

**Universidade Estadual Paulista - UNESP**

Faculdade de Medicina de Botucatu

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica

*Natália Bronzatto Medolago*

**Análise de Associações de  
Polimorfismos HPA, Indicadores de  
Autoimunidade e Manifestações  
Reumatológicas na Hepatite C**

**Botucatu  
2013**

*Natália Bronzatto Medolago*

**Análise de Associações de  
Polimorfismos HPA, Indicadores de  
Autoimunidade e Manifestações  
Reumatológicas na Hepatite C**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: **Prof. Dr. Giovanni Faria Silva**

**Botucatu  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Medolago, Natália Bronzatto.

Análise de associações de polimorfismos HPA, indicadores de autoimunidade e manifestações reumatológicas na Hepatite C / Natália Bronzatto Medolago. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Giovanni Faria Silva

Capes: 40000001

1. Hepatite C. 2. Polimorfismo (Genética). 3. Antígenos na hepatite.  
4. Plaquetas (Sangue). 5. Reumatologia. 6. Autoimunidade.

Palavras-chave: Hepatite C crônica; manifestações reumatológicas; Antígeno Plaquetário Humano.

*Dedicatória*

Aos meus pais, NATALINO AUGUSTO MEDOLAGO e NORMA DE F. B. MEDOLAGO, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os trilhasse sem medo, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. A vocês não bastaria dizer, que não tenho palavras para agradecer, mas é o que acontece agora, quando procuro arduamente uma forma verbal de exprimir uma emoção ímpar, que jamais seria traduzida por palavras.

# *Agradecimientos*

Primeiramente, a DEUS, por iluminar meu caminho, pela sabedoria e proteção.

Ao meu eterno mestre e a quem tenho grande admiração, Prof. Dr. GIOVANNI FARIA SILVA, pela orientação, ensinamentos, amizade, apoio, conselhos, confiança e por ter ajudado a trilhar meu caminho profissional.

Aos colaboradores deste trabalho, Dr. OSWALDO MELO DA ROCHA e Dra. ADRIANA CAMARGO FERRASI, pelo grande incentivo, confiança, ensinamentos, companheirismo, descobertas, apoio e amizade.

À minha família: CESAR AUGUSTO B. MEDOLAGO e LUCAS B. MEDOLAGO (irmãos); CATHARINA S. MEDOLAGO e JOANA M. A. BRONZATTO (avós); tios e primos queridos, pela ternura, apoio, motivação e orações.

Aos PACIENTES que, voluntariamente, participaram do estudo.

À enfermeira MARI NILCE PERES, pela amizade, compreensão e grande ajuda na coleta de dados.

À DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA E NUTRIÇÃO da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, em especial aos amigos Dra. LÍGIA YUKIE SASSAKI, Dr. FERNANDO GOMES ROMEIRO, Dr. FÁBIO DA SILVA YAMASHIRO pelo incentivo, confiança, colaboração e amizade.

Ao LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO HEMOCENTRO - DIVISÃO DA FMB, em especial à Dra. MARIA INÊS DE MOURA CAMPOS PARDINI e às biomédicas ALINE GALVANI e JAQUELINE GIAXA NAVA pela grande colaboração e aprendizado.

A toda equipe da UNIDADE DE PESQUISA CLÍNICA - UPECLIN/FMB/UNESP em especial, à enfermeira MÁRCIA TONIN RIGOTTO CARNEIRO, Dr. CARLOS ANTONIO CARAMORI, JULIANA CONEGLIAN e MÔNICA DE PAULA pelo apoio e amizade.

Às enfermeiras MARIANA NERES VULCANO, YARA BARCOS, VANESSA NOGUEIRA e à bióloga FERNANDA WINCKLER, pela ajuda na coleta de dados.

Ao LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DO HC/FMB/UNESP, em especial à RITA DE CÁSSIA SIQUEIRA BRUDER, MARIA SALETE SARTORI e Dra. ADRIANA POLACHINI DO VALLE.

Aos colegas da secretaria do DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA-FMB/UNESP, em especial ao colega MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, pela editoração da dissertação.

Aos amigos: TAÍSA A. MEDOLAGO, ALINE R. DANAGA, FLÁVIA P. CEREZER, MARIANA G. DIGNANI, JULIANE ANDRADE, LEONARDO TOHI (*IN MEMORIAN*), GABRIELA V. ALBIERI, CLÁUDIA CYRINO, MARCELLA MANGILLI, FERNANDO CARNIETTO, FERNANDO MORETTO, FERNANDA BOLFI, ANDREA A. P. BATISTA pela eterna amizade e por compreenderem minhas ausências.

Aos PROFESSORES de toda minha vida, pela paciência, doação, conhecimento e sabedoria transmitidos, o meu eterno obrigado.

A TODOS que contribuíram de alguma forma para a realização desse estudo e que, involuntariamente, eu possa ter esquecido de mencionar.



# *Sumário*

Lista de Tabelas .....	iv
Lista de Figuras .....	vi
Lista de Abreviaturas.....	viii
Introdução .....	1
Justificativa .....	10
Hipótese .....	12
Objetivos .....	14
Material e Método.....	16
Resultados .....	25
Discussão.....	34
Conclusões.....	39
Referências .....	41
Anexos .....	49

## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 1 -</b>	Sequência de primers utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e -5.....	23
<b>Tabela 2 -</b>	Características clínicas e demográficas da população com VHC.....	26
<b>Tabela 3 -</b>	Associação de manifestações gerais e clínicas com manifestações reumatológicas .....	27
<b>Tabela 4 -</b>	Distribuição de anti-CCP na população de acordo com a presença de MR .....	28
<b>Tabela 5 -</b>	Distribuição de FR na população de acordo com a presença de MR .....	28
<b>Tabela 6 -</b>	Positividade de anti-CCP e FR na população e diagnóstico de AR .....	29
<b>Tabela 7 -</b>	Frequências alélicas e genotípicas para HPA-1, HPA-3, HPA-5 em pacientes infectados com VHC (n= 159) .....	29
<b>Tabela 8 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-1 e sexo feminino (n= 72) .....	30
<b>Tabela 9 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-1 e sexo masculino (n= 87) .....	30
<b>Tabela 10 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-3 e sexo feminino (n= 72) .....	31
<b>Tabela 11 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-3 e sexo masculino (n= 87) .....	31
<b>Tabela 12 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-5 e sexo feminino (n= 72) .....	32
<b>Tabela 13 -</b>	Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-5 e sexo masculino (n= 87) .....	32
<b>Tabela 14 -</b>	Análise de associação: frequências genotípicas e anticorpos anti-ccp .....	33

## *Lista de Figuras*

<b>Figura 1</b> - Complexos de glicoproteínas da membrana da plaqueta contendo epitopos de aloantígenos plaquetários (Modificado de McFarland, 1998) .....	8
<b>Figura 2</b> - Distribuição de manifestações reumatológicas na população .....	27
<b>Figura 3</b> - Prevalência de manifestações reumatológicas conforme o sexo .....	28

# *Lista de Abreviaturas*

**ACR:** Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology*)

**anti-CCP:** anti-peptídeo citrulinado cíclico (*anti-cyclic citrullinated peptide*)

**anti-ENA:** Antígenos Nucleares Extraíveis (*extractable nuclear antigens*)

**anti-VHC:** antivírus da Hepatite C

**AR:** artrite reumatóide

**CA:** Califórnia (*California*)

**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**EDTA:** ácido etilendiamino tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

**ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

**EUA:** Estados Unidos da América

**EULAR:** Liga Europeia contra o Reumatismo (*The European League Against Rheumatism*)

**FR:** fator reumatóide

**GP:** glicoproteína

**HIV:** vírus da imunodeficiência adquirida (*human immunodeficiency virus*)

**HLA:** antígeno leucocitário humano (*human leucocyte antigen*)

**HPA:** antígeno plaquetário humano (*human platelet antigen*)

**IgA:** imunoglobulina A

**IgG:** imunoglobulina G

**IgM:** imunoglobulina M

**METAVIR:** Escore de Lesões (estudos de 10 patologistas especialistas em hepatologia, Paris, 1993)

**MR:** manifestação reumatológica

**NC:** Carolina do Norte (*North Carolina*)

**PCR-RFLP:** (*Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism*)

**PCR-SSP:** (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*)

**pH:** potencial hidrogeniônico

**RNA:** ácido ribonucleico

**TCLE:** termo de consentimento livre e esclarecido

**USA:** Estados Unidos da América (*United States of America*)

**VHA:** vírus da Hepatite A

**VHB:** vírus da Hepatite B

**VHC:** vírus da Hepatite C



*Resumo*

A Hepatite C tem sido associada a várias manifestações extra-hepáticas como comprometimento articular. Em 90 pacientes VHC positivos, foram encontradas manifestações reumatológicas em 31%. A artralgia é mais comum, porém a artrite aparece em 4% dos casos. Clinicamente, a artrite relacionada ao VHC, pode ser indistinguível da artrite tradicional e a maioria dos doentes cumprem com os critérios diagnósticos para a doença preconizados pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), tornando-se um desafio diagnóstico. O fator reumatóide e as crioglobulinas são os autoanticorpos mais presentes em cerca de 40% a 70% dos pacientes com VHC, portanto não auxiliam no diagnóstico diferencial. Anticorpos antipeptídeo citrulinado cíclico (anti-ccp), são considerados anticorpos com grande especificidade e sensibilidade para AR, assim, são capazes de distinguir artrite relacionada ao vírus e AR. Fatores genéticos do hospedeiro também foram associados à infecção pelo VHC, como os polimorfismos dos antígenos plaquetários humanos (HPAs). A avaliação de polimorfismos genéticos pode ser útil na identificação de maior suscetibilidade dos indivíduos infectados ao desenvolvimento de manifestações reumatológicas e/ou de alguns desses serem indicativos de um curso mais grave da doença. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar possíveis associações de indicadores de autoimunidade e polimorfismos do HPA com manifestações reumatológicas em pacientes com Hepatite C. Realizamos avaliação clínica mediante consulta com o doente e levantamento em prontuário, coletas e armazenagem de amostras sanguíneas para genotipagem dos HPAs -1 e -3 pela técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*), HPA -5 pela técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism*), obtenção de valores de fator reumatóide por aglutinação do látex e anti-ccp pelo teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). O tamanho amostral de 160 indivíduos foi determinado pela fórmula de Fisher e Belle, utilizando-se intervalo de confiança de 95%, precisão de 7% e uma proporção de 31% dos infectados com vírus C que apresentam manifestações reumatológicas. As variáveis categóricas foram analisadas através de tabelas de frequências absolutas e relativas. Nas variáveis contínuas utilizou-se estatística descritiva. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão ou mediana (incluindo quartil

superior e quartil inferior). Para avaliar estatisticamente os resultados obtidos, realizou-se teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ), teste exato de Fisher e teste-t para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de 5%. Foram avaliados 159 pacientes com Hepatite C crônica. Destes, 88 (55,3%) eram homens e 71 (44,7%) mulheres com média de idade de 49,1 anos. Manifestações reumatológicas não atribuídas à coexistência de outras doenças autoimunes foram observadas em 114 (71,7%) indivíduos e mais prevalentes foram artralgia (36%), mialgia (32%), fenômeno de Raynald (29%), sensações parestésicas (29%), fraqueza muscular (27%), dor lombar (18%), alterações cutâneas (14%), artrite (11%), outras (9%) e nódulo subcutâneo (2%). A análise genética constatou associação entre frequência alélica e manifestações reumatológicas para o HPA-5 na população geral. Nas análises individuais para os sexos, o resultado manteve-se para o HPA-5 e sexo masculino. No entanto, para o sexo feminino foram encontradas associações de manifestações reumatológicas com o alelo HPA-3a e genótipos HPA-3a3a e HPA-1a1a, não observadas no sexo masculino. O estudo mostrou, de maneira inédita, as possíveis associações entre manifestações reumatológicas, indicadores de autoimunidade e polimorfismos HPA-1, -3 e -5, que podem predispor seus portadores a complicações no curso da Hepatite C.

