiotática de monócitos
CXCL8 = IL-8: Interleucina 8
NS5A: Proteína não-estrutural 5A do genoma viral
SEM.0: Período basal
SEM.12: Período 12
PCR: Reação em cadeia polimerase
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
HBV: Vírus de hepatite B

EDTA: ácido etilenodiamino tetra acético

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína

APC: Fluorocromo denominado alofocianina

PE: Fluorocromo denominado ficoeritrina

PBS: Tampão salina fosfato

CBA: Cytometric Bead Array

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVO.....	29
2.1 Objetivo principal.....	30
2.2 Objetivo específico.....	30
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	31
3.1 Coleta das amostras.....	32
3.2 Análise por citometria de fluxo.....	33
3.2.1 Imunofenotipagem de Monócitos e células NK.....	33
3.2.2 Quantificação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	33
3.2.3 Dosagens de citocinas e quimiocinas pelo método de CBA (Cytometric Bead Array®).....	34
3.3 Análise estatística.....	34
4 RESULTADO.....	35
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1 Introdução

A hepatite C crônica (HCC) é hoje considerada uma das maiores causas de doença hepática, podendo evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular (HABERSETZER, *et al.*, 2011), estando relacionada com complexos e vigorosos mecanismos imunológicos das respostas imunidade inata e adaptativa (JACOBSON-BROWN; NEUMAN, 2001). Estima-se que aproximadamente 130-150 milhões de pessoas estejam infectadas, atingindo 3% da população mundial (WHO, 2016), sendo que cerca de 85% dos infectados, após surto agudo da doença, desenvolvem hepatite crônica (ALVARIZ, 2006; MELO; MONTEIRO; RODRIGUES, 2014).

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus de RNA da família *Flaviviridae*, com genoma em fita única de polaridade positiva, o qual mede cerca de 9,6 Kb. Por ser um vírus hepatotrópico, seu principal alvo são os hepatócitos (CHO *et al.*, 1998). Após análise filogenética do VHC, foi descoberta uma distribuição dinâmica de diferentes genótipos virais (1-7), além de seus subtipos (a, b, c), sendo o genótipo 1 o mais prevalente em todo o mundo, no Brasil cerca de 65% são portadores desse genótipo (CAMPIOTTO *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2014).

Sua transmissão se dá por via parenteral, como transfusão de sangue, cirurgias e uso de drogas injetáveis, sendo esta a principal via de transmissão atualmente. Também pode ocorrer por via não parenteral, como relação sexual, apesar da baixa probabilidade. Além disso, cerca de 40% dos infectados não sabe a real via de infecção (IRVING, 1998; CAMPELO, 2013; LEMOINE; THURSZ, 2014, YAMASAKI, 2014).

A terapia baseada na combinação de Interferon Peguilado (PegIFN) e Ribavirina (RBV) até meados de 2012 era a terapia padrão para o tratamento da Hepatite C (MELLO, 2014), no entanto, apresentavam eficácia limitada (HABERSETZER *et al.*, 2011), sendo os portadores de cirrose hepática clinicamente estabelecida (F4) ou com estágio mais avançado de fibrose (F3) (MELO; MONTEIRO; RODRIGUES, 2014) e portadores do vírus genótipo 1 os que pior respondem à terapia (LEMOINE; THURSZ, 2014; HORNER, 2014), tendo de 30 a 56% de RVS (MELLO, 2014), comparados aos cerca de 80% alcançados nos genótipos 2 e 3 (GARCIA, 2012). A RVS é definida pela ausência de VHC RNA por reação em cadeia de polimerase, seis meses após o término do tratamento (CRUZ, 2014).

Em 2011 foi aprovada e tornou-se disponível uma nova classe de droga para o genótipo 1, definida como inibidores de protease (IPs) que até meados de 2015 era o tratamento oferecido. Os dois primeiros agentes antivirais de ação direta (DAAs) registrados, Boceprevir e Telaprevir, tem como alvo a região NS3/4 do vírus e são uma adição ao tratamento oferecido anteriormente, sendo a terapia PegIFN, RBV e DAAs, seu objetivo é

aumentar as chances de RVS e permitir uma terapia mais curta em pacientes com fibrose hepática baixa (F0, F1 e F2) (CIMINI *et al.*, 2013; ANDRADE, 2012; ARONSOHN; JENSEN, 2014; CRUZ, 2014; MELLO, 2014; COCO *et al.*, 2014).

As taxas de RVS aumentaram quando comparadas às taxas do tratamento com PegIFN e RBV (SILVA *et al.*, 2014), mas ainda eram baixas, sendo significativamente maiores em pacientes virgem de tratamento (*naive*), chegando a 75% e recidivantes (REC) chegando a atingir a mesma taxa dos *naives*. Já os não respondedores (NR) apresentaram uma taxa que variou de 40 até 52%, levando em conta que os participantes do estudo com recidivantes e não respondedores, possuíam também fibrose hepática avançada (F3 e F4) (BACON *et al.*, 2011; SOCIEDADE, 2011; AZEVEDO; KOMNINAKIS, 2014).

Além dessa resposta escassa os efeitos adversos apresentados pelos pacientes devido ao uso da medicação eram terríveis e também um dos motivos de descontinuação do tratamento (BRONOWICKI *et al.*, 2012), assim, a tendência é que se deixe de usar essa medicação assim que outras, mais eficazes e melhor toleráveis se tornem disponíveis (EASL, 2015).

Novas drogas em estágios distintos de desenvolvimento têm como alvo principal o genótipo 1, visam encurtar a duração do tratamento, aumentar a eficácia, a tolerância e a adesão dos pacientes, além de apresentar menos efeitos adversos. Essas medicações são denominadas DAAs e tem como alvo principal a região NS3/4A, NS5A e NS5B do VHC. Dados preliminares de estudos que avaliam estes aspectos mostram taxas de RVS entre 88 à 100% em pacientes nunca tratados e taxas animadoras em pacientes previamente tratados (EASL, 2013; CARRION; GUTIERREZ; MARTIN, 2014; EASL, 2015).

Sabe-se que alguns fatores virais e do hospedeiro estão envolvidos com a resposta que o paciente terá ao longo do tratamento como sexo, idade, grau de fibrose e presença de doenças concomitantes, todavia, a resposta inflamatória também parece ter seu papel nesses fatores (YAMASAKI, 2014).

Uma das vias de entrada do vírus na célula hospedeira é através da proteína do envelope E2 do VHC que reconhece e se liga a molécula de superfície CD81 (molécula tetrasplamina) presente principalmente na superfície de hepatócitos, mas também descrita em outras células como linfócitos e megacariócitos (PILERI *et al.*, 1998; WATANABE, 2016). Outras vias já foram descritas tais como o receptor LDL que também pode ser um receptor do vírus e a proteína do envelope E1 que tem tido participação para entrada do vírus na célula hospedeira (GIANNINI, BRÉCHOT, 2003; POLYAK, 2003)

Quando o vírus se dissemina no organismo, um fator determinante da patogênese é sua

distribuição entre e dentro dos tecidos do hospedeiro; essa distribuição viral é um processo determinado por fatores tais como presença de receptores virais específicos, resposta imunológica inata e adaptativa, susceptibilidade hospedeira e genes de resistência (HENRIQUES, 2012).

O VHC é inicialmente detectado pelo sistema de defesa do hospedeiro que age na supressão da replicação viral (HORNER, 2014). Mecanismos imunológicos humorais e celulares participam na defesa do hospedeiro contra o vírus. A resposta mediada por células depende da atividade de células T citotóxicas e auxiliares e funciona por meio das ações de citocinas para regular macrófagos, células natural killer (NK) e proteínas celulares antivirais (JACOBSON-BROWN; NEUMAN, 2001).

Poucas horas após a infecção, as células NK já iniciam mecanismos da imunidade inata no organismo do hospedeiro. Uma das principais contribuições das células NK consiste na produção de IFN-gama (IFN- γ) que além de atuar na lise da célula infectada, sendo um fator importante no combate à infecção, também é essencial para ativação de outras células NK, macrófagos apresentadores de antígenos, linfócitos B e elementos da imunidade adaptativa como os linfócitos T. Os linfócitos T mesmo sendo muito parecidos com as células NK, começam a responder a infecção após 2 dias. (BARBOSA, 2008; JOBIM; JOBIM, 2008; HENRIQUES, 2012).

Todo esse mecanismo imunológico altamente eficiente funciona em alguns pacientes que conseguem o clareamento espontâneo, já outros, mesmo com essa vigorosa resposta imune, a infecção vem a tornar-se crônica. O motivo pelo qual a infecção se torna crônica não está totalmente elucidado, mas estima-se que esse perfil de paciente tenha uma resposta das células T fraca e após a cronificação, essa resposta não consegue promover seleção diante de mutações de escape o que favorece o vírus desenvolver mecanismos eficazes para escapar do reconhecimento imunológico (SEMMO; KLENERMAN, 2007; ARAUJO, 2010; FARCI et al., 2012; SPAAN, 2015).

As células T exercem sua função a partir da secreção de citocinas que ativam macrófagos que destroem agentes intracelulares ou pela citotoxicidade mediada por células CD8+ (MACHADO et al., 2004). As células T assim como as NKs tem um importante papel como mediador da resposta imune antiviral, suas atuações como preditores da eficácia terapêutica a base de PegIFN são bem documentadas (ZEREMSKI et al., 2015).

Segundo Araujo e colaboradores (2013) pacientes portadores de hepatite C respondedores ao tratamento apresentam aumento significativamente maior da frequência de células T CD8+ pré-terapia comparados aos não-respondedores (ANDRADE, 2012). Nguyen

e colaboradores (2016) relataram o oposto, pois afirmam que a ativação de células T CD8+ pré terapia é maior em NR do que naqueles com RVS.