*Abstract*

Hepatitis C has been associated with various extrahepatic manifestations such as joint involvement. In 90 HCV positive patients, rheumatological manifestations were found in 31%. Arthralgia is the most common, however the arthritis appears in 4% of the cases. Clinically, HCV related to arthritis may be indistinguishable from RA, since the majority of patients fulfilling the criteria of the American College of Rheumatology for the diagnosis of RA, making it diagnostic challenge. The rheumatoid factor and crioglobulines may be present in about 40 to 70% of patients with chronic HCV, which does not help in the differential diagnosis. The cyclic citrullinated peptide antibodies (anti-CCP) are considered good markers for RA, due to their high specificity and sensitivity, they can be useful in distinguishing between HCV arthritis and RA. The genetic factors of the host were also related to virus C infection like polymorphisms of human platelet antigens (HPAs). The evaluation of these genetic polymorphisms may reflect greater susceptibility to rheumatological manifestations and/or one of them be indicative of a more severe disease. So the goal of this study was evaluate possible associations of autoimmunity indicators and HPA polymorphisms with rheumatological manifestations in patients with Hepatitis C. We performed clinical evaluation by appointment and survey in medical chart, collection and storage of blood samples for genotyping of HPA- 1 and -3 by PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers), HPA-5 by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism), obtaining values of rheumatoid factor by latex agglutination and anti-ccp by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). The sample size of 160 subjects was determined by Fisher and Belle formula, using a confidence interval of 95%, accuracy of 7% and a ratio of 31% infected with hepatitis C who have rheumatological manifestations. Categorical variables were analyzed through tables of absolute and relative frequencies. For continuous variables it used descriptive statistics. Values are presented as average (standard deviation) or median (including the top quartile and bottom quartile). To statistically evaluate the results, we carried out the chi-square test, Fisher's exact test and t-test for independent samples. The significance level adopted was 5%. One hundred and fifty-nine patients with chronic Hepatitis C were evaluated. Of these patients, 88

(55.3%) were men and 71 (44.7%) were women, with a mean age of 49.1 years. Rheumatological manifestations not attributable to the coexistence of other autoimmune diseases were observed in 114 (71.7%) individuals and the most prevalent were arthralgia (36%), myalgia (32%), Raynaud's phenomenon (29%), paresthetica sensations (29%), muscle weakness (27%), back pain (18%), cutaneous disorders (14%), arthritis (11%), other like bursitis and tenosynovitis (9%), and subcutaneous nodule (2%). Genetic analysis showed an association between allelic frequency for rheumatologic manifestations and HPA-5 in the general population. In individual analyzes for the sexes, the result remained for HPA-5 and male. However, for women, associations were found between rheumatological manifestations and allele HPA-3a and genotypes HPA-3a3a and HPA-1a1a, not observed in men. The study showed, in an unprecedented way, the possible associations between rheumatological manifestations, indicators of autoimmunity and polymorphisms HPA-1, -3 and -5 which may predispose the patients to suffer complications in the course of hepatitis C.

# *Introdução*

## Infecção pelo Vírus da Hepatite C

Hepatite é um termo que designa inflamação no fígado, sendo causada por diversos mecanismos, principalmente agentes infecciosos. Uma grande variedade de vírus causa as chamadas hepatites virais: A, B, C, D e E.<sup>1</sup>

Em 1975, demonstrou-se, pela primeira vez, que a maioria dos casos de hepatites associados à transfusão não eram causados pelos vírus da Hepatite A (VHA) ou da Hepatite B (VHB). Essa forma da doença ficou conhecida como Hepatite não-A não-B até 1989, quando o vírus foi identificado, clonado e nomeado de vírus da Hepatite C (VHC).<sup>1</sup>

O VHC é um vírus cujo genoma é constituído por uma fita simples de RNA, pertencente à família *Flaviviridae*. Sua alta atividade replicativa associada à ausência de atividade de reparo, conduz a uma alta frequência de mutações. Esta heterogeneidade no genoma permite a distinção de seis genótipos designados por números (1, 2, 3, 4, 5 e 6), diversos subtipos, representados por letras do alfabeto (1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4a, 5a e 6a) e muitas *quasispecies*.<sup>2</sup>

Estudos vêm demonstrando que a resposta à terapia antiviral está associada ao genótipo do vírus, de forma que a genotipagem do VHC é uma importante ferramenta na prática clínica. Pacientes portadores de genótipos 2 e 3 apresentam maior chance de erradicar a infecção (80%) do que aqueles com genótipo 1 (50%).<sup>2</sup>

Atualmente, a infecção pelo VHC tem importante impacto pessoal, social e econômico no mundo. Estima-se que mais de 170 milhões de pessoas são acometidas pela forma crônica da doença e que 3 a 4 milhões são infectadas anualmente, tornando-se a maior causa de doença hepática, cirrose e hepatocarcinoma.<sup>1, 3,4</sup>

A prevalência e incidência da infecção pelo VHC apresentam variações geográficas e temporais. Doadores de sangue é o principal grupo onde a prevalência é estudada. No Reino Unido, Escandinávia, América do Norte, Europa Ocidental, Austrália, em alguns países da América Central e do Sul, e em algumas regiões da África, as taxas variam de 0,1 a 5%. No Egito e na Líbia são maiores que 5%.<sup>5</sup>



No Brasil, as variações de soropositividade podem ocorrer de 1 a 2,6% em diferentes regiões do país e possivelmente, podem ser explicadas pelas diferenças na frequência e extensão da transmissão do VHC por diferentes fatores de risco.<sup>5</sup> Em 1998, Focaccia et al estudaram amostras populacionais da cidade de São Paulo e verificaram uma prevalência de 1,42%. Um recente estudo realizado com indivíduos de diferentes municípios do estado de São Paulo obteve uma prevalência da infecção de 0,7%.<sup>6,7</sup>

## História Natural da Hepatite C

A história natural da Hepatite C ainda não é totalmente conhecida. Há uma grande dificuldade em definir dados prospectivos, início da infecção e a multiplicidade de cofatores que podem influenciar na progressão da doença.<sup>5,3</sup>

A Hepatite C aguda não é frequentemente diagnosticada, pois cursa com ausência de sintomas na maioria dos casos. Somente de 20 a 30 % dos adultos com infecção aguda desenvolvem sintomas clínicos (mal-estar, fraqueza, anorexia e icterícia) que se iniciam 3 a 12 semanas após a exposição.<sup>8</sup>

Dos casos agudos, 54 a 86% não clareiam o vírus e evoluem para cronicidade. Thomas et al, em 2000, observaram o clareamento viral em 90 pacientes de um subgrupo de 919 participantes.<sup>9</sup> Geralmente, a transição da forma aguda para crônica cursa na ausência de sintomas e se define por aumento das aminotransferases ou permanência do RNA do vírus no sangue por mais de seis meses.<sup>10</sup>

Os fatores de risco que contribuem para o avanço da infecção crônica pelo VHC são: multiplicidade de *quasispecies*, tempo de infecção maior que 40 anos, sexo masculino, coinfeção HIV ou VHB, comorbidades como esquistossomose, hemocromatose, sobrecarga de ferro, obesidade, imunossupressão, resistência à insulina e esteatohepatite, consumo de álcool, dieta, tabagismo, hepatotoxinas estabelecidas e medicamentos.<sup>5,8</sup>

Apesar da taxa de progressão ser lenta e, frequentemente, assintomática durante 20 anos após a infecção, um traço fundamental da Hepatite C é o aumento no grau de fibrose no fígado, culminando na cirrose em

20% dos casos e, destes, de 1 a 4% ao ano podem evoluir para carcinoma hepatocelular. Assim, a doença pode permanecer desconhecida até um comprometimento do fígado suficiente para resultar em descompensação hepática com quadro de ascite, hemorragia digestiva alta secundária às varizes esofágicas ou gastropatia portal hipertensiva, síndrome hepatorenal e encefalopatia hepática.<sup>8,10</sup>

## **Manifestações Clínicas**

A maioria das pessoas infectadas (60% a 75%) não apresentam sintomas na fase aguda. Quando há manifestações neste estágio, podem ser semelhantes as da Hepatite A ou B, com duração de 2 a 13 semanas: mal-estar, fadiga, letargia, anorexia, dor abdominal, icterícia, hepatoesplenomegalia leve, erupção cutânea e artralgia.<sup>11</sup>

Dos infectados, 15 a 50% podem clarear o vírus, mas na maioria (50 a 85%) a infecção torna-se crônica. Nestes, raramente ocorrem mal-estar, náusea, dor abdominal ou prurido. Com o avanço da doença e desenvolvimento de cirrose avançada, nota-se o aparecimento de icterícia, esplenomegalia, ascite, varizes esofágicas e encefalopatia hepática.<sup>11</sup>

## **Manifestações Extra-hepáticas**

A infecção crônica pelo vírus C tem sido associada a várias manifestações extra-hepáticas.<sup>12</sup> Conte classificou-as em grupos, levando em consideração:

- comprometimento extra-hepático ligado ao VHC: crioglobulinas mistas, nefropatias glomerulares membranoproliferativas, porfiria cutânea tardia, produção de auto-anticorpos, síndrome “sicca” ou seca;
- comprometimento extra-hepático possivelmente ligado à infecção pelo VHC: linfoproliferações malignas, vasculites sistêmicas, trombocitopenia autoimune, prurido, manifestações articulares e musculares;

- comprometimento extra-hepático com associação aparentemente fortuita do VHC: úlcera de córnea de Mooren, fibrose pulmonar, polirradiculoneurite crônica, eritema nodoso, diabetes sacarino, leucoencefalite multifocal progressiva;
- comprometimentos extra-hepáticos favorecidos ou desencadeados pelos tratamentos anti-VHC: distúrbios na tireoide, psoríase, sarcoidose, líquen, neuropatia periférica.<sup>13</sup>

O comprometimento extra-hepático pode ser explicado por mecanismos como injúria citopática direta, lesão causada por imunocomplexos, indução de linfócitos monoclonais ou policlonais, lesão produzida pelos efeitos indiretos da resposta inflamatória (liberação de citocinas, como interferons e o fator de necrose tumoral), ou mesmo pela resposta imunológica induzida pelo vírus, como a ativação de linfócitos citotóxicos ou formação de autoanticorpos.<sup>4</sup>

Ramos-Casals et al, comparou os padrões clínicos e imunológicos de 180 pacientes com doenças autoimunes e VHC positivos com outros 180 indivíduos com doenças autoimunes e VHC negativos (controle) e observou, em sua análise imunológica, que o grupo em estudo apresentou menor prevalência de anticorpos anti-nucleares, anti-ENA (Antígenos Nucleares Extraíveis) e anti-DNA, porém uma grande frequência de fator reumatóide, crioglobulinemia e hipocomplementemia. Embora os testes não estivessem disponíveis para todos os pacientes por ser um estudo retrospectivo, os autores comparam os dados com outros estudos que também descrevem esse padrão para pacientes VHC positivos.<sup>14</sup>

## **Manifestações Reumatológicas**

Devido ao fenômeno da autoimunidade, o comprometimento articular é uma complicação frequente.<sup>4,15</sup> No estudo de Buskila et al, foram encontradas 31% de manifestações reumatológicas em 90 pacientes VHC positivos estudados, sendo as mais prevalentes: artralgia (9%), artrite (4%),

crioglobulinemia (11%), síndrome “sicca” ou seca (8%), caracterizada pela diminuição da secreção das glândulas lacrimais e salivares, e mialgia (4%).<sup>16, 17</sup>

Outros estudos evidenciaram somente 4% da população VHC positiva com artrite e que se caracteriza como uma poliartrite simétrica, semelhante à artrite reumatóide (AR), ou como uma mono-oligoartrite intermitente, forma muito mais grave e relacionada com a presença de crioglobulinemia mista e suas manifestações cutâneas, principalmente a púrpura.

<sup>15, 18</sup>

Clinicamente, a artrite relacionada ao VHC pode ser indistinguível da AR clássica. Alguns doentes podem preencher os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) para classificação e diagnóstico de artrite reumatóide, tornando difícil o diagnóstico diferencial.<sup>15</sup>

Como somente as manifestações clínicas não propiciam a distinção entre as duas doenças, outros métodos diagnósticos como a detecção de anormalidades sorológicas podem ser úteis.<sup>15</sup>

O fator reumatóide (FR) e as crioglobulinas são frequentemente detectados em cerca de 40% a 70% dos doentes com Hepatite C Crônica, portanto não auxiliam no diagnóstico diferencial.<sup>15,19</sup>

O Anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) vem sendo considerado o melhor indicador para AR, pois está presente no soro da maioria dos pacientes e raramente em outras doenças.<sup>19</sup>

O teste no formato ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos anti-CCP tem apresentado excelente desempenho. Possui especificidade de 96% e sensibilidade de 60% a 75% para AR. Devido à sensibilidade mais limitada, novas gerações de testes foram sendo desenvolvidas a partir de bibliotecas de peptídeos citrulinados testados com soros de AR, e obteve-se valores mais elevados como o kit QUANTA Lite™ CCP3.1 IgG/IgA ELISA com sensibilidade de 70,3%.<sup>20</sup>

A realização desse teste pode ser de grande utilidade para prever sobre o desenvolvimento de artrite reumatóide, já que a citrulinação e a produção de anticorpos anti-CCP podem estar presentes antes do

desenvolvimento dos sintomas, e/ou discriminar o diagnóstico de indivíduos com AR dos portadores de artropatia associada ao vírus C. <sup>15, 21</sup>

Na metanálise realizada por Nishimura et al, sobre a acurácia do anti-CCP e FR para diagnóstico de AR, observou-se que a positividade de anticorpos anti-CCP foi mais específica para artrite reumatóide do que FR IgM, IgG ou IgA. <sup>21</sup>

Na população estudada por Bombardieri et al, evidenciou-se a ausência de anticorpos anti-CCP no soro de indivíduos portadores do vírus C com comprometimento articular e presentes em indivíduos com AR, enquanto que o FR esteve presente nos dois grupos. <sup>15</sup>

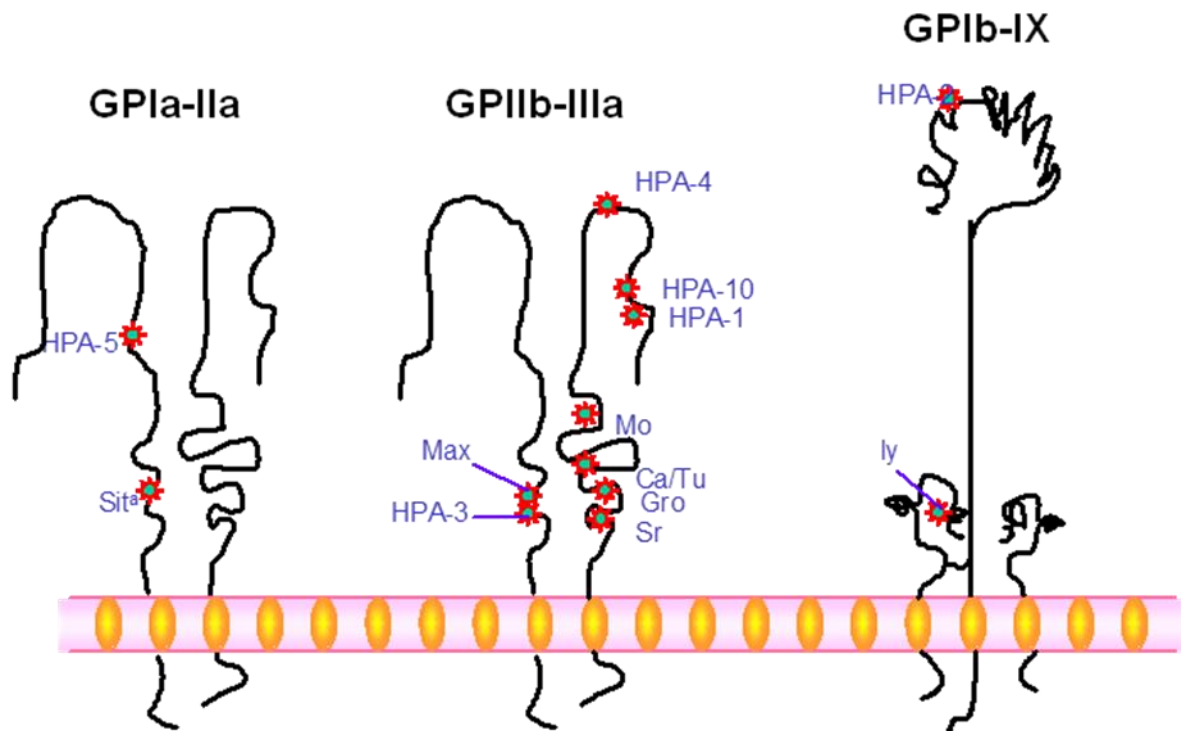
## Fatores Genéticos

Além dos indicadores de autoimunidade citados, fatores genéticos do hospedeiro, recentemente, foram associados à infecção pelo VHC. <sup>21, 22, 23, 24</sup> Os polimorfismos dos antígenos plaquetários humanos (HPAs), já haviam sido associados a certas doenças como púrpura pós-transfusional, trombocitopenia neonatal aloimune, púrpura neonatal aloimune, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e trombose venosa. <sup>24</sup>

Os HPAs são antígenos constituídos por segmentos protéicos polimórficos que residem no interior de glicoproteínas (GP) expressas na membrana plaquetária. Atualmente, estima-se que existam, aproximadamente, 24 tipos de antígenos HPA, sendo que os mais estudados pertencem à família das integrinas e são denominados HPA-1, -2, -3, -4 e -5: <sup>25, 26, 27</sup>

- Sistema HPA-1 (**Figura 1**): é clinicamente o mais importante dos sistemas, pois é o antígeno mais frequentemente associado à aloimunização. Está localizado no complexo GPIIb-IIIa, mais especificamente na GPIIIa e também são expressos na GPIIIa das células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos; <sup>28, 29</sup>
- Sistema HPA-3 (**Figura 1**): está localizado na cadeia pesada da GPIIb-IIIa, a GPIIb ( $\alpha$ Ib); <sup>30</sup>

- Sistema HPA-4 (**Figura 1**): como o HPA-1, está localizado na GPIIIa e também são encontrados em células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos;<sup>31</sup>
- Sistema HPA-5 (**Figura 1**): está associado com o polimorfismo de um aminoácido da GPIa ( $\alpha 2$ ) e presente em outras células além das plaquetas.<sup>31</sup>



**Figura 1.** Complexos de glicoproteínas da membrana da plaqueta contendo epítomos de aloantígenos plaquetários (Modificado de McFarland, 1998).

O polimorfismo, na maioria destes antígenos, ocorre devido à substituição de um único aminoácido na proteína, em consequência da substituição de um nucleotídeo no DNA.<sup>27, 32</sup> As mutações de aminoácidos conduzem a alterações conformacionais na estrutura tridimensional das glicoproteínas, criando determinantes aloantigênicos reconhecidos pelas células B e T.<sup>33</sup> As glicoproteínas, presentes nas membranas das plaquetas, são mediadoras do estágio inicial da função plaquetária, as quais também intervêm

na agregação das mesmas, através da ligação do fibrinogênio e de outras proteínas de adesão.<sup>25,26</sup>

A infecção pelo VHC foi associada ao alelo HPA -5b,<sup>24</sup> no entanto, outros estudos estão sendo conduzidos a fim de relacionar polimorfismos dos sistemas HPA -1, -3 e -5 à infecção pelo VHC, progressão do grau de fibrose e resposta terapêutica, pois residem em glicoproteínas da família das integrinas,<sup>26</sup> moléculas de adesão celular candidatas ao envolvimento na ligação do VHC às plaquetas, uma vez que as plaquetas são carreadoras do vírus na circulação em indivíduos portadores.<sup>34</sup>

Até o momento, o polimorfismo HPA foi associado isoladamente à infecção do VHC, sem considerar outras características da doença como a presença de manifestações reumáticas.

*Justificativa*



Devido à ausência de estudos sobre a associação entre HPA e manifestações reumatológicas na Hepatite C, este estudo procurou verificar possíveis correlações entre manifestações reumatológicas na Hepatite C crônica com indicadores laboratoriais de autoimunidade e polimorfismos do HPA.

A avaliação de polimorfismos genéticos pode ser útil na identificação de maior suscetibilidade dos indivíduos infectados ao desenvolvimento de manifestações reumatológicas e/ou de alguns desses polimorfismos serem indicativos de um curso mais grave da doença, havendo a possibilidade de uma intervenção precoce. <sup>35, 36, 24, 37</sup>

*Hipótese*

Indicadores de autoimunidade e presença de polimorfismos HPA relacionam-se com manifestações reumatológicas em pacientes com Hepatite C.

*Objetivos*

## **Objetivo Geral**

Verificar possíveis associações de indicadores de autoimunidade e polimorfismos do HPA com manifestações reumatológicas em pacientes com Hepatite C.

## **Objetivos Específicos**

- Verificar a frequência de manifestações reumatológicas nos pacientes com Hepatite C;
- Verificar a frequência de anticorpos anti-ccp;
- Verificar a associação de manifestações reumatológicas e parâmetros clínicos;
- Verificar a frequência dos polimorfismos HPA e manifestações reumatológicas.

## *Material e Método*

## **Delineamento do Estudo**

Estudo transversal com portadores de Hepatite C Crônica, selecionados consecutivamente no Ambulatório de Hepatites Virais da Disciplina de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

## **Composição da Amostra**

Com intervalo de confiança de 95%, precisão de 7% e proporção de 31% dos infectados com vírus C que apresentam manifestações reumatológicas, o tamanho amostral de 160 indivíduos foi determinado pela fórmula de Fisher e Belle: <sup>38</sup>

$$N = \frac{Z\alpha^2 / 2 \cdot p \cdot q}{d^2}$$

Onde:

N = tamanho amostral;

$Z\alpha^2/2$  = valor relativo à tabela de distribuição normal para intervalo de confiança de 95% = 1,96;

p = proporção de pacientes que podem apresentar manifestações reumatológicas;

q = proporção de pacientes que podem não apresentar manifestações reumatológicas;

d = precisão

## **Critérios de Inclusão**

- Ter idade entre 18 e 80 anos;
- Apresentar RNA VHC detectável e genotipagem do VHC;
- Não ter tratamento prévio para Hepatite C (nãives);

- Ter realizado biópsia hepática para estadiamento de fibrose ou ter diagnóstico clínico/imagem de cirrose;
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (ANEXO I).

## **Critérios de Exclusão**

- Apresentar coinfeção VHB ou HIV;
- Ter hepatite auto-imune, hemocromatose, doença de Wilson, cirrose biliar primária, colangite esclerosante primária.
- Ter insuficiência renal crônica;
- Ter realizado transplante hepático ou renal;
- Ter doenças difusas do tecido conjuntivo, inclusive AR, conforme Critério de Classificação da Artrite Reumatóide ACR - EULAR 2010 (ANEXO II).<sup>39</sup>

## **Avaliação Clínica e Histórico Pessoal (ANEXO III)**

Foram realizadas avaliações do histórico pessoal e avaliação clínica mediante consulta com o paciente e levantamento em prontuário, a fim de averiguar os critérios de inclusão e exclusão.