As células T CD4+ efectoras dão origem a duas subpopulações, Th1 e Th2 que são distintas pelo perfil de citocinas que produzem. Linfócitos Th1 são responsáveis por funções como ativação de linfócitos T citotóxicos e estão associados com a inflamação excessiva. Durante a infecção pelo VHC, principalmente monócitos/macrófagos e células dendríticas produzem citocinas pro-inflamatórias (Th1), como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Hepatócitos e células de Kupffer (KCs) expressam receptores para TNF- α , IL-1 e IL-6 e, por sua vez, macrófagos residentes e KCs também produzem TNF- α , IL-1 β . Estes eventos potencializam a cascata de sinais pro-inflamatórios que ocorrem durante a infecção pelo VHC (AMATI et al., 2002; HENRIQUES, 2012). As células Th1 produzem IFN- γ que impede a proliferação de células Th2, porém, a produção de Th1 também pode ser bloqueada quando IL-4 ou IL-6 aparecem elevadas (KIDD, 2003).

Células Th2 estão relacionadas a produção de anticorpos e proliferação de linfócitos B, além de inibir a atividade de células Th1, levando ao desequilíbrio. A IL-10 é uma das citocinas anti-inflamatórias que desativa macrófagos no sentido de inibir a liberação de citocinas pro-inflamatórias. Ao mesmo tempo, regula negativamente a função Th1, reduzindo a produção de IL-2 e IFN- γ (AMATI et al., 2002; HENRIQUES, 2012).

Outros tipos celulares também podem impedir que a resposta Th1, Th2 ou ambas desempenhem suas atividades, são elas as células T reguladoras (KIDD, 2003). O desbalanço entre as subpopulações Th1 e Th2 tem sido reportado como tendo papel central no desenvolvimento de infecções virais crônicas, contudo ainda há controversias sobre qual delas contribui para a patogênese da hepatite C (NELSON et al., 2003; HENRIQUES, 2012; ZHANG et al., 2014).

Durante a infecção aguda, pacientes que conseguem clareamento viral exibem predominância de resposta Th1. Contrariamente, pacientes que desenvolvem infecção crônica têm predomínio de resposta Th2, exercendo efeito inibitório no sistema imune, favorecendo a persistência viral (AMATI et al., 2002)

Cacciarelli et al. (1996) demonstraram que níveis séricos de citocinas Th2 estão significativamente aumentados em pacientes com hepatite C e diminuídos na terapia com interferon com redução de carga viral. Em contraste, Ingot et al. (2008) não observaram diferenças de níveis sérico de IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10 em pacientes VHC quando comparados com indivíduos saudáveis.

O vírus, antes de lesionar o fígado, desencadeia a proliferação de linfócitos

específicos, estes fazem com que ocorra apoptose dos hepatócitos pela produção de citocinas inflamatórias (CAMPELO, 2013; MOURA, 2008). Citocinas inflamatórias e quimiocinas são os principais reguladores da função fisiológica e imunológica durante as infecções virais (LI et al., 2012). Elas estão envolvidas na patogênese da hepatite C sendo essenciais na defesa do hospedeiro contra a invasão viral, entretanto, a persistência da infecção pode alterar o equilíbrio entre citocinas imunoestimulatórias e inibitórias, podendo estas atuar na perpetuação da inflamação e levar a necrose, fibrose e doença hepática crônica (JACOBSON-BROWN; NEUMAN, 2001; FALLAHI et al., 2012).

Quimiocinas tem recebido grande atenção nas hepatites virais, especialmente na infecção crônica pelo vírus C. De um lado, elas estão envolvidas nos mecanismos da resposta inflamatória durante a progressão da doença hepática, influenciando o desenvolvimento de fibrose e cirrose. Por outro lado, quimiocinas estão especificamente envolvidas na resposta imune adaptativa dirigida contra o VHC, a qual determina a manutenção ou resolução da infecção viral. Além disso, o VHC pode modular quimiocinas e a expressão de receptores na tentativa de escapar da resposta imune eficiente (MARRA; TACKE, 2014).

A incapacidade da resposta imune em controlar a replicação viral leva ao recrutamento de infiltrados inflamatórios inespecífico no parênquima hepático atraídos por quimiocinas induzidas por IFN- γ (CXCL9, CXCL10, CXCL11), resultando em dano hepático persistente (inflamação crônica) e, eventualmente, cirrose hepática (FALLAHI et al., 2012).

Estudos recentes têm demonstrado alterações nos níveis de citocinas hepáticas e séricas em pacientes com VHC, diferindo entre os progressores rápidos e lentos, sendo os progressores lentos aqueles que apresentam níveis mais elevados de IFN- γ e os progressores rápidos níveis aumentados de MCP-1, IL-8 e IP-10 (FARCI et al., 2012; SOFIAN et al., 2012). Os progressores rápidos possuem um atraso na soroconversão do anticorpo anti-VHC, com isso os progressores lentos apresentam uma resposta imune específica mais eficiente (FARCI et al., 2012). Também há diferenças destas proteínas circulantes dependendo do grau de fibrose hepática que o paciente se encontra (MAGNONI, 2014).

A renovação na concentração de citocinas pode contribuir para alcançar resultados no tratamento da hepatite C crônica. O sucesso ou fracasso do tratamento podem ser definidos pela qualidade da resposta Th1 VHC específica, seus níveis séricos podem presumir a resposta terapêutica (ARAUJO, 2010; FALCONER et al., 2010; MOURA et al., 2011; NGUYEN et al., 2016). Os doentes que apresentarem resposta imune celular pouco expressiva na fase pré-tratamento, provavelmente não a modificarão durante o tratamento, tendo como resultado a não resposta no final da terapia (ANDRADE, 2012).

As citocinas e quimiocinas secretadas em resposta a lesão celular têm importante papel na patogênese da fibrose hepática. Através dos fibroblastos elas estimulam a síntese de colágeno levando à formação de fibrose, com isso ocorre deposição abundante de matriz extracelular. A alta produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e TGF- β pode contribuir para distorção da arquitetura hepática e progressão para cirrose (VISO, 2007; BARBOSA, 2008; MOREIRA, 2012). Quando a cirrose é estabelecida, o risco de descompensação é alto, além da tolerância e resposta ao tratamento viral ser reduzida (SILVA et al., 2014)

Revisão de citocinas/quimiocinas

Interleucina (IL) 4

A IL-4 é uma citocina anti-inflamatória que determina o perfil da resposta imune Th2 assumindo papel negativo na resposta Th1, com isso promove a diferenciação de Th2 em células T. Induz a proliferação e a diferenciação de células B e tem seus efeitos contrapostos pelo IFN- γ . A sua diminuição mais acentuada em pacientes respondedores ao tratamento, pode estar relacionada com um enfraquecimento mais evidente da resposta Th2 nestes doentes (VARRELA; FORTE, 2001; HENRIQUES, 2012).

IL-10

É um inibidor de células dendríticas ativadas e macrófagos, com isso, controlam reações da imunidade mediada por células e inata. A IL-10 é produzida por células CD8+ ativadas, mas também pode ocorrer produção por linfócitos B, monócitos, células Th1 e Th2. Atua na sub-regulação dos mecanismos efetores da resposta Th1, ou seja, seu principal efeito é inibir outras citocinas, fazendo com que estas voltem ao normal. Observou-se, anteriormente, que os níveis séricos de IL-10 se encontram elevados em pacientes com a infecção crônica pelo VHC, e positivamente relacionada com a progressão da fibrose (VARRELA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005; HENRIQUES, 2012).

IL-6

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que se encontra envolvida na fase aguda da resposta imune, atua tanto na imunidade inata quanto adaptativa. Suas principais fontes de produção são as células B, T e monócitos. Dentre suas ações atrai eosinófilos para o local de inflamação (VARRELA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005), promove a maturação

de linfócitos B e a diferenciação Th2, ocorrendo inibição da polarização Th1. Com isso é de se esperar que a resposta Th2 que atua na persistência da infecção e inflamação do fígado, seja prevalente nos pacientes não respondedores com níveis mais expressivos de IL-6 (HENRIQUES, 2012; ZHANG, 2014).

Além disso, os níveis de IL-6 aparecem mais elevados em pacientes com a doença em estágio avançado e portando o genótipo 1 comparados aos com infecção recente e portadores do genótipo 2. Também já foi demonstrado que a carga viral é inversamente proporcional aos níveis dessa citocina. (ZHANG et al., 2014).

IL-2

A IL-2 é uma citocina que necessita de sinais para atingir sua produção máxima, é produzida por células Th1 sendo sintetizada também por células B e monócitos, mas estas em menor quantidade. É o principal estimulador de células T agindo como fator de crescimento para expansão clonal e também atua na maturação de células T em células TCD8+ citotóxicas. A produção de IL-2 tende a ser aumentada nos pacientes em processo de recuperação, isso induz a proliferação e ativação de células NK. (VARRELA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005; HENRIQUES, 2012).

Proteína 10 induzida por IFN- γ (CXCL10 - IP-10)

A CXCL10 desempenha um importante papel na inflamação do fígado, funciona como citocina quimiotática para monócitos, linfócitos T e células NK, além disso, induz memória as células T. Tem-se observado que em pacientes infectados pelo VHC, níveis elevados de CXCL10 no plasma antes do tratamento, são preditores de falha de resposta (HENRIQUES, 2012; WILLESENSE et al., 2014).

Monocina induzida por IFN- γ (CXCL9 - MIG)

As quimiocinas são um grupo de pequenas citocinas envolvidas no tráfego e ativação de leucócitos, assim como na diferenciação de linfócitos. MIG atua no balanço entre Th1 /Th2 e em processos de fibrogênese devido ao recrutamento de células Th1 para o fígado. MIG funciona se ligando ao receptor de quimiocinas do CXCR3 presentes em células T e NK. Os genes que as codificam são induzíveis por IFN- γ (EGESTEN et al., 2007; HENRIQUES, 2012). Em portadores de hepatite C, sabe-se que essa quimiocina é mais elevada do que em indivíduos saudáveis, no entanto, seus valores não apresentam nenhuma associação com a resposta ao tratamento (MOURA et al., 2009; MOURA et al., 2011).