### **A. Dados Demográficos**

As seguintes informações foram obtidas mediante consulta em prontuário:

- **Gênero:** masculino e feminino.
- **Idade;**
- **Etnia:** branco e não branco;
- **Diagnóstico de fibrose hepática** por exame histopatológico, conforme classificação METAVIR (ANEXO IV);
- **Genótipo do vírus.**



## B. Avaliação Clínica

- **Manifestações clínicas e gerais relacionadas à Hepatite C:** ascite, icterícia, hematomas, prurido, *spiders*, ginecomastia, encefalopatia hepática prévia, petéquias, hemorragia digestiva alta prévia, outros sangramentos (nariz, gengivorragia), mal-estar, sensação de fraqueza, indisposição, febre e emagrecimento. Os dados foram obtidos mediante exame físico e entrevista.
- **Manifestações extra-hepáticas:** trombocitopenia, anemia aplástica, linfoma não-Hodgkin, porfiria cutânea tardia, líquen plano, glomerulonefrite, síndrome nefrótica, hipotireoidismo, hipertireoidismo, úlcera de córnea, uveíte, olhos secos, prurido, esclerite, sialodinite, úlceras orais, queilite, boca seca, glossite. Os dados foram obtidos por exame físico, exames laboratoriais e diagnósticos contidos no prontuário e entrevista.
- **Exame físico reumatológico:** presença de sensações parestésicas (câimbras, parestesia em membros inferiores e/ou superiores), fenômeno de Raynaud, alterações cutâneas (vasculites, lesões descamativas, pruriginosas, e/ou hiperocrômicas), nódulo subcutâneo, mialgia, fraqueza muscular, dor lombar não mecânica, artralgia, artrite (pelo menos dois dos sintomas: dor, edema, calor, rubor, perda de função), outras manifestações reumatológicas (tenossinovite, bursite). Para a realização deste procedimento houve treinamento com um professor de reumatologia que também deu suporte para a realização dos diagnósticos.

Na literatura não está claro uma conceituação daquilo que deve ser considerado manifestação reumatológica. Assim, para este trabalho, foram considerados sinais, sintomas ou afecções envolvendo o sistema locomotor, alterações ou manifestações que simulem as doenças difusas do tecido conjuntivo. Nesse contexto, as manifestações reumatológicas investigadas foram: <sup>19</sup>

- ✓ **Sensações parestésicas:** hipoestesia ou hipoalgesia em membros inferiores e/ou superiores verificada pelo toque na pele e teste com agulha fina; respectivamente;

- ✓ **Fenômeno de Raynaud:** caracterizado por palidez, cianose e rubor ou fenômeno bifásico com apenas duas das manifestações anteriores;
- ✓ **Alterações cutâneas:** detecção de lesões purpúricas, descamativas, pruriginosas e/ou hiperocrômicas por inspeção da pele;
- ✓ **Nódulo subcutâneo:** inspeção e palpação em região frequente (face extensora de antebraços);
- ✓ **Mialgia:** presença de dor muscular em membros superiores e inferiores;
- ✓ **Fraqueza muscular:** dificuldade em realizar determinadas tarefas por perda de potência muscular, como subir e descer escadas, levantar os braços ou objetos leves e quedas frequentes;
- ✓ **Dor lombar não mecânica:** caracterizada por início gradual ou abrupto e progressivo, sem relação com movimento e sem melhora com o repouso, de caráter insidioso com duração maior que três meses, podendo ser irradiada para região sacro-ilíaca uni ou bilateralmente;
- ✓ **Artralgia:** caracterizada por dor articular, sem componente inflamatório;
- ✓ **Artrite:** caracterizada por dor articular e pelo menos um dos seguintes sintomas edema, calor, rubor e perda de função;
- ✓ **Outras manifestações reumatológicas:** comprometimento de partes moles detectáveis ao exame físico (tenossinovite não traumática e bursite não traumática).

### C. Análises Laboratoriais

Amostras de sangue (20 mL) de cada indivíduo foram coletadas e armazenadas a uma temperatura de - 80°C para dosagem dos seguintes parâmetros:

- **Fator Reumatóide:** foi utilizado kit comercial Reumalátex da Labtest para determinação qualitativa e semiquantitativa do fator reumatóide, conforme instruções do fabricante. O sistema tem sensibilidade para detectar concentrações de FR de no mínimo 8UI/ml, utilizando partículas de

poliestireno, sensibilizadas com gamaglobulina humana e estabilizadas em tampão pH 8,2.

- Anti-CCP: O teste ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) semi-quantitativo para IgG e IgA foi realizado segundo instruções do kit QUANTA Lite™ CCP3.1 I do laboratório INOVA Diagnostic Inc., San Diego, CA, EUA. Foi feito um ensaio imunoenzimático para a detecção de anticorpos IgG e IgA anti-CCP3 (3 péptido citrulinado cíclico) no soro do paciente, citrato ou plasma EDTA. Após a conclusão do teste, as amostras foram classificadas em negativas ( $\leq 39$  unidades) e positivas ( $\geq 40$  unidades).
- Genotipagem HPA: realizada por metodologia *in house* a partir de DNA genômico extraído de sangue total utilizando o kit comercial Miniprep para DNA Genômico (Biosystems, Brasil), conforme orientações do fabricante. Os sistemas HPA -1 e -3 foram genotipados pela técnica de PCR-SSP (*Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primers*) de acordo com Klütler et al.<sup>40</sup> O sistema HPA -5 foi genotipado pela técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism*) segundo metodologia descrita por Kalb et al.<sup>41</sup>

A reação de PCR-SSP foi realizada utilizando os reagentes nas concentrações descritas:

- ✓ 1 X Buffer (LGC Biotecnologia);
- ✓ 2,0 mM de MgCL<sub>2</sub> (LGC Biotecnologia);
- ✓ 0,2 mM de dNTP (Applied Biosystems);
- ✓ 0,5  $\mu$ M de cada primer do controle interno (CRP) (Tabela 1);
- ✓ 0,5  $\mu$ M de cada primer para amplificação de um antígeno específico (Tabela 1);
- ✓ 50ng de DNA genômico
- ✓ 0,1 U de PLATINUM Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Life Technologies)

Volume Total de Reação: 20 $\mu$ L

A reação foi submetida às condições de ciclagem de 95°C por 10 minutos, 10 ciclos de 95°C por 15 segundos, 69°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 25 ciclos de 95°C por 15 segundos, 63°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Um controle interno foi utilizado para a validação do ensaio; as amostras apresentaram uma banda de 440 pb referente ao controle interno da reação. A amplificação foi confirmada pela presença de uma banda de 196 pb para o HPA -1 e 290 pb para o HPA -3.

A reação de PCR-RFLP foi realizada utilizando os reagentes nas concentrações descritas:

- ✓ 1 X Buffer (Invitrogen, Life Technologies);
- ✓ 1,5 mM de MgCL<sub>2</sub> (LGC Biotecnologia);
- ✓ 0,16 mM de dNTP (Applied Biosystems);
- ✓ 0,28 µM de cada primer (Tabela 1);
- ✓ 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Life Technologies);
- ✓ 62 ng de DNA;
- ✓ Volume total de reação: 50µL.

A reação foi submetida às condições de ciclagem de 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 55 segundos, 51°C por 55 segundos e 72°C por 90 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 2%. A amplificação foi confirmada pela presença de uma banda de 274pb. Os produtos amplificados (20µL) foram submetidos à restrição utilizando 1U da enzima MnlI (Biolab®), incubados a 37°C durante 4 horas.

**Tabela 1.** Sequência de primers utilizados para genotipagem plaquetária dos sistemas HPA-1, -3 e-5.

Sistema	Especificidade	Nome	Seqüência (5' → 3')
HPA-1	1a	HPA-1a-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC T
	1b	HPA-1b-I	ACT TAC AGG CCC TGC CTC C
	Comum a -1	HPA-1-II common	GTG CAA TCC TCT GGG GAC T
HPA-3	3a	HPA-3a-II	GGG GGA GGG GCT GGG GA
	3b	HPA-3b-II	GGG GGA GGG GCT GGG GC
	Comum a -3	HPA-3-I common	GGC CCT GGG ACT GTG AAT G
HPA-5	GPIa	GPIa-Fow	GTG ACC TAA AGA AAG AGG
		GPIa-Rev	CTC TCA TGG AAA ATG GCA G
Controle	CRP	CRP-I	CCA GCC TCT CTC ATG CTT TTG GCC AGA CAG
Positivo	CRP	CRP-II	GGG TCG AGG ACA GTT CCG TGT AGA AGT GGA

O material biológico não foi descartado com a finalidade de uso em futuras pesquisas, desde que o voluntário permita através de obtenção de novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esta informação consta no TCLE aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa para este trabalho (ofício 538/10-CEP).

## Aprovação Ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu em reunião de 08 de novembro de 2010, conforme ofício 538/10-CEP (ANEXO V).

## Metodologia estatística

As variáveis categóricas foram analisadas através de tabelas de frequências absolutas e relativas. Nas variáveis contínuas utilizou-se estatística descritiva. Os valores foram apresentados como média e desvio padrão ou mediana (incluindo quartil superior e quartil inferior).

Para avaliar estatisticamente os resultados obtidos, realizou-se teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ), teste exato de Fisher e teste-t para amostras independentes.

O nível de significância adotado nestes testes foi de 5% (significância:  $p < 0,05$ ).

O programa computacional utilizado para realização dos testes foi SAS® 9.2 *Foundation for Microsoft® Windows®* (Copyright® 2008, SAS Institute INC, Cary, NC, USA).

*Resultados*

Cento e cinquenta e nove pacientes com infecção crônica pelo vírus C foram avaliados. Destes, 88 (55,3%) eram homens e 71 (44,7%) eram mulheres, com idades entre 24 e 76 anos (média 49,1). As características demográficas e clínicas relacionadas ao envolvimento reumatológico estão sumarizados nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2.** Características clínicas e demográficas da população com VHC.

Variáveis	Presença manifestações reumatológicas (n= 114)	Ausência manifestações reumatológicas (n= 45)	P
Idade (anos), média	49,6 ± 9,9	46,3 ± 10,3	0,8072 *
Sexo			
Masculino	56 (63,6%)	32 (36,4%)	0,0120 †
Feminino	58 (81,7%)	13 (18,3%)	
Etnia			
Branco	101 (71,6%)	40 (28,4%)	0,9802
Não branco	13 (72,2%)	5 (27,8%)	
Genótipo			
1	79 (72,5%)	30 (27,5%)	0,7475
Não 1	35 (70%)	15 (30%)	
Grau de fibrose			
0	3 (75%)	1 (25%)	0,1018 **
1	14 (63,6%)	8 (36,4%)	
2	34 (64,2%)	19 (35,8%)	
3	20 (70%)	10 (30%)	
4	44 (86,3%)	7 (13,7%)	

\* Teste-t

† Significância estatística

\*\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

A presença de manifestações reumatológicas foi mais frequente em pacientes do sexo feminino ( $p = 0,0120$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre presença ou ausência de manifestações reumatológicas e idade, etnia, grau de fibrose hepática ou genotipagem do VHC.



**Tabela 3.** Associação de manifestações gerais e clínicas com manifestações reumatológicas.

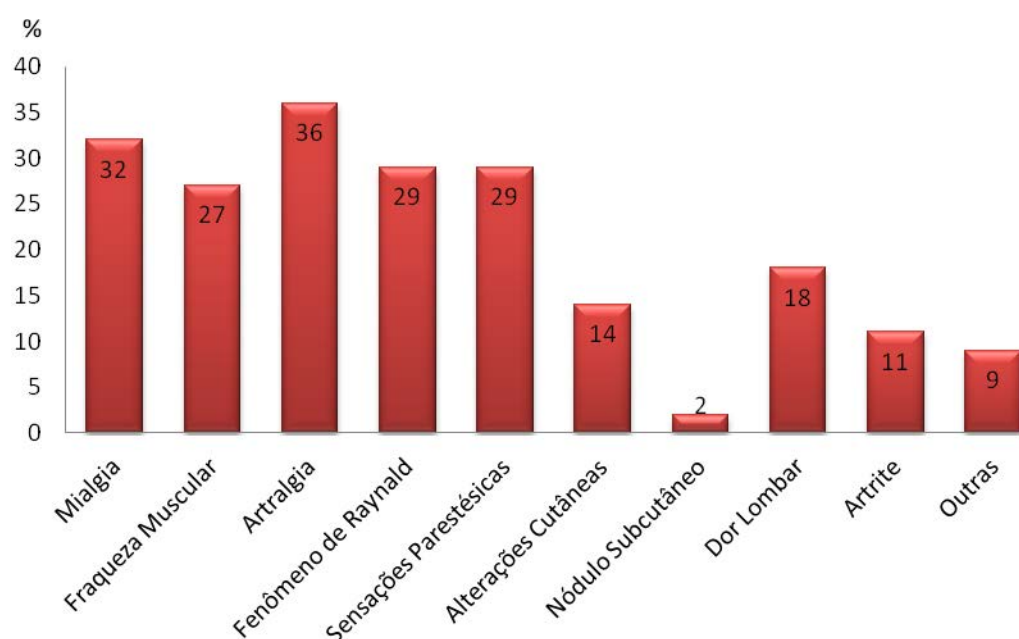
Variáveis	Presença manifestações reumatológicas (n= 114)	Ausência manifestações reumatológicas (n= 45)	P
<b>Manifestações gerais</b>			
Presente	86 (83,5%)	17 (16,8%)	0,0008*
Ausente	28 (50%)	28 (50%)	
<b>Manifestações clínicas</b>			
Presente	74 (82,2%)	16 (17,8%)	< 0,001*
Ausente	40 (58%)	29 (42%)	

Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

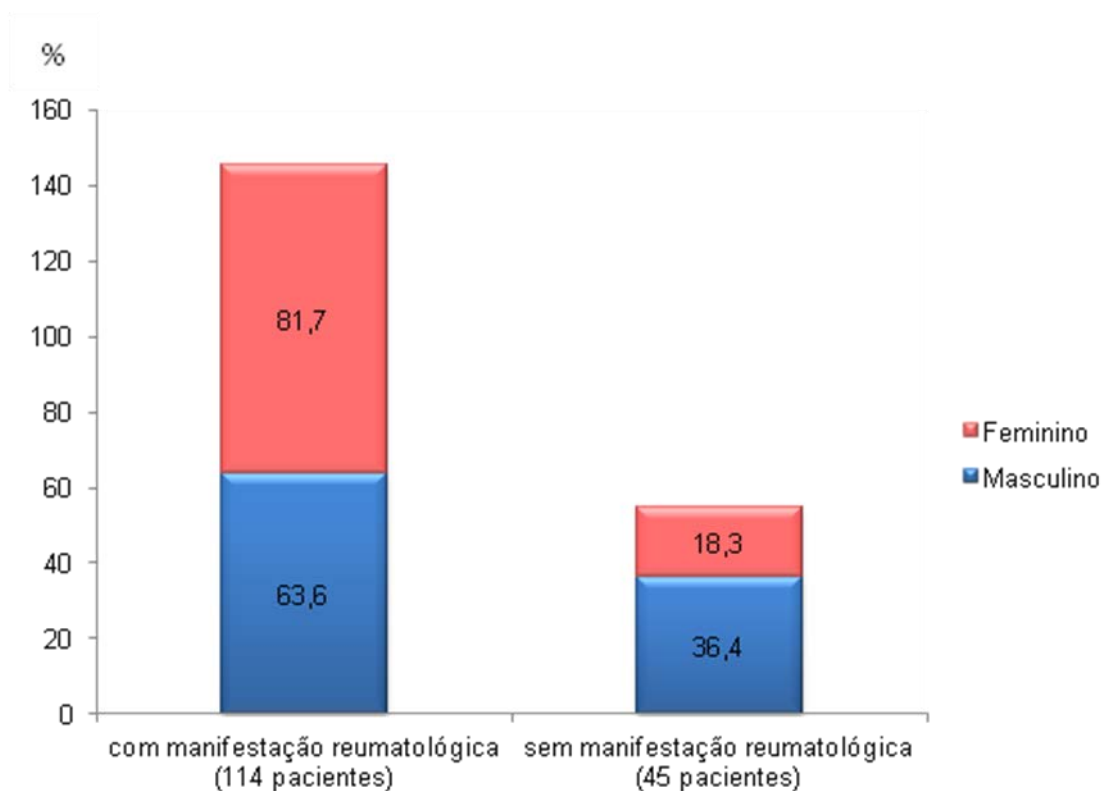
\* Significância estatística

Tanto as manifestações gerais quanto as clínicas foram mais frequentes no grupo com manifestações reumatológicas ( $p= 0,0008$  e  $p< 0,001$ , respectivamente).

Manifestações reumatológicas não atribuídas à coexistência de outras doenças autoimunes foram observadas em 114 (71,7%) indivíduos, distribuídas nas Figuras 1 e 2.



**Figura 2.** Distribuição de manifestações reumatológicas na população.



**Figura 3.** Prevalência de manifestações reumatológicas conforme o sexo.

A prevalência e a associação de anticorpos anti-CCP e fator reumatóide presentes em cada grupo estão expostos nas Tabelas 4, 5 e 6.

**Tabela 4.** Distribuição de anti-CCP na população de acordo com a presença de MR.

Anti-CCP	Presença manifestações reumatológicas (n= 114)	Ausência manifestações reumatológicas (n= 45)	<i>P</i>
Positivo	5 (71,4%)	2 (28,6%)	1,0000
Negativo	109 (71,8%)	43 (28,3%)	

Teste exato de Fisher

**Tabela 5.** Distribuição de FR na população de acordo com a presença de MR.

FR	Presença manifestações reumatológicas (n= 114)	Ausência manifestações reumatológicas (n= 45)	<i>P</i>
Positivo	31 (75,6%)	10 (24,4%)	0.5187
Negativo	83 (70,3%)	35 (29,7%)	

Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

**Tabela 6.** Positividade de anti-CCP e FR na população e diagnóstico de AR.

Variáveis	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas (n= 45)	VHC positivos com AR*
Anti-CCP	5/114 (4,4%)	2/45 (4,4%)	0 (0)
FR	31/114 (27,2%)	10/45 (22,3%)	0 (0)

\* Diagnóstico de AR conforme Critério de Classificação da Artrite Reumatóide ACR-EULAR 2010

Não houve significância estatística ( $p=1,0000$  e  $p= 0.5187$ ) entre os grupos para positividade de anticorpos anti-CCP e FR, respectivamente. Aqueles que apresentaram os autoanticorpos, não tinham critérios para diagnóstico de artrite reumatoide.

A Tabela 7 apresenta dados de associação entre MR, frequências alélicas e genóticas do HPA-1, -3 e -5 na população.

**Tabela 7.** Frequências alélicas e genóticas para HPA-1, HPA-3, HPA-5 em pacientes infectados com VHC (n= 159).

Variáveis	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	<i>P</i>
<b>Alelos</b>			
1a	190 (72,5%)	72 (27,5%)	0,8685 *
1b	40 (71,4%)	16 (28,6%)	
3a	163 (74,4%)	56 (25,6%)	0,2127 *
3b	67 (67,7%)	32 (32,3%)	
5a	198 (71,5%)	79 (28,5%)	0,4569 *
5b	32 (78%)	9 (22%)	
<b>Genótipos</b>			
1a/1a	79 (72,5%)	30 (27,5%)	0,9482 **
1a/1b	32 (72,7%)	12 (27,3%)	
1b/1b	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
3a/3a	59 (77,6%)	17 (22,4%)	0,3565 *
3a/3b	45 (67,2 %)	22 (32,8%)	
3b/3b	11 (68,8%)	5 (31,2%)	
5a/5a	86 (71,0%)	35 (29,0%)	0,7297 **
5a/5b	26 (74,3%)	9 (25,7%)	
5b/5b	3 (100%)	0 (0)	

\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\*\* Teste exato de Fisher

Na população geral, não houve significância estatística, tanto para as frequências alélicas quanto para as genóticas em relação a manifestações reumatológicas.

As Tabelas 8, 9, 10, 11, 12, 13 apresentam a distribuição de frequências alélicas e genóticas para os HPAs por sexo.

**Tabela 8.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-1 e sexo feminino (n= 72).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	<i>P</i>
Alelos			
1a	93 (80,2%)	23 (19,8%)	0,2605 *
1b	25 (89,3%)	3 (10,7%)	
Genótipos			
1a/1a	35 (76%)	11 (24%)	0,0496 ** †
1a/1b	23 (95,8%)	1 (4,2%)	
1b/1b	1 (50%)	1 (50%)	

\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\*\* Teste exato de Fisher

† Significância estatística

**Tabela 9.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-1 e sexo masculino (n= 87).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	<i>P</i>
Alelos			
1a	97 (66,4%)	49 (33,6%)	0,1928 *
1b	15 (53,6%)	13 (46,4%)	
Genótipos			
1a/1a	44 (69,8%)	19 (30,2%)	0,1062 **
1a/1b	9 (45%)	11 (55%)	
1b/1b	3 (75%)	1 (25%)	

\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\*\* Teste exato de Fisher

**Tabela 10.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-3 e sexo feminino (n= 72).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	<i>P</i>
<b>Alelos</b>			
3a	87 (88,8%)	11 (11,2%)	0,0019 *
3b	31 (67,4%)	15 (32,6%)	
<b>Genótipos</b>			
3a/3a	33 (94,3%)	2 (5,7%)	0,0126 *
3a/3b	21 (75%)	7 (25%)	
3b/3b	5 (55,6%)	4 (44,4%)	

Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\* Significância estatística

**Tabela 11.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-3 e sexo masculino (n= 87).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	<i>P</i>
<b>Alelos</b>			
3a	76 (62,8%)	45 (37,2%)	0,5168 *
3b	36 (67,9%)	17 (32,1%)	
<b>Genótipos</b>			
3a/3a	26 (63,4%)	15 (36,6%)	0,5869 **
3a/3b	24 (61,5%)	15 (38,5%)	
3b/3b	6 (85,7%)	1 (14,3)	

\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\*\* Teste exato de Fisher

**Tabela 12.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-5 e sexo feminino (n= 72).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	P
Alelos			
5a	99 (79,8%)	25 (20,2%)	0,1257
5b	19 (95%)	1 (5%)	
Genótipos			
5a/5a	42 (77,8%)	12 (22,2%)	0,3475
5a/5b	15 (93,8%)	1 (6,2%)	
5b/5b	2 (100%)	0 (0)	

Teste exato de Fisher

**Tabela 13.** Análise de associação: manifestação reumatológica, HPA-5 e sexo masculino (n= 87).

	Presença manifestações reumatológicas	Ausência manifestações reumatológicas	P
Alelos			
5a	99 (64,7%)	54 (35,3%)	0,8115 *
5b	13 (61,9%)	8 (38,1%)	
Genótipos			
5a/5a	44 (65,7%)	23 (34,3%)	0,7381 **
5a/5b	11 (57,9%)	8 (42,1%)	
5b/5b	1 (100%)	0 (0)	

\* Teste qui-quadrado ( $\chi^2$ )

\*\* Teste exato de Fisher

Na distribuição por sexo, as frequências genotípicas HPA-1 e -3 mostraram relevância estatística quando associadas a manifestações reumatológicas (p=0,0496 e p=0,0126). Para o sexo feminino foi significativa a associação de alelos HPA-3 (p=0,0019).

Associou-se, também, frequências genotípicas e anticorpos anti-ccp (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise de associação: frequências genótípicas e anticorpos anti-ccp.