Expressão e secreção regulada pela ativação de Linfócitos T (RANTES/CCL5)

Quimiocina expressa por vários tipos de células, funciona como quimioatraente para células efectoras, células T auxiliares de memória, eosinófilos e monócitos do sangue durante infecções agudas. Ativa eosinófilos e induz a liberação de histamina de basófilos. Tem participação na resposta T-helper que é essencial no controle da doença hepática e nos desfechos da infecção pelo VHC. Seu papel na imunidade durante infecções crônicas se mantém obscuro. (CROWFORD et al., 2011; KATSOUNAS; SCHLAAK; LEMPICKI, 2011; CCL5, 2016). Ela parece exercer efeito pleiotrópico como componente chave da resposta fibrogênica. Células estreladas hepáticas são consideradas como importante fonte de RANTES no fígado, embora também possa ser liberada por leucócitos e plaquetas (MARRA; TACKE, 2014).

Proteína-1 Quimiotática de monócitos (MCP-1/CCL2)

É uma das quimiocinas que regulam a migração e infiltração de monócitos / macrófagos pois são sua principal fonte, e também de linfócitos T de memória que são seu principal alvo. É importante para as respostas imunes antivirais na circulação periférica e nos tecidos, pois a migração dos monócitos do fluxo de sangue pelo endotélio vascular é essencial para a vigilância imunológica da resposta à inflamação. (DESHMANE et al., 2009).

Na infecção pelo vírus da hepatite C, os valores de MCP-1 são aumentados, e o que tem se observado é que essa quimiocina atinge seu pico máximo na semana 12 de tratamento, depois disso começa a ter queda chegando quase ao valor basal (FLORHOLMEN et al., 2011; RIBEIRO, 2015).

Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

É uma citocina produzida por macrófagos no período de reconhecimento de antígenos antivirais no decorrer da reação inflamatória. Também podem ser sintetizada por neutrófilos, células NK, monócitos e células-T (VARELLA; FORTE, 2001; HENRIQUES, 2012).

Esta envolvida em processos como proliferação celular e metabolismo lipídico. Sua atuação em pacientes infectados com VHC é como indutor de apoptose, o que contribui para lesões de hepatócitos não infectados, induzidas por Linfócitos T citotóxicos (HENRIQUES, 2012) Os receptores de TNF fazem parte de uma grande família de proteínas que estão envolvidas nas respostas inflamatórias e imunes. Sua principal função é promover o

recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da infecção onde ativa essas células na tentativa de erradicar o patógeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

IL8

Responsável por codificar uma proteína pertencente à família das quimiocinas CXC. A IL-8 é produzida por vários tipos de células, e funciona como agente quimiotático para neutrófilos, basófilos e células T. É um importante mediador da resposta inflamatória e também agrupa fatores quimiotáticos. Nos hepatócitos, a NS5A induz IL-8 que acaba por inibir as funções antivirais provocadas pelo IFN (VARELLA; FORTE, 2001; MOURA et al., 2009; HENRIQUES, 2012). Devido a isso, os níveis elevados de IL-8 são associados com resistência ao tratamento com INF (POLYAK et al., 2001).

IFN- γ

O IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos, é produzida principalmente por células T, B e NK. Sua principal função é imunomoduladora sendo essencial na imunidade mediada por células. Promove diferenciação de células T CD4+ *naive* em Th1 e inibe a proliferação de Th2. Sua produção a partir de células NK e linfócitos T é estimulada por IL-12. O IFN- γ então ativa macrófagos para que destruam microorganismos fagocitados. Aumento em sua produção é provocado por estímulo da IL-2 através das células T (VARELLA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005). Seu papel durante a infecção pelo VHC não é conhecido (WEI et al., 2009).

Trapero et al. (2005) reportou que as citocinas Th1 induzidas em resposta ao tratamento com IFN e RBV, medidas através da produção de IFN- γ , foram associadas com a RVS, sugerindo um papel no controle da replicação e posterior apuramento da infecção em pacientes infectados por VHC genótipo 1.

IL17-A

A IL-17 faz parte da família de citocinas que levam a produção de outras citocinas pró-inflamatórias. É produzida por células T CD4+, mas também por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. As funções essenciais dessa citocina *in vivo* não estão totalmente elucidadas, no entanto, acredita-se que ela desempenhe funções de amplificação em diferentes reações inflamatórias dependentes de células T (VARELLA; FORTE, 2001; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Estudos prévios com pacientes em uso de PegIFN e RBV avaliaram a influência da

resposta inflamatória na resposta virológica e mostraram que há uma relação entre alguns parâmetros (BUTTERA et al., 2005; DIAGO et al., 2006; MOURA, 2008; MOURA et al., 2011; KOMASE et al., 2013; NGUYEN et al., 2016), todavia, estudos que avaliam essa influência no tratamento com PegIFN, RBV e IP são escassos (ZEREMSKI et al., 2015). A resposta imune ao VHC exige mais estudos por se tratar de um vírus de alta prevalência e persistência.

2 Objetivo

2.1 Objetivo Principal

Avaliar a influência da resposta inflamatória através de citocinas e quimiocinas na resposta virológica do paciente em tratamento antiviral com terapia tripla.

2.2 Objetivos específicos

1. Dosar citocinas/quimiocinas plasmáticas no pré-tratamento (SEM.0) e após 12 semanas de tratamento (SEM.12);
2. Comparar os níveis de citocinas/quimiocinas na SEM.0 entre pacientes com HCC e grupo controle;
3. Comparar os níveis de citocinas/quimiocinas:
 - i. SEM.0: RVS x não RVS
 - ii. SEM.12: RVS x não RVS
 - iii. Grupo RVS: SEM.0 x SEM.12
 - iv. Grupo não RVS: SEM.0 x SEM.12
4. Quantificar subpopulações de linfócitos T, células NK e monócitos do sangue periférico na SEM.0 e SEM.12;

3 Casuística e Métodos

Estudo prospectivo em que foram incluídos pacientes infectados cronicamente pelo VHC atendidos no Ambulatório de Hepatites Virais da disciplina de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu em 11/08/2014 e foi aprovado em 01/09/2014 sob o parecer 773.353. O consentimento informado foi obtido de todos os pacientes envolvidos no estudo.

Os pacientes tiveram suas amostras coletadas e analisadas em dois tempos (SEM.0 e SEM.12) no tratamento com PegIFN, RBV e IPs independente de ser Boceprevir ou Telaprevir.

Critérios de Inclusão:

- ✓ pacientes *naive* que tenham RNA positivo confirmado no soro por PCR;
- ✓ ambos os sexos;
- ✓ idade igual ou superior à 18 anos;
- ✓ genótipo 1;
- ✓ fibrose 3/4.

O grau de estadiamento da fibrose foi definido através da biópsia hepática pela classificação do escore Metavir.

Critérios de exclusão:

- ✓ co-infecção para Hepatite B e/ou HIV;
- ✓ gestantes;
- ✓ usuários de droga ilícita e/ou álcool.

Os seguintes dados epidemiológicos e clínicos foram registrados: idade, sexo, fibrose, genótipo viral, resultado das Cargas Viral.

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados dois tubos de sangue com anticoagulante EDTA contendo 5ml cada, os quais foram transportados ao laboratório de citometria de fluxo do Hemocentro de Botucatu/UNESP para realizar o processamento em até duas horas após sua coleta, garantindo sua integridade. Um dos tubos foi usado para as imunofenotipagens que são analisadas em sangue total, no mesmo dia da coleta. Estas foram mantidas em temperatura ambiente até o

seu processamento. A segunda amostra foi usada para dosar citocinas e quimiocinas, sendo mantida a 4°C imediatamente após a coleta, centrifugada por 10 minutos à 300g e o plasma alíquotado em microtubos Eppendorf para congelamento a -80°C em até 2 horas após a coleta.

3.2 ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

3.2.1 Imunofenotipagem de Monócitos e células NK

As alíquotas de 100uL de sangue total foram inseridas em tubos de poliestireno (12X75mm), próprios para uso em citômetro de fluxo, incubadas com anticorpos monoclonais de interesse marcados com fluorocromos por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas de luz. Os marcadores de superfície celulares que foram avaliados são: CD3-FITC (10µl), CD16-APC (5µl) e CD56-PE (10µl) para células NK; CD14-FITC (5µl) e CD16-APC (5µl) para monócitos, de modo que puderam ser lidos e distintos por detectores específicos em citômetro de fluxo. Após marcação, as hemácias foram lisadas com 1mL de FACSLysing Solution-BD®, para otimizar a análise de leucócitos. Após 15 minutos de incubação, a amostra foi centrifugada a 300 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado, adicionado 500uL de PBS (0,015M pH 7,4) e o processo de lavagem foi repetido. Ao final, foi acrescentado 300uL de PBS para ressuspender as células e proceder à leitura em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (BD), constituído de 4 detectores de fluorescência.

A aquisição e análise dos dados foi realizada no programa *CellQuest™*, empregando-se diferentes estratégias de análises.

As identificações das subpopulações de interesse foi realizada através de estratégias de *gates* específicas para cada tipo celular, e as expressões dos marcadores celulares, incluindo a presença de co-expressão entre eles, foram expressas em valores relativos (percentuais).

3.2.2 Quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

Pipetamos 20µl do BD Multitest® (CD3, CD8, CD45 e CD4) em Tubos BD TruCOUNT®. Em seguida, homogeneizamos adequadamente por inversão o tubo mãe da amostra e pipetamos através da técnica de pipetagem reversa 50µl de sangue periférico. Agitamos no vórtex e incubamos em temperatura ambiente no escuro por 15 minutos. Foi adicionado 450µl de solução de lise FACSLysing Solution - BD®, agitado no vórtex e incubado seguindo os mesmos procedimentos anteriores. Procedemos a leitura no citômetro FACSCalibur-BD, utilizando o programa MultiSet®.