Genótipos	Anti-ccp Positivo	Anti-ccp negativo	<i>P</i>
1a/1a	5 (4,6%)	104 (95,4%)	0,3162
1a/1b	1 (2,3%)	43 (97,7%)	
1b/1b	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0,0646
3a/3a	1 (1,3%)	75 (98,7%)	
3a/3b	4 (6%)	63 (94%)	
3b/3b	2 (12,5%)	14 (87,5)	1,0000
5a/5a	6 (5%)	115 (95%)	
5a/5b	1 (2,9%)	34 (97,1%)	
5b/5b	0 (0)	3 (100%)	

Teste exato de Fisher

Frequências genótípicas e anticorpos anti-ccp não se diferenciam estatisticamente.

*Discussão*



O VHC está associado a vários acometimentos reumatológicos que podem surgir devido à capacidade do vírus de estimular o sistema imune, resultando em acúmulo de imunocomplexos e autoanticorpos. Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas no intuito de buscar uma relação entre a presença do vírus, queixas musculoesqueléticas e síndromes autoimunes que são frequentemente referidas pelos doentes.<sup>42, 43, 44</sup> De 45% a 65% dos pacientes apresentam vários tipos de autoanticorpos que não foram associados com o genótipo do VHC.<sup>45</sup>

Clifford et al, estudaram o padrão, a prevalência e a importância clínica de marcadores sorológicos de autoimunidade em norte-americanos com VHC e verificaram que a maioria da população estudada possui autoanticorpos, mas que não são relacionados à faixa etária ou sexo e que não influenciam no tratamento com interferon alfa-2b.<sup>45, 46</sup> A frequência de antígeno leucocitário humano (HLA) no locus -DR3 foi mais alta em pacientes com padrão autoimune quando comparado ao controle no estudo de Czaja et al, que reflete uma propensão do indivíduo à imunorreatividade, tornando o curso da infecção viral mais grave.<sup>47</sup> O desenvolvimento do processo autoimune em pacientes com Hepatite C é intrigante. O tropismo do vírus por células sanguíneas, em especial por linfócitos, sugere uma ligação entre o patógeno e o desenvolvimento da autoimunidade e a expansão da mesma por células B e T. Outros componentes do sistema imunológico têm sido investigados, levando a suspeita de uma desregulação imune durante a infecção. Entretanto, o padrão dessas manifestações e como são desencadeadas quase nunca são discutidos.<sup>42, 43</sup>

O presente estudo mostrou a prevalência de manifestações reumatológicas e, associações laboratoriais e genéticas em uma população de 159 pacientes com Hepatite C crônica.

Os resultados mostraram uma proporção significativa de pacientes com queixas reumatológicas (72%) não atribuídas a outras causas como doenças difusas do tecido conjuntivo ou outras doenças inflamatórias. Não houve correlação com idade, etnia, genótipo viral e grau de fibrose, porém houve com sexo feminino ( $p= 0,0120$ ), conforme observado também na população egípcia ( $p= 0,023$ ).<sup>42</sup>

As manifestações mais comuns foram artralgia (36%), mialgia (32%), sensações parestésicas (29%) e fenômeno de Raynald (29%). Esses achados são condizentes com dados apresentados na literatura.<sup>43</sup> Dentre as menos prevalentes, a artrite apareceu em 11% dos indivíduos. Conforme Rosner et al, artrite tem sido notada em 2 a 20% dos pacientes com VHC.<sup>41</sup> A maioria dos estudos não mostra a artrite como queixa prevalente (4%).<sup>49, 50</sup>

Cacoub et al, revelaram que mais de 70% dos pacientes infectados com VHC apresentaram manifestações extra-hepáticas envolvendo primeiramente articulações, músculos e pele. Essas manifestações estiveram associadas mais ao sexo feminino. No entanto, o autor encontrou relação com idade e grau de fibrose avançados.<sup>49</sup>

Pesquisas atuais correlacionam a prevalência de artralgia e artrite com títulos elevados de crioglobulina.<sup>42, 50</sup> Por outro lado, alterações hematológicas, como trombocitopenia, são mais comuns em pacientes com Hepatite C crônica do que na população geral. Fato este que também pode estar relacionado aos sintomas articulares mencionados.<sup>42</sup>

Pessoas infectadas com o vírus C produzem uma variedade de autoanticorpos e alguns são mais frequentemente expressos como o fator reumatoide (31%).<sup>43</sup> Dos pacientes com manifestações reumatológicas, 27,2% tiveram fator reumatoide positivo. Na prática clínica, esse fenômeno pode causar erro diagnóstico, pois um paciente com poliartrite simétrica e fator reumatoide positivo pode ser diagnosticado como tendo artrite reumatoide.<sup>43</sup>

Contribuindo para a elucidação do diagnóstico diferencial, os anticorpos anti-CCP são de grande valia. Estudos comprovaram que estes estão ausentes em pacientes com VHC.<sup>15, 43</sup> Todavia, no presente estudo, 4,4% (7/159) apresentaram anticorpos e destes, cinco tiveram queixa reumatológica, mas sem diagnóstico de AR.

Na busca por explicações para os mecanismos de autoimunidade e, conseqüentemente, o aparecimento de sintomas extra-hepáticos, causados pelo VHC, autores têm pesquisado componentes genéticos dos indivíduos.<sup>43, 45, 49, 51, 52</sup>

Síndrome de Sjögren, tireoidite autoimune, líquen plano, glomerulonefrite, poliartrite nodosa, crioglobulinemia e autoanticorpos como

anticorpo anti-núcleo e anticorpo anti-músculo liso, são frequentemente reportados em pacientes com Hepatite C crônica e sugerem que o vírus facilita a expressão de aspectos imunológicos, possivelmente por estimulação da produção endógena de interferon e realçando a expressão de HLA.<sup>52</sup> Este regula a produção de autoanticorpos por meio de algum alelo não definido no locus DR. Indivíduos predispostos geneticamente têm ocorrências autoimunes facilitadas pela infecção viral e estão associadas com a presença do HLA-DR4.<sup>52</sup>

Crioglobulinemia mista, caracterizada por púrpura, artralgia e astenia associadas à presença de crioglobulinas, representa uma das principais manifestações reumatológicas na Hepatite C, com mecanismo de produção não muito claro.<sup>51</sup> Em 2001, Cacoub et al, estudou alelos HLA de classe II em infectados com vírus C com crioglobulinemia mista comparando-se com paciente sem esta manifestação. Os resultados indicaram que a presença de fenótipo DR11 está associada com aumento do risco para desenvolvimento de crioglobulinemia mista na população em contraste com a presença de HLA-DR7 que inibe a produção de crioglobulinas.<sup>51</sup>

Além dos leucócitos, há também interações do vírus com as plaquetas, porém ainda pouco investigadas.<sup>53</sup>

Alterações na expressão de integrinas podem estar associadas com progressão de fibrose.<sup>54</sup> Silva et al, demonstraram que o genótipo HPA-1a/1b pode ter correlação com cirrose, provavelmente devido a alterações estruturais nas glicoproteínas de membrana das plaquetas, o que poderia interferir na ativação do TGF- $\beta$ 1 e, conseqüente aumento do grau de fibrose.<sup>54</sup>

Sabe-se também da relação do HPA com persistência do vírus e com a infecção, mas foi constatada ausência de pesquisas sobre o mesmo e manifestação reumatológica, o que fundamenta o racional desse estudo.<sup>24</sup>

A análise genética não constatou associação entre frequências alélicas, genótípicas e manifestações reumatológicas para os HPAs estudados na população geral. Nas análises individuais para os sexos, nas mulheres foram encontradas associações de MR com o alelo HPA-3a e genótipos HPA-3a3a e HPA-1a1a, não observadas no sexo masculino.

A relação entre MR e genótipo HPA-1a/1a poderia ser explicada, a despeito de sua nomenclatura, pela localização dos antígenos codificados por esse alelo (complexo GPIIb-IIIa, mais especificamente na GPIIIa) <sup>55</sup>, também em células endoteliais, células de músculo liso e fibroblastos. <sup>55, 28, 29</sup> Como o HPA-1, o HPA-3 está localizado na cadeia da GPIIb-IIIa, mas principalmente na GPIIb. <sup>30</sup> Por estar no mesmo complexo, o mecanismo de desenvolvimento de manifestações reumatológicas na Hepatite C poderia ser parecido com HPA-1, justificado pelos resultados genotípicos semelhantes nos dois sistemas (**Figura 1**).

Além do pressuposto acima, o HPA-3a parece estar associado a maior propensão ao desenvolvimento de manifestações reumatológicas no sexo feminino ou, ainda, o HPA-3b parece conferir um efeito protetor ao desenvolvimento dessas complicações. Contudo, esses dados devem ser analisados com cautela, considerando que o grupo feminino, que possui manifestações reumatológicas em maior frequência, foi maior na casuística estudada. Assim, não encontrar significância estatística entre os homens pode ser explicado pelo menor número de casos.

Esse estudo mostrou, de maneira inédita, as possíveis associações entre manifestações reumatológicas, indicadores de autoimunidade e polimorfismos HPA-1, -3, que podem predispor seus portadores a complicações no curso da Hepatite C.

*Conclusões*

- A maioria dos pacientes com Hepatite C crônica apresentou manifestações reumatológicas associadas à presença do vírus;
- Manifestações reumatológicas foram mais frequentes no sexo feminino;
- A maioria dos pacientes com manifestações reumatológicas não apresentou anticorpos anti-CCP positivos;
- Manifestações reumatológicas foram associadas a manifestações gerais e clínicas da Hepatite C crônica;
- O sexo feminino apresentou manifestações reumatológicas associadas aos genótipos HPA-1a1a, HPA-3a3a e ao alelo HPA-3a;

## *Referências Bibliográficas*

1. World Health Organization. Hepatitis C. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>.
2. Perone C, Del Castilho DM, Pereira GL, Carvalho NO, Januário JN, Teixeira R. Alta prevalência de genótipo 1 em portadores de hepatite c crônica em belo Horizonte, MG. Rev Sociedade Bras Med Tropical. 2008 mai/jun;41(3):238-42.
3. Vasconcelos RR, Tengan FM, Cavalheiro NP, Ibrahim K, Pereira H, Barone AA. Fatores associados às formas evolutivas graves da infecção crônica pelo vírus da hepatite C. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2006; 39(5):433-8.
4. Hajjar LA, Rosa TT, Veiga JPR. Manifestações extra-hepáticas da hepatite C. Brasília Médica.1999;36(3/4):96-105.
5. Silva, GF. Progressão de fibrose hepática em doadores de sangue infectados pelo vírus da Hepatite C [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, 2005.
6. Focaccia R, da Conceição OJ, Sette HJ, Sabino E, Bassit L, Nitrini DR, Lomar AV, et al. Estimated prevalence of viral hepatitis in the general population of the municipality of São Paulo, measured by a serologic survey of a stratified, Randomized and Residence-Based Population. Braz J Infect Dis. 1998; 2(6):269-84.
7. Oliveira CV. Prevalência e fatores de risco da infecção pelo vírus da Hepatite C em amostras populacionais do estado de São Paulo com análise espacial por geoprocessamento [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2012.
8. Chen SL, Morgan TR. The Natural History of Hepatitis C Virus (HCV) Infection. Int. J. Med. Sci. 2006; 3(2):47-52.