3.2.3 Dosagens de citocinas e quimiocinas pelo método de CBA (Cytometric Bead Array®)

As quantificações de quimiocinas e citocinas foram realizadas com uso dos kits *CBA Human Chemokine Kit* (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10) e *CBA Human Th1/Th2/Th17* (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL17A), seguindo as instruções do fabricante. Neste ensaio cada uma das *beads* fluorescentes é conjugada a um anticorpo específico direcionado contra cada analito de interesse (citocinas/quimiocinas), sendo que a intensidade de fluorocromo de cada *bead* é distinta, possibilitando as separações. Se o complexo *bead*+anticorpos de captura reagir com o analito de interesse, anticorpos monoclonais de detecção conjugados com fluorocromos PE (fluorescência distinta das *beads*) se ligarão ao complexo, fornecendo sinal de fluorescência proporcional à quantidade da quimiocina/citocina presente na amostra. Ao final do ensaio as aquisições são analisadas no software BD FCAPArray®. A unidade das citocinas e quimiocinas serão apresentadas em pg/ml.

3.3 Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software SAS versão 4.0 para windows. O nível de significância estabelecido para verificar hipóteses foi de 5%. Análise de associação foi feita pelo teste exato de Fisher e para comparação entre variáveis foi empregado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis visto que os dados analisados não preencheram as suposições exigidas para distribuição normal. O teste pareado foi feito com o teste Wilcoxon.

4 Resultados

Foram incluídos no estudo 31 pacientes VHC+, no entanto, quatro participantes (n=4) foram excluídos pelas seguintes causas: dois foram a óbito durante o tratamento, um interrompeu o tratamento e um foi classificado com grau de fibrose F2 pelo Metavir.

Dos 27 analisados, 18 eram homens e 9 mulheres. A idade variou de 36 a 71 anos, com média de 55,11 (DP±10,03). O grupo controle foi composto por 15 voluntários saudáveis com idade média de 34,13 (DP±10,78), o estágio de fibrose do grupo controle não é conhecido.

Os parâmetros circulantes avaliados foram: IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , RANTES, MCP-1, MIG e IP-10. No entanto, as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL17-A, IFN- γ e TNF- α apresentaram-se com níveis indetectáveis em muitas amostras, impossibilitando as análises estatísticas. Acreditamos que fatores relacionados aos insumos possam ter influenciado, inclusive os limites de sensibilidade dos testes, em picogramas, pois testes posteriores com kits de alta sensibilidade (fentogramas) foram capaz de detectar citocinas no plasma de alguns pacientes (resultados não mostrados, feitos somente em algumas amostras para comparar os kits). Talvez, outro fator relevante possa ter sido a instabilidade de algumas proteínas solúveis, que podem sofrer alterações com oscilações de temperatura, condições de armazenamento e tempo de processamento mesmo com todos os cuidados tomados com a execução metodológica.

Desta forma, abordaremos as variáveis que puderam ser quantificadas IL-6, IL-8, RANTES, MCP-1, MIG, IP-10.

I. Análise comparativa entre Grupo Infectado e Grupo Controle

Pacientes VHC+ tiveram níveis circulantes de IP10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8 e IL-6 mais elevados quando comparados com voluntários saudáveis (Tabela 1), sendo que somente IL-6 não foi estatisticamente significativa.

Tabela 1 – Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas circulantes entre grupo infectado com fibrose avançada e grupo controle (saúdaveis)

Variável	Media / DP	Media / DP	Valor de p
	(Grupo infectado)	(Grupo controle)	
IP-10	988,40 ± 521,30	52,61 ± 29,19	<0,001*
MCP-1	40,80 ± 36,13	7,48 ± 5,99	<0,001*
MIG	376,52 ± 226,80	10,80 ± 9,49	<0,001*
RANTES	2389,11 ± 1037,23	744,07 ± 410,98	<0,001*
IL8	23,33 ± 21,86	0,91 ± 0,81	<0,001*
IL6	2,68 ± 7,95	0,28 ± 0,61	0,98

IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ); MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos); MIG (monocina induzida por IFN- γ); RANTES (Expressão e Secreção regulada pela ativação de Linfócitos T); IL8 (Interleucina 8); IL6 (Interleucina 6)

II. *Análise comparativa pré-tratamento entre Pacientes RVS e não RVS*

Os indivíduos infectados foram estratificados em dois grupos: Grupo 1 (G1): aqueles que atingiram RVS após o tratamento; Grupo 2 (G2): aqueles que não atingiram RVS.

Dos 27 pacientes tratados e avaliados, 63% atingiram RVS, vinte e um (21) eram portadores de fibrose 4 (cirrose) e seis (6) portadores de fibrose 3.

As análises comparando a SEM.0 de citocinas e quimiocinas entre os dois grupos (G1 *versus* G2) mostraram que RANTES (p=0,04) e IL-6 (p=0,02) estão associadas com a RVS (Tabela 2), estando ambos parâmetros em níveis mais baixos nos pacientes que desenvolveriam resposta virológica sustentada *a posteriori*. Embora IL-8 não tenha apresentado diferença significativa, é notável a tendência ao mesmo padrão visto em IL-6 e RANTES.

Tabela 2 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas circulantes em pacientes pré-tratamento, nos grupos RVS (G1) e não RVS (G2)

Variável	Media / Interquartil	Media / Interquartil	Valor de p
	G1	G2	
IP10	946,24 (601,00 – 1240,25)	1060,08 (752,30 – 1502,66)	0,37
MCP-1	40,22 (19,18 – 51,72)	41,79 (18,54 – 51,20)	0,76
MIG	371,74 (200,21 – 574,72)	384,66 (167,17 – 564,08)	0,76
RANTES	2097,85 (1629,33 – 2524,76)	2884,26 (2340,67 – 3440,24)	0,04*
IL8	17,46 (5,97 – 21,61)	33,31 (11,78 – 40,10)	0,12
IL6	0,50 (0 – 0)	6,40 (0 – 4,61)	0,02*

IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ); MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos); MIG (monocina induzida por IFN- γ); RANTES (Expressão e Secreção regulada pela ativação de Linfócitos T); IL8 (Interleucina 8); IL6 (Interleucina 6)

III. *Análise comparativa entre Pacientes RVS e não RVS na semana 12 de tratamento*

Quando comparamos os níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas na SEM.12 entre G1 e G2, observamos valores de IL-8 estatisticamente distintos ($p=0,01$), assim como RANTES ($p=0,04$), ambos aumentados em G2. Todavia, o nível de IL-6 circulante que havia sido relevante ($p=0,02$) entre os grupos pré-tratamento, nesse momento (semana 12), embora tenha aumentado a expressão nos pacientes não RVS, esta não foi estatisticamente significativa (Tabela 3). Não observamos diferenças entre a resposta inflamatória nos pacientes que fizeram uso de boceprevir ou telaprevir, embora o número de pacientes que tenham feito uso de Boceprevir ($n=8$) tenha sido menor do que os que usaram telaprevir ($n=13$).

Tabela 3 - Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas/quimiocinas em pacientes durante o tratamento (semana 12) nos grupos RVS (G1) e não RVS (G2)

Variável	Media / Interquartil-	Media / Interquartil-	Valor de p
	G1	G2	
IP10	903,02 (557,09 – 980,73)	1357,09 (610,24 – 1476,23)	0,34
MCP-1	86,59 (53,29 – 121-87)	95,19 (50,69 – 119,01)	0,96
MIG	546,73 (266,19 – 872,92)	550,49 (225,43 – 499,41)	0,58
RANTES	2621,98 (1629,33 – 3756,25)	3832,39 (3381,49 – 4698-48)	0,04*
IL8	24,09 (11,58 – 30,41)	45,53 (23,04 – 56,83)	0,01*
IL6	4,02 (0 – 3,46)	39,35 (0 – 8,78)	0,59

IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ); MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos); MIG (monocina induzida por IFN- γ); RANTES (Expressão e Secreção regulada pela ativação de Linfócitos T); IL8 (Interleucina 8); IL6 (Interleucina 6)

IV. Análise comparativa entre Pacientes RVS pré-tratamento e na semana 12 de tratamento

As tabelas 4 e 5 contêm os dados de G1 (RVS) e G2 (não RVS) de acordo com as avaliações dos mesmos indivíduos nos dois momentos, SEM.0 e SEM.12.

Tabela 4 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas no sangue periférico dos pacientes RVS (G1) pré-tratamento e durante o tratamento (semana 12)

Variável	Media / Interquartil-	Media / Interquartil-	Valor de p
	SEM.0	SEM.12	
IP10	946,24 (601,00 – 1240,25)	903,02 (557,09 – 980,73)	0,89
MCP-1	40,22 (19,18 – 51,72)	86,59 (53,29 – 121-87)	0,001*
MIG	371,74 (200,21 – 574,72)	546,73 (266,19 – 872,92)	0,36
RANTES	2097,85 (1629,33 – 2524,76)	2621,98 (1629,33 – 3756,25)	0,38
IL8	17,46 (5,97 – 21,61)	24,09 (11,58 – 30,41)	0,26
IL6	0,50 (0 – 0)	4,02 (0 – 3,46)	0,02*

IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ); MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos); MIG (monocina induzida por IFN- γ); RANTES (Expressão e Secreção regulada pela ativação de Linfócitos T); IL8 (Interleucina 8); IL6 (Interleucina 6)

Pacientes que atingiram RVS ao término da terapia (G1), tinham níveis de IL-6 basais

(média: 0,50) semelhantes ao grupo controle (média: 0,28). No entanto, aqueles que não desenvolveram RVS (G2) tinham níveis de IL-6 mais elevados (média: 6,40), diferindo estatisticamente do grupo com RVS. Em G1 (RVS), os parâmetros IL6 ($p=0,02$) e MCP-1 ($p=0,001$) apresentaram-se associados ao tratamento, havendo aumento significativo destas citocinas na semana 12 de tratamento.

V. *Análise comparativa entre Pacientes não RVS pré-tratamento e na semana 12 de tratamento*

Tabela 5 - Comparação dos níveis de citocinas/quimiocinas no sangue periférico dos pacientes não RVS (G2) pré-tratamento e durante o tratamento (semana 12)

Variável	Media / Interquartil-	Media / Interquartil-	Valor de p
	SEM.0	SEM.12	
IP10	1060,08 (752,30 – 1502,66)	1357,09 (610,24 – 1476,23)	0,91
MCP-1	41,79 (18,54 – 51,20)	95,19 (50,69 – 119,01)	0,01*
MIG	384,66 (167,17 – 564,08)	550,49 (225,43 – 499,41)	0,62
RANTES	2884,26 (2340,67 – 3440,24)	3832,39 (3381,49 – 4698-48)	0,05*
IL8	33,31 (11,78 – 40,10)	45,53 (23,04 – 56,83)	0,14
IL6	6,40 (0 – 4,61)	39,35 (0 – 8,78)	0,69

IP10 (proteína 10 induzida por IFN- γ); MCP-1 (proteína-1 quimiotática de monócitos); MIG (monocina induzida por IFN- γ); RANTES (Expressão e Secreção regulada pela ativação de Linfócitos T); IL8 (Interleucina 8); IL6 (Interleucina 6)

Em G2, RANTES ($p=0,05$) e MCP-1 ($p=0,01$) apresentaram elevações importantes que foram associadas com o tratamento, os níveis circulantes se elevaram na semana 12 de tratamento. Embora as demais citocinas/quimiocinas não tenham apresentado níveis estatisticamente relevantes, é notável o aumento dos seus níveis na semana 12.

VI. *Dados descritivos de resposta celular dos Pacientes nos períodos pré-tratamento e na semana 12 de tratamento*

Em seis dos pacientes foi possível avaliar o perfil de resposta celular à infecção pelo vírus C. Como o “n” foi baixo, estas avaliações não puderam ser analisadas estatisticamente, sendo obtidas as frequências (média, valores mínimo e máximo) das subpopulações de

monócitos, subpopulações de células NK e subpopulações de linfócitos T CD4/CD8. As variáveis são apresentadas nas tabelas 6 e 7:

Tabela 6 – Frequência média (%) das subpopulações de monócitos e células NK expressas nos pacientes nos dois momentos (SEM.0 e SEM.12)

Variável	Media / MIN-MAX	Media / MIN-MAX
	SEM.0	SEM.12
Monócitos totais	6,43 (4,88-7,82)	5,77 (1,55 - 10,83)
Monócitos clássicos	87,21 (81,66 - 90,44)	78,31 (70,37 - 85,89)
Monócitos pró-inflamatórios	12,78 (9,56 - 18,34)	21,69 (14,11 - 29,63)
NK Totais	28,40 (5,38 - 52,77)	14,06 (0,56 - 38,58)
NK CD56^{dim}	91,02 (83,11 - 99,13)	69,97 (48,19 - 88,26)
NK CD56^{bright}	8,97 (0,88 - 16,89)	30,02 (11,74 -51,81)

NK (células natural killer); NK CD56^{dim} (células natural killer com baixa expressão de CD56 e alta expressão de CD16); NK CD56^{bright} (células natural killer com alta expressão de CD56 e baixa ou nenhuma expressão de CD16)

Os monócitos pró-inflamatórios e células NK-CD56^{bright} tiveram aumento na semana 12 quando comparados aos valores basais.

Quando realizamos a análise dessas variáveis nos grupos RVS (G1) e não RVS (G2) [dados não mostrados], pôde-se observar que o percentual de células NK totais circulantes na semana 12 era menos expressivo em G1 do que em G2, assim como as células NK-CD56^{dim}. Em contraste, a subpopulação NK-CD56^{bright} teve elevações dos níveis (cerca de 4 vezes maior) na semana 12 dos pacientes RVS (G1), no entanto, em G2 os níveis destas células mantiveram-se inalteradas ao longo do tratamento.

Os monócitos totais tinham seus níveis mais elevados em G2 do que em G1. Monócitos clássicos inicialmente estavam em menor quantidade no sangue dos pacientes do G1, no entanto, na SEM.12, G1 tinha os valores mais elevados, com os monócitos pró-inflamatórios ocorreu o contrário, sua porcentagem era maior em G1 na SEM.0 e em SEM.12, G2 passa a apresentar maiores porcentagem no plasma.

Tabela 7 - Frequência média (%) das subpopulações de linfócitos T CD4/CD8 nos pacientes nos dois momentos (SEM.0 e SEM.12)

Variável	Media / MIN-MAX	Media / MIN-MAX
	SEM.0	SEM.12
CD4 Absoluto	722,57 (273 – 1213)	467,00 (248 – 708)
CD4 %	42,85 (27 – 53)	49,85 (42 -58)
CD8 Absoluto	446,71 (135 – 700)	219,85 (174 – 302)
CD8 %	29,85 (17-60)	23,57 (18-30)
CD3 Absoluto	1236, 43 (446 – 1913)	726,85 (435 – 1078)
CD4/CD8	1,98 (1,23 - 2,7)	2,16 (1,42 - 3,18)

CD4; CD8; CD3 (Subpopulações de linfócito T)

Os valores absolutos das subpopulações de linfócitos T (CD3/CD4/CD8) diminuíram na semana 12, no entanto sem impacto nos valores percentuais.

Na comparação de grupos RVS e não RVS (dados não mostrados), os valores de CD4 pré-tratamento, tanto absoluto quanto percentual, foram mais elevados nos pacientes não RVS do que naqueles com RVS. Contudo, na semana 12 os níveis de linfócitos T auxiliares não diferiram entre os grupos. Os linfócitos T CD8 (citotóxicos) estão mais elevados pré-tratamento em G1 quando comparado ao G2.

5 Discussão

A Hepatite C é relevante na saúde pública devida sua persistência, progressão e alta prevalência, fazendo com que grandes esforços sejam feitos em busca de tratamentos mais eficazes (YAMASAKI, 2014). Além de fatores virais como genótipo, fatores do hospedeiro também influenciam na resposta virológica, especialmente o padrão de resposta imunológica que o mesmo desenvolve, impactando na evolução da hepatite C crônica. Pesquisadores tem se dedicado a explorar os mecanismos da resposta inflamatória desencadeados durante a terapia antiviral.

I. Análise comparativa entre Grupo Infectado e Grupo Controle

Portadores crônicos do vírus C tiveram níveis aumentados de IP-10, MCP-1, MIG, RANTES, IL-8 e IL-6 quando comparados com voluntários saudáveis. Os níveis podem estar aumentados nos pacientes com VHC devido a infecção, mas também devido ao grau de fibrose avançado. Nosso grupo de pesquisa já havia associado os níveis de citocinas e quimiocinas (IP-10, MCP-1, MIG, IL-8, RANTES) entre o grupo infectado e o controle saudável, independente do grau de fibrose, segundo seus resultados os pacientes cirróticos nem sempre apresentam os níveis mais elevados quando comparados as fibroses mais baixas (MAGNONI, 2014).

Assim como nossos resultados, Tarrago et al. (2014) reportou o aumento de IL-6 em pacientes com hepatite C, Larrubia e colaboradores (2008) reportaram o aumento de RANTES, IP-10 e MIG em pacientes VHC⁺.

Os valores de IP-10 segundo Willense et al. (2014), são mais elevados em infectados pelo VHC comparado a indivíduos saudáveis. Marra e Tacke (2014) destacam que tanto níveis séricos quanto intra-hepáticos destas quimiocinas estão aumentados nos pacientes VHC, sendo relevante sua atuação na extensão da fibrose hepática induzida pelo vírus C. Neuman e colaboradores (2012) encontraram níveis de RANTES, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 e TGF- β aumentados no soro de pacientes VHC, comparando estes com grupo controle. Altos níveis de RANTES no soro comparado ao controle também foi relatado por Yoneda et al. (2011).

II. Análise comparativa entre Pacientes RVS e não RVS pré-tratamento

Segundo Yamassaki (2014), a resposta inflamatória do paciente parece influenciar na RVS e é comprovado que a produção de citocinas e quimiocinas tem importante papel nesse processo (TARRAGO et al., 2014; AMATI et al., 2002; NGUYEN et al., 2016; MAGNONI,

2014).

Nossos resultados mostram que os níveis circulantes de RANTES e IL-6 estão associados com RVS.

Os níveis de IL-6 nos pacientes que não atingiram a RVS eram mais altos do que naqueles com RVS, os baixos níveis de IL6 estão relacionados com a boa resposta ao tratamento a base de IFN (GAO; HONG; RADAIEVA; 2004), afirmando nosso resultado.

Os níveis de RANTES foram inferiores nos pacientes com sucesso a terapia quando comparado aos não RVS. Segundo Yoneda et al. (2011), RANTES (CCL5) tem sido estudada como fator preditivo de RVS, pois apresenta valores inferiores em RVS comparado aos não RVS.

Esses resultados apontam esses dois marcadores circulantes como potenciais indicadores preditivos de resposta à terapia, sendo de importância estudos mais aprofundados que permitam avaliar a sensibilidade e especificidade destes como biomarcadores.

Embora os outros parâmetros analisados não tenham apresentado significância estatística, nossos resultados seguem a mesma linha dos estudos na literatura.