9. Thomas DL, Astemborski J, Rai RM, Anania FA, Schaeffer M, Galai N, et al. The Natural History of Hepatitis C Virus Infection: Host, Viral, and Environmental Factors. *JAMA*. 2000;284(4):450-6. doi:10.1001/jama284.4.450.
10. Seef LB. Natural History of Chronic Hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36(5/1):35-46.
11. Wong T, Lee SS. Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ*. 2006; 174(5):649-59. doi:10.1503/cmaj.1030034.
12. Gumber SC, Chopra S. Hepatitis C: a multifaceted disease. *Ann Intern Med*. 1995;123: 615-20.
13. Conte VP. Hepatite crônica por vírus C: parte 1 Considerações Gerais. *Arq Gastroenterol*. 2000 jul/set;37(3):187-94.
14. Ramos-Casals M, Jara LJ, Medina F, Rosas J, Calvo-Alen J, Mana J, et al. Systemic autoimmune diseases co-existing with chronic hepatitis c virus infection (the hispamec registry): patterns of clinical and immunological expression in 180 cases. *Journal of Internal Medicine* 2005; 257: 549-57.
15. Bombardieri M, Alessandri C, Labbadia G, Iannuccelli C, Carlucci F, Riccieri V, et al. Role of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in discriminating patients with rheumatoid arthritis from patients with chronic hepatitis C infection associated polyarticular involvement. *Arthritis Res Ther*. 2004; 6:137-41. Disponível em: <http://arthritisresearch.com/content/6/2/R137>.
16. Buskila D, Shnaider A, Neumann L, Lorber M, Zilberman D, Hilzenrat N, et al. Musculoskeletal manifestations and autoantibody profile in 90 Hepatitis C virus infected Israeli patients. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 1998;28: 107-13.

17. Gomes RS, Raymundi SD, Chahade WH. Síndrome de Sjögren. *Temas de Reumatologia Clínica*. 2008; 9(1): 3-10.
18. Palazzi C, D'Angelo S, Olivieri I. Hepatitis C virus-related arthritis. *Autoimmunity Reviews*. 2008;8(1):48-51.
19. Rocha OM, Batista AAP, Medolago N, Silva GF. Manifestações reumatológicas da hepatite C. *JBM*. 2010;98(2):37-42.
20. Alarcon RT, Andrade LEC. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatóide. *Rev Bras Reumatol*. 2007 mai/jun;47(3):180-7.
21. Nishimura K, Sugiyama D, Kogata Y, Tsuji G, Nakazawa T, Kawano S, et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*. 2007 Jun 5;146(11):797-808.
22. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia - Fundamentos e prática*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2001.
23. Bierling P, Pignon JM, Kuentz M, Mitjavila MT, Fromont P, Barbu V, et al. Thrombocytopenia after bone marrow transplantation caused by a recipient origin Br(a) allo-antibody: presence of mixed chimerism 3 years after the graft without hematologic relapse. *Blood*. 1994;83(1):274-9.
24. Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RMT, Silva GF, Pardini MIMC. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J. Med. Virol*. 2009;81:757-9.
25. Santoso S. Clinical impact of platelet glycoprotein polymorphism. *Vox Sang*. 2000;78(2):121-4.

26. Kunicki TJ, Newman PJ. 1992. The molecular immunology of platelet proteins. *Blood*. 1992; 80:1386-404.
27. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang*. 2003;85(3):240-5.
28. Kawai Y. Expression of platelet alloantigens on human endothelial cells and HEL cells. *Thromb. Haemost.* 1987;58: 4.
29. Giltay JC, Brinkman HJ, von dem Borne AE, van Mourik JA. Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood*. 1989;74(3):965-70.
30. Von dem Borne AE, von Riesz E, Verheugt FW, ten Cate JW, Koppe JG, Engelfriet CP, Nijenhuis LE. Baka, a new platelet-specific antigen involved in neonatal allo-immune thrombocytopenia. *Vox Sang*. 1980; 39(2):113-20.
31. Mueller-Eckhardt C, Santoso S, Kiefel V. Platelet alloantigens - Molecular, genetic, and clinical aspects. *Vox Sang*. 1994; 67: 89-93.
32. Lucas GF, Metcalfe P. Platelet and granulocyte polymorphisms. *Transfus Med*. 2000;10:157-74.
33. Santoso S, Kiefel V. Human platelet-specific alloantigens: update. *Vox Sang*. 1998;74(2):249-53.
34. Hamaia S, Li C, Allain JP. 2001. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood*. 2001; 98(8): 2293-300.
35. Van Gaalen FA, Van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid

arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2004 Jul; 50(7): 2113-21. doi:10.1002/art.20316.

36. Cangussu LOF. Associação entre os antígenos leucocitários humano de classe II e a hepatite c crônica. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG; 2008 [acesso em: 2002 Jul 29]. Disponível em: [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/ECJS7KXENR/1/l Luiz\\_ot\\_vio\\_freire\\_cangussu.pdf](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/1843/ECJS7KXENR/1/l Luiz_ot_vio_freire_cangussu.pdf)
37. Thursz M, Yallop R, Goldin R, Trepo C, Thomas HC. Influence of MHC class II genotype on outcome of infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1999; 354: 2119-24.
38. Villas Bôas PJFV, Ruiz T. Occurrence of hospital infection among interned elderly in a university hospital. *Rev Saúde Pública*. 2004; 38(3):1-6. Disponível em: [www.fsp.usp.br/rsp](http://www.fsp.usp.br/rsp).
39. Fuller R. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. *Rev Bras Reumatol*. 2010; 50 (5):481-6.
40. Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G. 1996. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang*. 1996; 71:121-5.
41. Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Thromb Haemost*. 1994; 71: 651-4.
42. Mohammed RHA, ElMakhzangy HI, Gamal A, Mekky F, El Kassas M, Mohammed N, et al. Prevalence of rheumatologic manifestations of chronic hepatitis C virus infection among Egyptians. 2010; 29(12): 1373-80. doi: 10.1007/s10067-010-1463-x.

43. Buskila, D. Hepatitis C - Associated rheumatic disorders. *Rheum Dis Clin N Am.* 2009; 35:111-23. doi:10.1016/j.rdc.2009.03.005.
44. Ferri C, La Civita L, Fazzi P, Solfanelli S, Lombardini F, Begliomini E, et al. Interstitial lung fibrosis and rheumatic disorders in patients with hepatitis C virus infection. *British Journal of Rheumatology.* 1997; 36: 360-5.
45. Ali A, Zein NN. Hepatitis C infection: a systemic disease with extrahepatic manifestations. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* 2005; 72(11): 1005-19.
46. Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Luttig B, Manns M, et al. High Prevalence of Serological Markers of Autoimmunity in Patients With Chronic Hepatitis C. *Hepatology.* 1995; 21(3): 613-9.
47. Czaja AJ, Carpenter HA. Histological findings in chronic hepatitis C with autoimmune features. *Hepatology.* 1997; 26(2): 459-66.
48. Rosner I, Rozenbaum M, Toubi E, Kessel A, Naschitz JE, Zuckerman E. The case for hepatitis C arthritis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* 2004; 33(6): 375-87. doi: 10.1016/j.semarthrit.2003.12.006.
49. Cacoub P, Poynard T, Ghillani P, Charlott F, Olivi M, Piette JC, et al. Extrahepatic manifestations of chronic hepatitis C. *Arthritis & Rheumatism.* 1999; 42(10): 2204-12. DOI: 10.1002/1529-0131(199910)42:10<2204::AID-ANR24>3.0.CO;2-D.
50. Zignego AL, CRAXÌ A. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis.* 2008; 12: 611-36.
51. Cacoub P, Renou C, Kerr G, Hùe S, Rosenthal E, Cohen P, et al. Influence of HLA-DR phenotype on the risk of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia. *Arthritis & Rheumatism.* 2001; 44(9): 2118-24.

52. Czaja AJ, Carpenter HA, Santrach, PJ. Immunologic features and HLA associations in chronic viral hepatitis. *Gastroenterology*. 1995; 108: 157-64.
53. Pavio N, and Lai MMC. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system?. *J. Biosci.* 2003; 28(3): 287-304.
54. Silva GF, Grotto RMT, Verdichio-Moraes CF, Corvino SM, Ferrasi AC, Silveira LVA, et al. Human Platelet Antigen genotype is associated with progression of fibrosis in chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2012; 84:56-60. doi:10.1002/jmv.
55. Newman P, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PLA1 and PLA2, are associated with a Leucine33/ Proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J. Clin. Invest.* 1989; 83:1778-81.

*Anexos*

## ANEXO I



### **Ambulatório de Hepatite Virais**

Faculdade de Medicina de Botucatu

*Universidade Estadual Paulista - Unesp*

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

BOTUCATU, SP – RUBIÃO JUNIOR – CEP. 18618-970 – CP. 584 – FONE-(14) 6822-2969 – FAX (14) 6822-2238



## **“Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”**

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **“Análise de associações de polimorfismos HLA, HPA, indicadores de autoimunidade e manifestações reumatológicas na Hepatite C”** que tem como objetivo avaliar a prevalência de problemas nas articulações e verificar se esses problemas estão associados à inflamação causada pelo vírus e/ou a fatores genéticos das pessoas infectadas.

A maioria das pessoas com Hepatite C Crônica não apresentam sintomas, porém raramente pode ocorrer mal-estar, náusea, dor no abdome ou prurido (coceira). Em casos de doença avançada, onde há cirrose (cicatrizes e nódulos no fígado), nota-se o aparecimento de icterícia (pele amarelada), aumento do baço, acúmulo de líquido no interior do abdome, dilatações nas veias do esôfago e distúrbio mental devido ao aumento de toxinas circulantes. Além desses, há sintomas que não estão relacionados diretamente à doença como dores ou inflamação nas juntas devido à resposta do corpo à doença.

O motivo que nos leva a estudar o problema é que a presença de algumas células no sangue e/ou fatores genéticos de pessoas infectadas pelo VHC pode ajudar no prognóstico de problemas articulares no curso da Hepatite C crônica.

### **PROCEDIMENTOS DA PESQUISA**

Todos os procedimentos serão realizados antes do início da terapia medicamentosa.

Serão avaliados o histórico pessoal (fatores de risco, uso de medicamentos, profissão, sexo, idade, etnia), sintomas clínicos relacionados à doença e articulares. Além disso, uma amostra de sangue será retirada através de punção venosa periférica, com agulha, identificada com nome e número do registro do Hospital, e estocada em freezer a menos 80 graus, no Hemocentro do Hospital das Clínicas de Botucatu para a realização deste trabalho e de futuras pesquisas.

Caso sua avaliação apresente alguma anormalidade entraremos em contato para fazermos o acompanhamento/tratamento/prevenção da mesma.

### **GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO**

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento.

A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o pesquisador e outra será fornecida a você.



**DECLARAÇÃO DO(A) PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO(A) PARTICIPANTE**

Eu, \_\_\_\_\_  
fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador **Dr. Giovanni Faria Silva** e/ou a estudante **Natália Bronzatto Medolago**, certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em caso de dúvidas poderei chamá-los nos telefones (14) 3811-6213 / (14) 8149-8711 ou o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, no telefone (14) 3811-6143.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

---

Nome	Assinatura do Participante	Data
------	----------------------------	------

---

Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
------	---------------------------	------

---

Nome	Assinatura da Testemunha	Data
------	--------------------------	------

## ANEXO II

### Critério de Classificação da Artrite Reumatóide ACR – EULAR 2010

**Tabela 1**

População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*	
Sinovite que não seja melhor explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais são diferentes em pacientes com diferentes apresentações, mas podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes um reumatologista deve ser consultado.	
<b>Critério de classificação para AR (algoritmo baseado em pontuação: soma da pontuação das categorias A-D). Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR</b>	
Envolvimento articular <sup>A</sup>	
1 grande articulação <sup>B</sup>	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas <sup>C</sup> articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	2
4-10 pequenas articulações (com ou sem envolvimento de grandes articulações)	3
>10 articulações <sup>D</sup> (pelo menos uma pequena articulação)	5
Sorologia <sup>E</sup> (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
FR negativo <b>e</b> AAPC negativo	0
FR positivo em título baixo <b>ou</b> AAPC positivo em título baixo	2
FR positivo em título alto <b>ou</b> AAPC positivo em título alto	3
Provas de fase aguda <sup>F</sup> (pelo menos o resultado de um teste é necessário para classificação)	
PCR normal <b>e</b> VHS normal	0
PCR anormal <b>ou</b> VHS anormal	1
Duração dos sintomas <sup>G</sup>	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

<sup>A</sup>O envolvimento articular se refere a qualquer articulação edemaciada ou dolorosa ao exame físico e pode ser confirmado por evidências de sinovite detectada por um método de imagem. As articulações interfalangeanas distais (IFDs), primeira carpometacarpiana (CMTC) e primeira metatarsofalangeana (MTF) são excluídas da avaliação. As diferentes categorias de acometimento articular são definidas de acordo com a localização e o número de articulações envolvidas (padrão ou distribuição do acometimento articular). A pontuação ou colocação na categoria mais alta possível é baseada no padrão de envolvimento articular.