Os pacientes com valores mais altos de IP-10 pré-tratamento não atingiram a RVS, já aqueles com valores mais baixos atingiram. IP-10 tem sido relatado como um possível preditor do tipo de resposta que o paciente apresentará no tratamento. Alguns trabalhos destacam que baixos níveis de IP-10 sérico pré-tratamento estão presente naqueles que atingirão a RVS (DIAGO et al., 2006; MOURA, 2008; MOURA et al., 2009; LARRUBIA et al., 2008; WILLENSE et al., 2014). Porém, se os valores de IP-10 são preditores de RVS ou não, até os dias atuais continua um tema de muita discussão.

Similarmente aos nossos achados, os estudos de Zimmermann et al. (2011) e Polyak et al. (2001) reportaram aumento de IL-8 (CXCL8) sérico em pacientes VHC+, estando este associado à progressão da doença e a não responsividade ao tratamento com IFN, embora nossos resultados mostrem níveis de IL-8 mais elevados nos NR comparado ao grupo com RVS, não se obteve associação significativa nesse período..

Quando os níveis pré-tratamento de MIG são comparados entre os grupos RVS e não RVS, não há diferença significativa nos valores (ZEREMSKI; PETROVIC; TALAL, 2007). Nossos resultados foram similares. Mesmo não tendo apresentado associação dos níveis com a RVS, pode-se observar que os não RVS tinham os valores séricos de MIG mais elevados do que os RVS.

A avaliação do nível circulante de citocinas em pacientes respondedores e não

respondedores fornece importante indicativo de interpretação de possível refratariedade à terapia com IFN/RBV (AMATI et al., 2002). O mesmo pode ser visto nos nossos resultados avaliando pacientes tratados com terapia tripla, incluindo inibidores de protease.

Atualmente, mediante a nova onda de drogas anti-VHC, livres de interferon, este padrão de análise também pode ser relevante, especialmente para determinar biomarcadores eficientes e específicos ao monitoramento dos pacientes VHC+ mediante este novo cenário de diferentes ações medicamentosas, que conseqüentemente, induzem diferentes mecanismos imunológicos e virológicos sem a interferência do IFN.

Quando os níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas são avaliadas no pré tratamento entre pacientes com fibrose 0 e 1 comparados aos portadores de fibrose 4, RANTES apresentou níveis bem similares e IL-8, MCP-1 e IP-10 estavam mais elevados em F4, no entanto, quando comparado com outros graus de fibrose pode-se observar que os F3 eram os que tinham os níveis mais expressivos (MAGNONI, 2014)

III. Análise comparativa entre Pacientes RVS e não RVS na semana 12 de tratamento

Os resultados demonstram valores superiores de RANTES e IL-8 circulantes durante o tratamento nos pacientes que não atingiram RVS.

IL-8 (CXCL8) é um importante membro da família de quimiocinas CXC. A função chave destas quimiocinas é atrair células polimorfonucleares para sítios de injúria tecidual e inflamação. IL-8 é sintetizada por vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, células de Kupffer, hepatócitos e células estreladas hepáticas. (ZIMMERMANN et al., 2011; HUANG et al., 1996; KATSOUNAS; SCHLAAK; LEMPICKI, 2011)

Já se observou uma tendência para concentrações mais elevadas de IL-8 nos pacientes não RVS em comparação com o grupo RVS (NGUYEN et al., 2016). Zimmermann et al. (2011) destaca que IL-8 pode atuar tanto como proteína quimioatrativa quanto tendo função direta pró-fibrogênica.

Monócitos pro-inflamatórios (CD14⁺/CD16⁺) são potentes produtores de IL-8, e a quantidade desta subpopulação circulante também está aumentada nos pacientes com VHC, conforme dados da tabela 6 e resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, podendo esta população celular estar contribuindo para a elevação de IL-8 (MAGNONI, 2014).

A comparação dos níveis de RANTES na SEM.0 entre os dois grupos apresentou associação significativa com a resposta virológica do paciente (p=0,04), na SEM.12 a significância foi mantida (p=0,04), os níveis de RANTES são aumentados em portadores de

hepatite C, pois as infecções virais induzem a expressão desse gene (KATSOUNAS; SCHLAAK; LEMPICKI, 2011). No entanto, durante o tratamento com PegIFN e RBV, não se associou essa quimiocina com a RVS (YONEDA et al., 2011).

Nguyen et al. (2016) relatou em seu trabalho que ocorreu um aumento dos valores séricos de MCP-1 no grupo com RVS após início da terapia antiviral com PegIFN e RBV, e no grupo NR o valor diminuiu ou se manteve estável, porém, sua análise foi realizada em pacientes coinfectados com HIV. Em nossos resultados pôde-se observar que ambos os grupos dobraram os valores dos níveis dessa quimiocina durante o tratamento quando comparados ao pré-tratamento que apresentavam valores muito próximos entre si.

Esse aumento da expressão de MCP-1 na semana 12 atinge seu pico e demonstra papel de destaque em resposta a infecção viral (RIBEIRO, 2015).

Kushner e colaboradores (2013) encontraram concentrações mais elevadas de MCP-1 em indivíduos que obtiveram resposta virológica sustentada em relação a indivíduos não respondedores.

Zeremski et al. (2015) pesquisou quimiocinas tentando identificar preditores de RVS no tratamento com PegIFN, Rbv e Telaprevir, não tendo encontrado correlação entre os níveis de IP-10 e ao padrão de resposta virológica que os pacientes desenvolveram.

IV. Análise comparativa entre Pacientes RVS pré-tratamento e na semana 12 de tratamento

Avaliando os pacientes nos dois momentos propostos no estudo, observamos que as variáveis MCP-1 e IL-6 aumentaram significativamente após 12 semanas de tratamento nos pacientes que desenvolveram RVS. Os valores de IL-6 embora tenham aumentado, ainda se mantiveram com níveis inferiores ao grupo não RVS. Segundo Tarrago et al. (2014), quando há produção aumentada nos níveis de IL-6 indica que a doença está progredindo.

Encontramos expressiva diferença (aumento) dos níveis circulantes de MCP-1 durante o tratamento quando comparado ao pré-tratamento, no entanto, não houve associação quanto ao padrão de resposta virológica sustentada.

Diferentemente, estudos de Kushner e colaboradores (2013), demonstraram que em indivíduos portadores VHC monoinfectados não houve aumento de MCP-1 no soro durante o tratamento. Segundo Moura et al. (2011), os valores da quimiocina MCP-1 (CCL2) não apresentam associação com a RVS.

Quando comparamos os valores de IP-10 pré-tratamento e após 12 semanas, os

pacientes com RVS tiveram leve queda dos valores séricos, o que já foi relatado por Butera et al., (2005), Diago et al., (2006) e Nguyen et al., (2016).

Butera et al. (2005) relata ainda que os valores séricos de MIG vão diminuindo quando há sucesso na terapia com PegIFN e RBV, o que não ocorreu em nossos resultados, pois ambos os grupos (RVS e não RVS) quase que dobraram o valor dessa quimiocina ao longo do tratamento. Todavia, isso não apresentou resultado estatisticamente significativo e os valores pós tratamento não foram analisados para que se afirme essa queda nos pacientes com RVS.

V. *Análise comparativa entre Pacientes não RVS pré-tratamento e na semana 12 de tratamento*

Comparando os dois momentos (semana 0 e 12) observamos níveis circulantes significativamente aumentados de RANTES e MCP-1 no período 12, estando associados com o tratamento.

KOMASE et al. (2013) reportaram que valores elevados de RANTES estão associados com a RVS, sendo que os não RVS apresentam valores mais baixos. Contrariamente, nossos pacientes com RVS (G1) na SEM.0 apresentaram valores inferiores aos pacientes não RVS (G2) e, embora na SEM.12 o valor dessa quimiocina tenha aumentado, os não RVS (G2) mantiveram os valores mais altos.

A quimiocina MCP-1 desempenha papel quimiotático no recrutamento de monócitos, seus níveis em pacientes não RVS durante o tratamento com PegIFN e RBV diminuem ou se mantém estáveis (NGUYEN et al., 2016). Valores aumentados desta têm sido descritos em pacientes com hepatite C com e sem RVS durante o tratamento com IFN- α (FLORHOLMEN et al., 2011). Quando comparamos os valores basais de MCP-1 e após 12 semanas do início de terapia tripla nos grupos com diferentes padrões de respostas, tivemos diferença significativa nos dois grupos (G1: $p= 0,001$ / G2: $p= 0,01$). Ambos os grupos dobraram os valores dos níveis dessa quimiocina durante o tratamento quando comparados ao pré-tratamento.

No entanto, quando esta quimiocina foi comparada com a RVS, não se teve resultado significativo estatisticamente. Considerar essa quimiocina como preditor de resposta ao tratamento não parece claro, pois alguns citam que há relação entre seus níveis e a RVS, outros não (MOURA et al., 2009).

Nos nossos resultados os valores de MIG (CXCL9) não diferiram pré e durante o tratamento, nem mesmo tiveram associação ao padrão de resposta virológica.

Moura et al. (2011) também não encontrou associação dos valores de MIG (CXCL9) com a RVS na terapia com PegIFN e RBV.

Neste estudo não observamos mudanças significativas nos níveis de IP-10 nos pacientes seguidos nos dois momentos de avaliação (semana 0 e 12), assim como não houve associação com a RVS. Os pacientes não RVS apresentaram níveis mais elevados nos dois períodos.

Durante a terapia com PegIFN e RBV há relatos de que IP-10 (CXCL10) está inversamente relacionada com a resposta ao tratamento, ou seja, quando seus níveis apresentam-se elevados é indício de não RVS (MOURA et al., 2011).

Contudo, se a contribuição de IP-10 é preditor de RVS permanece atualmente sem consenso. Moura e colaboradores (2009) relatam que valores alterados de IP-10 são também preditores de inflamação hepática e fibrose.

VI. Dados descritivos de resposta celular dos Pacientes nos períodos pré-tratamento e na semana 12 de tratamento

A terapia com PegIFN+RBV em paciente com VHC parece induzir aumento da frequência de subpopulações de monócitos pró-inflamatórios e NK-CD56^{bright} e, conseqüentemente, diminuição de monócitos clássicos, NKs totais e NKCD56^{dim}. Embora o número de pacientes incluídos nesta avaliação seja pequeno, foi possível observar este padrão.

Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, observamos resultados semelhantes ao nosso (MAGNONI, 2014).

Outra observação refere-se à associação de altos níveis de células NK CD56^{bright} e monócitos pro-inflamatórios com a severidade da fibrose hepática, havendo correlação destas com os diferentes graus de fibrose (MAGNONI, 2014).

Quanto às subpopulações de linfócitos T, alterações foram observadas nos valores absolutos, havendo redução de todas as subpopulações durante a terapia tripla.

Há evidências que células-T CD4+ e CD8+ específicas para o VHC desempenham papel importante no controle da replicação viral e na lesão hepática. (THIMME et. al., 2006). As células-T CD8+ atuam na tentativa de eliminar a infecção induzindo a apoptose (morte programada) da célula-alvo que na hepatite C são os hepatócitos (MOURA et al., 2009; MESQUITA JUNIOR et al., 2010).

Nossos resultados mostraram os linfócitos T CD8+ mais expressivos no grupo RVS do que no grupo não RVS na SEM.0 (dados não mostrados), o que evidencia uma resposta mais

eficaz desse perfil de linfócitos na eliminação de hepatócitos infectados.

No pré tratamento as citocinas IL-6 e RANTES foram associadas com a RVS, os níveis de ambos eram diminuídos no grupo que atingiu RVS, mostrando que os pacientes do grupo não RVS podem apresentar uma resposta inflamatória mais intensa. Durante o tratamento com terapia tripla as quimiocinas IL-8 e RANTES estão associadas com a RVS, os níveis de IL-8 provavelmente são induzidos devido ao uso de IFN pois na terapia com PegIFN já haviam relatos de elevação dos seus níveis no tratamento.

Pode haver indução ao aumento dos níveis de RANTES com o tratamento em regime triplo pois seus níveis foram associados com a RVS durante o tratamento (SEM.12) e também quando comparando as semanas 0 e 12 de tratamento no grupo não RVS. No tratamento baseado em PegIFN e RBV, não há relatos dessas associações, dando ênfase a nossa hipótese.

A quimiocina MCP-1 está associada ao tratamento independente da resposta virológica que o paciente tem, esta associação pode estar relacionada ao uso de IFN que induz seu aumento durante as terapias antivirais.

Durante a execução desse projeto, novas opções de tratamento “IFN free” se tornaram disponíveis fazendo com que o tratamento aqui avaliado deixasse de ser utilizado em pacientes com hepatite C crônica, com isso essa interferência que talvez o IFN cause na resposta inflamatória durante o tratamento antiviral agora passa a não existir, assim, a resposta inflamatória durante o tratamento poderá agora ser melhor compreendida.

6 Conclusão

1. Há diferença nos níveis de citocinas/quimiocinas e células nas SEM.0 e SEM.12.
2. Os níveis das citocinas/quimiocinas são aumentados em pacientes com VHC comparados ao controle.
3. Níveis de Citocinas (sem 0 e/ou 12) e RVS ou não RVS
 - i. Os níveis de IL-6 e RANTES na SEM.0 estão associadas com a RVS
 - ii. Os níveis de RANTES e IL-8 na SEM.12 estão associadas com a RVS no tratamento com terapia tripla.
 - iii. Níveis de IL-6 nos pacientes com RVS apresentam associação com o tratamento em regime triplo.
 - iii. Níveis de MCP-1 apresentam associação com o tratamento triplo independente da resposta que o paciente desenvolve.
 - iv. Níveis de RANTES nos pacientes não RVS apresentam elevação dos níveis na SEM 12 associado ao tratamento em regime triplo.
4. As subpopulações de Linfócitos T CD4, CD8 e CD3 diminuem durante o tratamento triplo, assim como células NK totais, NK CD56^{dim}, monócitos totais e clássicos. As células NK^{bright} e os monócitos pró inflamatórios aumentam.

Referências

EASL Clinical Practice Guidelines: management of hepatitis C virus infection. **J. Hepatol.**, v.60, p. 392-420, 2013.

EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C. **J. Hepatol.**, v.63, n.1, p.199-236, 2015.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. Tradução Claudia Reali. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALVARIZ, F. G. Hepatite C crônica: história natural. **Rev. Hosp. Univ. Pedro Ernesto**, v. 5, n. 1, p. 35-48, 2006.

AMATI, L. et al. Modifications of the Immune Responsiveness in Patients with Hepatitis C Virus Infection following Treatment with IFN- α / Ribavirin. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, p. 981-993, 2002.

ANDRADE, S. M. J. **Envolvimento de diferentes subpopulações de células T e células NK na resposta imune à infecção pelo vírus da Hepatite C**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da vida) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

ARAUJO, A. R. S. **Caracterização da resposta imune adaptativa ao HCV de pacientes com Hepatite C Crônica antes e durante o tratamento com Interferon Alfa e Ribavirina**. 2010. 110 f. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

ARAUJO, A. R. et al. Dual role of IL-12 in the therapeutic efficacy or failure during combined PEG-Interferon- α 2A and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. **Immunol. Lett.**, v. 154, n. 1-2, p. 61-69, 2013.

ARONSOHN, A.; JENSEN, D. Interferon-combination strategies for the treatment of chronic hepatitis C. **Semin. Liver Dis.**, v. 34, n. 1, p. 30-36, 2014.

AZEVEDO, R. G.; KOMNINAKIS, S. Considerações sobre o tratamento concomitante do vírus da Hepatite c (HCV) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em pacientes

coinfectados HIV/HCV. **Tendências HIV**, v. 9, n. 1, p. 10-12, 2014.

BACON, B. R. et al. Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 364, p. 1207-1217, 2011.

BARBOSA, K. V. B. D. **Aspectos fenotípicos celulares de leucócitos circulantes em portadores de Hepatite C crônica com ou sem insuficiência renal crônica**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado em Gastroenterologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

BRONOWICKI, J. P. et al. Safety of telaprevir or boceprevir in combination with peginterferon α /ribavirin in cirrhotic nonresponders. First results of the French Early Access Program (ANRS CO20-CUPIC). **Gastroenterol. Hepatol.**, v. 8, n. 6, suppl. 3, p. 1-20, 2012.

BUTERA, D. et al. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1175-1182, 2005.

CACCIARELLI, T. V. et al. Immunoregulatory cytokines in chronic hepatitis C virus infection: pre- and posttreatment with interferon alfa. **Hepatology**, v. 24, n. 1, p. 6-9, 1996.

CAMPELO, D. I. V. F. **Varição genética do TNF- α e a resposta à terapêutica da Hepatite C Crônica**. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) – Universidade de Lisboa, Lisboa, 2013.

CAMPIOTTO S. et al. Geografic distribution of hepatitis C vírus genotypes in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2005; 38(1):41-9.

CARRION, A. F.; GUTIERREZ, J.; MARTIN, P. New antiviral agents for the treatment of hepatitis C: ABT-450. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 15, n. 5, p. 711-716, 2014.

CCL5 C-C motif chemokine ligand 5 [*Homo sapiens* (human)]. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352>>. Acesso em: 06 jun. 2016.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON,

M.. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.

CIMINI, E. et al. In vivo Interferon alpha /Ribavirin treatment modulates Vg9Vd2t cell function during chronic HCV infection. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 33, n. 3, 2013. doi: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jir.2012.0050>

COCO, B. et al. Triple therapy with first-generation protease inhibitors for patients with genotype 1 chronic hepatitis C: recommendations of the Italian Association for the Study of the Liver (AISF) - Review article. **Dig. Liver Dis.**, v. 46, p. 18-24, 2014.

CROWFORD, A. et al. A role for the chemokine RANTES in regulating CD8 T cell responses during chronic viral infection. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 7, p. e1002098, 2011.

CRUZ, A. A. A. **Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de transcriptase reversa e protease em variantes HIV presentes em pacientes coinfectados pelo VHC**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento-Biotecnologia Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2014.

DESHMANE, S. L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DIAGO, M. et al. Association of pretreatment serum interferon γ inducible protein 10 levels with sustained virological response to peginterferon plus ribavirin therapy in genotype 1 infected patients with chronic hepatitis C. **Gut**, v. 55, n. 3, p. 374-379, 2006.

EGESTEN A. et al. The CXC chemokine MIG/CXCL9 is important in innate immunity against streptococcus pyogenes. **J. Infect. Dis.**, v. 195, n. 5, p. 684-693, 2007.

FALCONER, K. et al. IP-10 predicts the first phase decline of HCV RNA and overall viral response to therapy in patients co-infected with chronic hepatitis C virus infection and HIV. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 42, n. 11-12, p. 896-901, 2010.

FALLAHI, P. et al. Cytokines and HCV-related disorders. Clinical and developmental immunolog. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, id 468107, p. 1-10, 2012.

FARCI, P. et al. Profibrogenic chemokines and viral evolution predict rapid progression of hepatitis C to cirrhosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 109, n. 36, 14562-14567, 2012.

FLORHOLMEN, J. et al. A rapid chemokine response of macrophage inflammatory protein (MIP)-1a, MIP-1b and the regulated on activation, normal T expressed and secreted chemokine is associated with a sustained virological response in the treatment of chronic hepatitis C. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 204-209, 2011.

GARCIA, T. J. et al. Efeitos colaterais do tratamento da hepatite C no polo aplicador do ABC. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 58, n. 5, p. 543-549, 2012.

GAO, B.; HONG, F.; RADAIEVA, S. host factors and failure of interferon-alfa treatment in HCV. **Hepatology**, v. 39, n. 4, p. 880-890, 2004.

GIANNINI, C., BRÉCHOT, C. Hepatitis C virus biology. **Cell Death Differ.** 2003(10):S27-38.

HABERSETZER, F. et al. A Poxvirus vaccine is safe, induces t-cell responses, and decreases viral load in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 141, n. 3, p. 890-899, 2011.

HENRIQUES, A. C. E. S. **Infecção pelo vírus da hepatite C – Diversidade genética e estudo molecular de mediadores da resposta imune.** 2012. 169 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

HORNER, S. M. Activation and evasion of antiviral innate immunity by hepatitis C virus. **J. Mol. Biol.**, v. 426, p. 1198-1209, 2014.

HUANG, Y. S. et al. Serum levels of interleukin-8 in alcoholic liver disease: relationship with disease stage, biochemical parameters and survival. **J. Hepatol.**, v. 24, n. 4, p. 377-384, 1996.

INGLOT, M. et al. Cytokine assessment in untreated hepatitis C virus infected patients and during interferon alpha+ribavirine therapy. **WIAD Lek.**, v. 61, n. 1-3, p. 13-18, 2008.

IRVING, W. L. Hepatitis C virus, infection and immunity. In: DELVES, P. J. (Ed.). **Encyclopedia of immunology**. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 1998. p. 1079-1081.

JACOBSON-BROWN, P. M.; NEUMAN, M. G. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. **Clin. Biochem.**, v. 34, n. 3, p. 167-171, 2001.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Natural killer cells and immune surveillance. **J. Pediatr.**, v. 84, n. 4, p. S58-S67, 2008.

KATSOUNAS, A.; SCHLAAK, J. F.; LEMPICKI, R. A. CCL5: a double-edged sword in host defense against the hepatitis C virus. **Int. Rev. Immunol.**, v. 30, n. 5-6, p. 366-378, 2011.

KIDD, P. Th1/Th2 Balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Altern. Med. Rev.**, v. 8, n. 3, p. 223-246, 2003.

KOMASE, K. et al. Serum RANTES level influences the response to pegylated interferon and ribarivin therapy in chronic hepatitis C. **Hepatol. Res.**, v. 43, p. 865-875, 2013.

KUSHNER, L. et al. Immune biomarker differences and changes comparing HCV mono-infected, HIV/HCV co-infected, and HCV spontaneously cleared patients. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60387, 2013.

LARRUBIA, J. R. et al. Role of chemokines and their receptors in viral persistence and liver damage during chronic hepatitis C virus infection. **World J. Gastroenterol.** V. 14, n. 47, p. 7149-7159, 2008.

LEMOINE, M.; THURSZ, H. Hepatitis C, a global issue: access to care and new therapeutic and preventive approaches in resource-constrained areas. **Semin. Liver Dis.**, v. 34, n. 1, p. 89-97, 2014.

LI, k. et al. Activation of chemokine and inflammatory cytokine response in hepatitis C virus–infected hepatocytes depends on toll-like receptor 3 sensing of hepatitis c virus double-stranded RNA intermediates. **Hepatology**, v. 55, n. 3, p. 666-675, 2012.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAGNONI, M. S. **Perfil imunofenotípico e nível de citocinas plasmáticas de portadores de Hepatite C crônica com diferentes graus de comprometimento hepático.** 2014. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Médica) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 2014.

MARRA, F.; TACKE, F. Roles for chemokines in liver disease. **Gastroenterology**, v. 147, n. 3, p. 577-594, 2014.

MELLO, C. E. B. Tratamento da hepatite crônica pelo vírus C: novas perspectivas. **JBM**, v. 102, n. 1, p. 23-32, 2014.

MELO, L. O. R.; MONTEIRO, D. L. M.; RODRIGUES, N. C. P. Factors associated with treatment interruption for hepatitis C. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 60, n. 1, p. 29-34, 2014.

MESQUITA JUNIOR, D. et al . Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 50, n. 5, p. 552-580, 2010.

MOREIRA, S. T. **Influência de polimorfismos em genes de citocinas e de receptores de citocinas na resposta ao tratamento e no grau do dano hepático em pacientes portadores de Hepatite C Crônica.** 2012. 119 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MOURA, A. S. **Marcadores inflamatórios solúveis como preditores de alterações histológicas hepáticas e resposta terapêutica na infecção crônica pelo vírus da Hepatite C.** 2008. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical) –

Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

MOURA, A. S. et al. Soluble inflammatory markers as predictors of hepatocellular damage and therapeutic response in chronic hepatitis C. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 5, p. 375-382, 2009.

MOURA, A. S. et al. Soluble inflammatory markers as predictors of virological response in patients with chronic hepatitis C virus infection treated with interferon- α plus ribavirin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 38-43, 2011.

NELSON, D. R. et al. Long-term Interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. **Hepatology**, v. 38, n. 4, p. 859-869, 2003.

NEUMAN, M.G. et al. Markers of inflammation and fibrosis in alcoholic hepatitis and viral hepatitis C. **Int. J. Hepatol.**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

NGUYEN, T. T. et al. Cytokine response associated with hepatitis c virus clearance in hiv coinfecting patients initiating peg interferon- α based therapy. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v. 8, n. 1, p. e2016003, 2016.

PILERI, P. et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**. 1998;282:938-41.

POLYAK, S. J. et al. Elevated levels of interleukin-8 in serum are associated with hepatitis C virus infection and resistance to interferon therapy. **J. Virol.**, v. 75, p. 6209-6211, 2001.

POLYAK, S.J. Hepatitis C virus-cell interactions and their role in pathogenesis. **Clin Liver Dis**. 2003;7:67-88.

RIBEIRO, I. G. **Aspectos clínico-laboratoriais, perfil de quimiocinas e micropartículas circulantes em pacientes portadores da infecção crônica pelo VHC antes e durante a terapia tripla**. 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2015.

SEMMO, N.; KLENERMAN, P. CD4+ T cell responses in hepatitis C virus infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, n. 36, p. 4831-4838, 2007.

SILVA, G. F. et al. Peginterferon plus ribavirin and sustained virological response rate in HCV-related advanced fibrosis: a real life study. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 18, n. 1, p. 48-52, 2014.

SMITH D.B. et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. **Hepatology** 2014; 59: 318-327.

SOFIAN, M. et al. Serum prolife of T helper 1 and T helper 2 cytokines in hepatitis C virus infected patients. **Hepat. Mon.**, v. 12, n. 12, p. e6156, 2012.

SPAAN, M. CD4+CXCR5+ T cells in chronic HCV infection produce less IL-21, yet are efficient at supporting B cell responses. **J. Hepatol.**, v. 62, p. 303-310, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CLÍNICA MÉDICA. **Hepatite C crônica**: tratamento. 2011. 15 p. Disponível em: <<http://sbn.org.br/app/uploads/35-Hepatite.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2016.

TARRAGÔ, A. M. et al. Combined impact of hepatitis C virus genotype 1 and interleukin-6 and tumor necrosis factor- α polymorphisms on serum levels of pro-inflammatory cytokines in Brazilian HCV-infected patients. **Hum. Immunol.**, v. 75, p. 1075-1083, 2014.

THIMME, R.; LOHMANN, V.; WEBER, F. A target on the move: Innate and adaptive immune escape strategies of hepatitis C vírus. **Antiviral Res.**, v. 69, p. 129-141, 2006.

TRAPERO, M. et al. Maintenance of T1 response as induced during PEGIFNalpha plus ribavirin therapy controls viral replication in genotype-1 patients with chronic hepatitis C. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, v. 97, p. 481-490, 2005.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas, interleucinas, interferons, resposta imuno-

lógica. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

VISO, A. T. R. **Hepatite C crônica e citocinas: estudo no soro e no fígado.** 2007. 211 f. Tese (Doutorado em Ciências – Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

WATANABE, C. M. **Avaliação da infecção de megacariócitos e plaquetas pelo VHC e sua influência na fisiopatologia da hepatite C.** 2016. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento – Biotecnologia Médica) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

WILLENSE, S. B. et al. IP-10 in chronic hepatitis C patients treated with high-dose interferon. **Neth. J. Med.**, v. 72, n. 8, p. 407-415, 2014.

WEI, X. et al. Inhibition of hepatitis C virus infection by interferon- γ through downregulating claudin-1. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 29, n. 3, p. 171-178, 2009.

World Health Organization - WHO. GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON VIRAL HEPATITIS, 2016–2021. 56p. June, 2016

Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?ua=1>

YONEDA, S. et al. Serum chemokine levels are associated with the outcome of pegylated interferon and ribavirin therapy in patients with chronic hepatitis C. **Hepatol. Res.**, v. 41, n. 6, p. 587-593, 2011.

YAMASAKI, L. H. T. **Pirosequenciamento de alta cobertura da região hipervariável 1 do vírus da hepatite C.** 2014. 23 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – UNESP, São José do Rio Preto, 2014.

ZEREMSKI, M.; PETROVIC, L. M.; TALAL, A. H. The role of chemokines as inflammatory mediators in chronic hepatitis C virus infection. **J. Viral Hepat.**, v. 14, p. 675-687, 2007.

ZEREMSKI, M. et al. Intrahepatic and peripheral CXCL10 expression in Hepatitis C virus-infected patients treated with Telaprevir, Pegylated Interferon, and Ribavirin. **J. Infect. Dis.**,

v. 211, n. 11, p. 1795-1799, 2015.

ZHANG, L. et al. Role of Th1/Th2 cytokines in serum on the pathogenesis of chronic hepatitis C and the outcome of interferon therapy. **Genet. Mol. Res.**, v. 13, n. 4, p. 9747-9755, 2014.

ZIMMERMANN, H. W. et al. Interleukin-8 Is Activated in Patients with Chronic Liver Diseases and Associated with Hepatic Macrophage Accumulation in Human Liver Fibrosis.

PLoS One, v. 6, n. 6, p. e21381, 2011.