<sup>B</sup>São consideradas grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos.

<sup>C</sup>São consideradas pequenas articulações: punhos, MTCF, IFP, interfalangeana do primeiro quirodáctilo e articulações MTF.

<sup>D</sup>Nesta categoria, pelo menos uma das articulações envolvidas deve ser uma pequena articulação; as outras articulações podem incluir qualquer combinação de grandes e pequenas articulações, bem como outras não especificamente mencionados em outros lugares (por exemplo, temporomandibular, acromioclavicular e esternoclavicular).

<sup>E</sup>Negativo refere-se a valores (Unidade Internacional-UI) menores ou iguais ao limite superior normal (LSN) para o método e laboratório. Título positivo baixo corresponde aos valores (UI) maiores que o LSN, mas menores ou iguais a três vezes o LSN para o método e laboratório. Título positivo alto: valores maiores que 3 vezes o LSN para o método e laboratório. Quando o FR só estiver disponível como positivo ou negativo, um resultado positivo deve ser marcado como "positivo em título baixo".

<sup>F</sup>Normal / anormal é determinado por padrões laboratoriais locais (*Outras causas de elevação das provas de fase aguda devem ser excluídas*).

<sup>G</sup>Duração dos sintomas se refere ao relato do paciente quanto a duração dos sintomas ou sinais de sinovite (por exemplo, dor, inchaço) nas articulações que estão clinicamente envolvidas no momento da avaliação, independentemente do status do tratamento.

FR = fator reumatóide; AAPC = anticorpos antiproteína/peptídeo citrulinados; LSN = limite superior do normal; VHS = velocidade de hemossedimentação; PCR = proteína C-reativa.

Fonte: Fuller R. Critério de classificação da artrite reumatoide ACR-EULAR 2010. Rev Bras Reumatol. 2010; 50 (5):481-6.

## ANEXO III



CCP - \_\_\_\_

Genótipo: \_\_\_\_

### PROTOCOLO - SOROTECA CCP

Nome: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F

Profissão: \_\_\_\_\_ Cor:  B  A  M  N

Procedência: \_\_\_\_\_ Data da Soroteca: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

#### ENCAMINHAMENTO:

-ANTI HCV \_\_\_\_\_

-AgHBs \_\_\_\_\_

-ANTI HBc \_\_\_\_\_

TXR

HMD

#### FATORES DE RISCO:

ADIn. Há \_\_\_\_\_

ADI. Há \_\_\_\_\_

TATUAGEM. Há \_\_\_\_\_

TRANSFUSÃO. Há \_\_\_\_\_

ATIVIDADE HOMOSSEXUAL

PROMISCUIDADE

CIRURGIA Há \_\_\_\_\_

PROFISSIONAL DA SAÚDE

TRATAMENTO DENTARIO

OUTROS

CONTATO FAMILIAR

CONTATO GRUPO RISCO

ACUPUNTURA

ALCOOLISMO. DOSE: \_\_\_\_\_

TABAGISMO

GLUCO. Há \_\_\_\_\_

DST

HMD \_\_\_\_\_

TXR \_\_\_\_\_

- Drogas em uso: \_\_\_\_\_

-Antecedente Hepatite/Icterícia: \_\_\_\_\_

#### MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS:

não

sim

Ascite

Icterícia

Hematomas

Prurido

Spiders

Ginecomastia

EHPS

Petequias

HDA

Outros sangramentos:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

MANIFESTAÇÕES EXTRA-HEPÁTICAS:  não  sim

• Órgãos acometidos:

- Sangue:  Crioglobulinemia mista  Trombocitopenia  
 anemia aplástica  Linfoma não – Hodgkins

- Pele:  Porfíria Cutânea Tardia  Líquen plano

- Rins:  Glomerulonefrite  Síndrome Nefrótica

- Tireóide:  Hipotireoidismo  Hipertireoidismo

- Olhos:  Úlcera Córnea  Uveíte  
 Olhos secos  Esclerite  
 Prurido

- Glândulas Salivares::  Sialodinite  Boca seca  
 úlceras orais  Glossite  
 Quelite

MANIFESTAÇÕES GERAIS:  não  sim

- Mal estar
- Sensação de fraqueza
- Indisposição
- Febre
- Emagrecimento

SOROLOGIA:

• RNC VHC QUANTIT. \_\_\_\_\_

BIOPSIA HEPÁTICA:  não  sim

• RESULTADO: F= \_\_\_; CP= \_\_\_; CPP= \_\_\_; CL= \_\_\_

## Exame Físico Reumatológico

1) NEUROPATIA PERIFÉRICA:  não  sim

- Localização:  MMSS  MMII

2) FENÔMENO DE RAYNAUD:  não  sim

- Características:

- bifásica  palidez
- trifásica  cianose
- hiperemia

4) ALTERAÇÕES CUTÂNEAS:  não  sim

- Vasculite:  não  sim

- Localização:

- região palmar
- região plantar
- polpas digitais
- peri-unguel
- conjuntiva
- outros locais: \_\_\_\_\_

5) NÓDULO SUBCUTÂNEO:  não  sim

- Localização: \_\_\_\_\_

6) MIALGIA:  não  sim

7) FRAQUEZA MUSCULAR:  não  sim

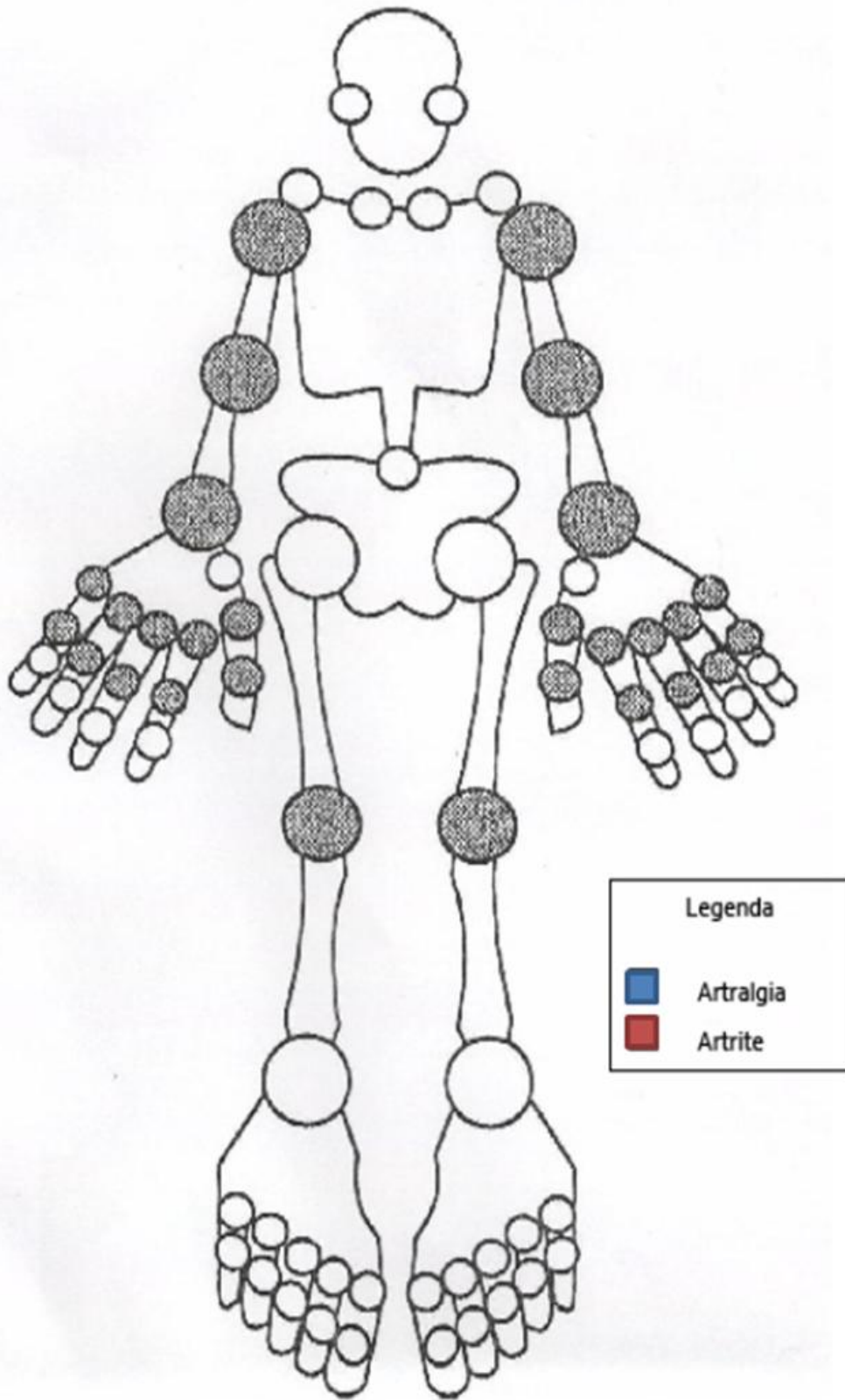
- Localização:  distal  proximal

- Cintura escapular
- Cintura pélvica

8) DOR LOMBAR/ NÁDEGAS:  não  sim

- Características da dor: \_\_\_\_\_
- Rx bacia (frente e Ferguson):  não  sim

## Avaliação da Dor



## ANEXO IV

**Tabela 2. Critérios morfológicos para o estadiamento da fibrose na Classificação METAVIR.**

---

**Classificação METAVIR: estadiamento**

Alteração histológica	Escore
Ausência de fibrose	F0
Expansão fibrosa portal sem septos	F1
Expansão fibrosa com raros septos	F2
Expansão fibrosa com numerosos septos, sem cirrose	F3
Cirrose	F4

---

**FONTE:** An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative study Group. *Hepatology*, 1996; 24: 289-293.

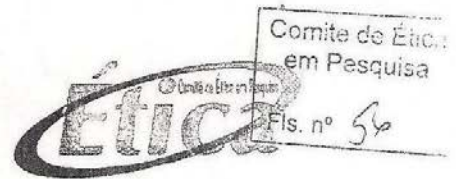
Fonte: Campos CFF, Paiva DD, Moreira PS, Barbosa HPP, Perez R, Terra C, et al. Técnicas histopatológicas semi-quantitativas e de análise de imagens digitais na avaliação do estadiamento de pacientes portadores de hepatite crônica pelos vírus B e C. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2012;11(1):48-55

## ANEXO V



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 08 de Novembro de 2010.

Of. 538/10-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Giovanni Faria Silva  
Departamento de Clínica Médica da  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Dr. Giovanni,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 3727-2010) "Manifestações reumatológicas na Hepatite C e análise de polimorfismos HLA, HPA e marcadores de autoimunidade", a ser conduzido por Natália Bronzatto Medolago, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada Prof. Dr. Oswaldo Melo da Rocha, com a colaboração de Adriana Polachini do Valle, Maria Inês de Moura Campos Pardini, Rejane Maria Tommasini Goto e Mariana Vulcano Neres, recebeu do relator parecer favorável aprovado em reunião de 08 de novembro de 2010.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP